

Diagnostic microscopique de la leishmaniose cutanée et viscérale au Maroc : contrôle / confirmation et validation par PCR entre 2002 et 2014

**Maryam HAKKOUR^{1,2*}, Faiza SEBTI^{1,3}, Bouchra EL MANSOURI¹, Amina HAJLI¹,
Abderrahim SADAK², Mohamed Mahmoud EL ALEM^{1,2}, Hajiba FELLAH¹ et Bouchra DELOUANE¹**

¹ *Laboratoire National de Référence des Leishmanioses, Institut National d'Hygiène, Agdal-Rabat, Maroc*

² *Laboratoire de Zoologie et Biologie Générale, Faculté des Sciences, Agdal-Rabat, Maroc*

³ *Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Beni Mellal, Maroc*

* Correspondance, courriel : maryam.hakkour@gmail.com

Résumé

Au Maroc, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique. De ce fait, en 1996 le Ministère de la Santé a instauré un Programme National de Lutte contre les Leishmanioses (PNRL) pour surveiller et lutter contre cette parasitose. Pour atteindre ces objectifs, ce programme a créé un Laboratoire National de Référence des Leishmanioses (LNRL). Notre travail consiste en une synthèse des résultats du contrôle du diagnostic microscopique des lames de leishmanioses du Maroc recensés au laboratoire depuis 2002 jusqu'à 2014. La validation du contrôle des lames faux positives (FP) et faux négatives (FN) par la technique PCR ITS1 (réaction en chaîne par polymérase - région interne transcrite 1) a concerné trois laboratoires provinciaux choisis avec un pourcentage d'erreur respectivement élevé, moyen et faible. Un total de 17719 cas de LC et LV a été contrôlé et confirmé au sein de LNRL. Le contrôle des frottis a permis la détection de 1395 (7,87 %) cas des leishmanioses cutanées et viscérales FP et FN, avec 723 (4,08 %) cas FP et 672 (3,79 %) cas FN. Le contrôle et la confirmation des frottis cutanée ont montré un pourcentage d'erreur de 7,95 % (714 cas FP et 665 FN) et ceux des frottis médullaire de la LV ont révélé un pourcentage de 4,37 d'erreur (16 cas sur 366 cas déclarés avec 9 cas FN et 7 cas FP). Ces lames FP et FN ont été confirmés par la PCR et les résultats obtenus concordent avec ceux de l'étude microscopique. Cette étude a montré l'importance du LNRL dans le contrôle, la formation et la supervision des laboratoires périphériques des leishmanioses.

Mots-clés : *contrôle / confirmation, leishmaniose cutanée, leishmaniose viscérale, PCR-ITS1, Maroc.*

Abstract

Microscopic diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Morocco : control / validation and confirmation by PCR between 2002 and 2014

In Morocco, leishmaniasis is an important public health problem. Thus, in 1996 the Ministry of Health established a National Program for the Fight against Leishmaniasis (NPFL) to monitor and fight against this disease. To achieve these objectives, the program has created the National Reference Laboratory of Leishmaniasis (NRLL). Among the missions of LNRL, the laboratory performs control and confirmation of the slides of cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral (VL) from the different provinces of the Kingdom. Our job is firstly a synthesis of results of the verification and confirmation of the microscopic diagnosis of

leishmaniasis slides in the laboratory from 2002 until 2014. The validation of control slides, false positive (FP) and false negative (FN), by the ITS1-PCR technique (Internal transcribed spacer 1- polymerase chain reaction) has concerned three provincial laboratories chosen respectively with a high error percentage, medium and low. During the study period, a total of 17719 cases of CL and VL has been checked and confirmed in LNRL. Control slide have detected 1395 (7.87 %) cases of FP and FN, with 723 FP (4.08 %) and 672 FN (3.79 %). Regarding the diagnosis of CL, there is a percentage error of 7.95 % (714 cases and 665 FP FN). Control and confirmation of the VL marrow smears revealed a percentage error of 4.37 (16 cases out of 366 cases reported 9 cases with FN and FP 7 cases). These FP and FN slides controlled by microscopic observation were confirmed by molecular biology and the results were similar with the results of the microscopic study.

Keywords : *control / confirmation, cutaneous leishmaniasis, visceral leishmaniasis, ITS1-PCR, Morocco.*

1. Introduction

Les leishmanioses, considérées comme des maladies négligées sont des parasitoses provoquant des affections cutanées ou viscérales très invalidantes, voire mortelles pour la leishmaniose viscérale (LV) si elles ne sont pas traitées. Elles sont dues à différents parasites appartenant au genre *Leishmania* et sont transmises par la piquûre d'insectes communément appelés phlébotomes. Chaque année, deux millions de nouveaux cas de leishmanioses sont déclarés et 350 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la maladie [1]. Au Maroc, les leishmanioses constituent un grand problème de santé publique. Elles sont représentées par deux formes cliniques distinctes : la (LV) et les leishmanioses cutanées (LC) [2]. Les LC sont dues aux trois espèces : *Leishmania major* (*L. major*), *Leishmania tropica* (*L. tropica*) et *Leishmania infantum* (*L. infantum*) variétés dermatotropes. L'évolution de la situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée montre des poussées épidémiques de la LC à *L. tropica* dans les zones rurales, urbaines et périurbaines et une apparition de plus en plus de la LC à *L. infantum* [3]. Par ailleurs, la LC à *L. major* qui connaissait une recrudescence dans les foyers traditionnels, est marquée actuellement par une période d'accalmie où le taux de diminution a dépassé 80 % [4]. La leishmaniose viscérale est causée par l'espèce *L. infantum* Mon-1 et se limitait essentiellement au nord du Maroc mais actuellement elle connaît une extension remarquable sur tout le territoire [5]. Une centaine de cas sont déclarés chaque année néanmoins, l'incidence reste stationnaire et similaire aux années antérieures [4]. Pour lutter contre cette parasitose, le Ministère de la Santé a instauré un Programme National de Lutte contre les Leishmanioses (PNLL) en 1997.

En 1999, le Laboratoire National de Référence des Leishmanioses (LNRL) a été créé au sein de l'Institut National d'Hygiène de Rabat (INH). Depuis sa création, le LNRL effectue les différentes missions imparties aux Centres Nationaux de Référence : l'expertise, la surveillance, la formation, la supervision, le contrôle, l'installation et la dotation des laboratoires de santé publique (LSP) en matériel et réactifs ainsi que la veille sanitaire. Pour la mise à niveau des laboratoires de santé publique et pour l'amélioration des performances des microscopistes, le LNRL confirme et contrôle chaque année les lames positives et négatives des cas diagnostiqués au niveau des laboratoires périphériques et des centres hospitaliers. Cette relecture permet de détecter des lames faux positives (FP) et faux négatives (FN). En outre, dans le cadre de contrôle qualité interne du LNRL, les erreurs de diagnostic sont doublement lues par l'équipe du LNRL. L'examen moléculaire supplémentaire qui permettra la validation de cette relecture a été effectué au niveau de trois laboratoires. Dans cette optique, notre travail consiste d'une part en une synthèse des résultats du contrôle et de la confirmation du diagnostic microscopique des cas de leishmanioses recensés au Maroc depuis 2002 jusqu'à 2014 et d'autre part en un classement des LSP selon leur performance actuelle. Pour la validation de la confirmation et du contrôle des lames FP et FN par la technique PCR ITS1 (polymerase chain reaction - Internal transcribed spacer 1), trois laboratoires provinciaux ont été choisis avec un pourcentage d'erreur respectivement élevé, moyen et faible.

2. Matériel et Méthodes

2-1. Contrôle et confirmation des lames recueillies entre 2002 et 2014

Les frottis cutanés et médullaires réalisés aux LSP sont envoyés au LNRL pour contrôle et confirmation. Ils sont accompagnés par des fiches contenant le résultat du diagnostic microscopique de la province et les renseignements des malades (âge, sexe, adresse, données cliniques et épidémiologiques, etc.). Les lames FP et FN sont lues par deux personnes de l'équipe du LNRL. Les données ont été analysées par le logiciel Microsoft Office Excel.

2-2. Classement des provinces selon les performances du diagnostic en 2014

L'analyse des données des résultats du diagnostic microscopique des leishmanioses au niveau des différentes provinces durant l'année 2014, a permis d'évaluer l'état actuel des performances des microscopistes. Les provinces sont ainsi classées en fonction du nombre d'erreurs (FP et FN) de lecture faites.

2-3. Validation du contrôle et de confirmation du diagnostic au LNRL par PCR

Trois provinces ont été choisies selon le pourcentage d'erreur (faible, moyen et élevé) de telle sorte que ces dernières aient au moins un cas faux positif et un cas faux négatif. Les frottis faux positifs et faux négatifs sont diagnostiqués par PCR. L'extraction d'ADN des lames des frottis cutanées a été effectuée en utilisant le kit Qiagen selon les instructions du fournisseur. La région transcrite (ITS1) du gène d'ARN ribosomal a été amplifiée en utilisant la paire d'amorces LITSR : 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' and L58S : 5'-CTGGATCATTTCGGATG-3' donnant un des fragments de 300 pb pour le genre de *Leishmania* [6, 7]. L'amplification des gènes cibles a été effectuée dans un volume total de 25 µl. Le programme de thermocycleur a été initié par dénaturation rapide de cinq minutes à 95 °C, suivie par 32 cycles de 94 °C pendant 30 s, 60 °C pendant 45 s, 72 °C pendant 60 s, puis une étape d'extension finale à 72 °C pendant cinq minutes. Les amplicons ont été analysés par électrophorèse sur des gels d'agarose à 1,2 % et visualisés par les lumières UV avec un transilluminateur. Un contrôle négatif contenant de l'eau distillée et les témoins positifs contenant l'ADN de *L. tropica* (MHOM/MA/2010/LCT10K-4), *L. infantum* (MHOM/MA/1998/LVTA) et *L. major* (MHOM/MA/2009/LCER19-09) ont été rajoutés.

3. Résultats

Dans le cadre du Programme National de Lutte contre les Leishmanioses (PNLL), le LNRL a installé depuis sa création 58 laboratoires provinciaux dans 50 provinces rattachés aux services et infrastructures des actions ambulatoires provinciales, aux hôpitaux ou aux centres périphériques de santé (**Figure 1**).

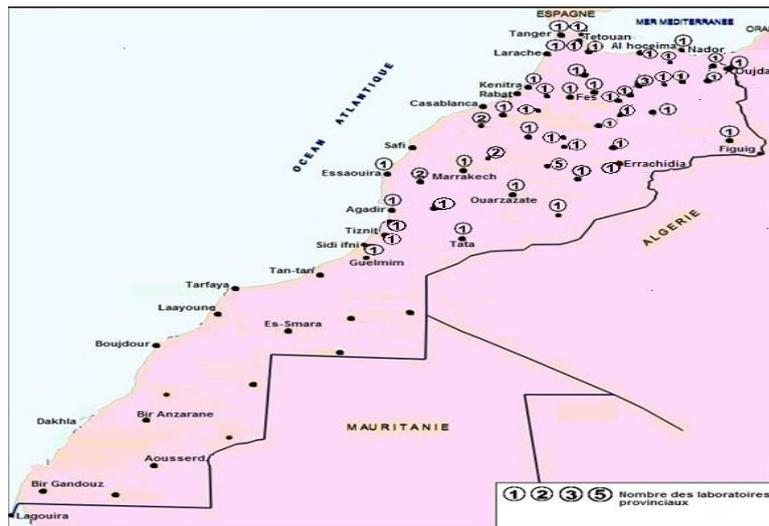


Figure 1 : Les laboratoires périphériques des leishmanioses dans les différentes provinces du Maroc en 2014

3-1. Réception des lames des provinces entre 2002 et 2014

Le LNRL reçoit chaque année les lames des différents laboratoires provinciaux pour contrôle et confirmation. Entre 2002 et 2014, un total de 17719 cas (chaque cas est représenté par une à quatre lames) a été contrôlé et confirmé (*Figure 2*).

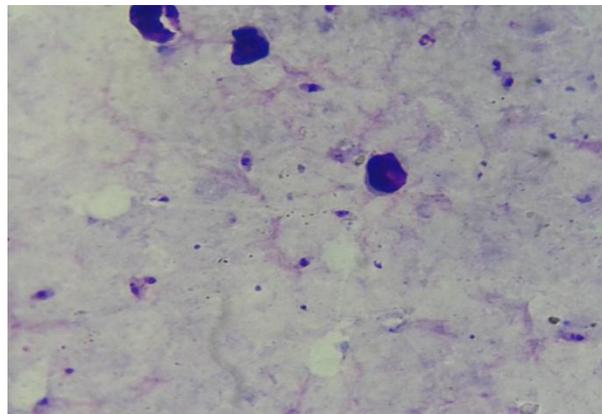


Figure 2 : Corps de leishmanies présentés sur une lame de contrôle

3-2. Contrôle et confirmation des lames de leishmanioses reçues des provinces entre 2002 et 2014

Le contrôle des frottis par le LNRL permet la détection des cas FP et FN. Entre 2002 et 2014, un total de 1395 (7,87 %) cas des leishmanioses cutanées et viscérales FP et FN ont été détectés avec 723 (4,08 %) cas FP et 672 (3,79 %) cas FN (*Figure 3*). Concernant le diagnostic de la LC, on note un pourcentage d'erreur de 7,95 % (714 cas FP et 665 FN). Le contrôle et la confirmation des frottis médullaire de la LV a révélé un pourcentage de 4,37 d'erreur (16 cas sur 366 cas déclarés avec 9 cas FN et 7 cas FP).

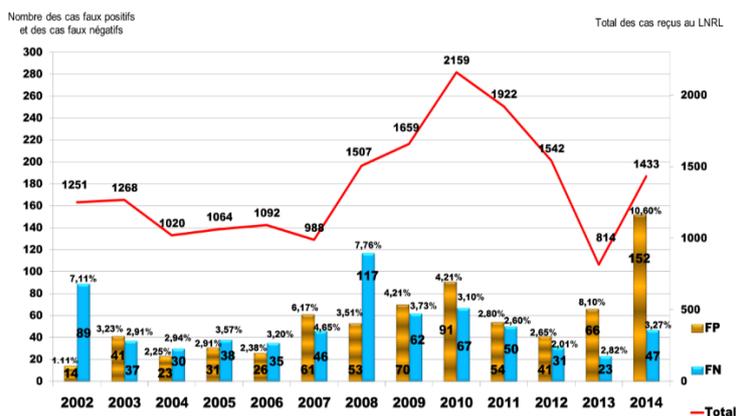


Figure 3 : Total des cas de leishmanioses cutanées et viscérales contrôlés au niveau du LNRL entre 2002 - 2014, nombre de cas faux positifs et faux négatifs détectés durant cette période

3-3. Classement des laboratoires durant l'année 2014

Durant l'année 2014, un total de 1433 cas a été contrôlé et confirmé au niveau de LNRL. Un classement des LSP a été effectué selon le pourcentage d'erreur sur le diagnostic microscopique des frottis (Tableau 1). Ce classement a concerné les laboratoires ayant diagnostiqué plus de 10 cas. Une erreur de diagnostic doit obligatoirement déclencher des mesures correctives. En même temps, un diagnostic correct ne garantit en aucune manière que les autres résultats auront la même qualité de performance.

Tableau 1 : Classement des laboratoires provinciaux selon le pourcentage d'erreur sur le diagnostic microscopique des frottis durant l'année 2014

Laboratoires	Laboratoire (L)	Classement	Nombre de cas de LC contrôlé	Nombre de Faux positif	Nombre de Faux négatif	% d'erreur
Laboratoires ayant diagnostiqués plus de 10 cas	L 1	1	61	0	0	0 %
	L 2	1	52	0	0	0 %
	L 3	1	25	0	0	0 %
	L 4	1	48	0	0	0 %
	L 5	2	70	1	0	1,4 %
	L 6	3	44	1	0	2,27 %
	L 7	4	64	2	0	3,1 %
	L 8	5	43	0	2	4,6 %
	L 9	6	20	0	1	5 %
	L 10	7	15	1	0	6,6 %
	L 11	8	153	2	9	7,2 %
	L 12	9	25	2	0	8 %
	L 13	10	300	12	19	10,33 %
	L 14	11	90	8	2	11,1 %
	L 15	12	491	54	3	11,6 %
	L 16	13	50	6	0	12 %
	L 17	14	25	4	0	14,2 %
	L 18	15	44	3	3	15,8 %
	L 19	16	287	48	7	19,16 %
	L 20	17	10	2	0	20 %
	L 21	18	12	4	0	33,33 %

Le classement des laboratoires selon la qualité du diagnostic direct des frottis a permis au LNRL d'évaluer ces derniers.

3-4. Validation du contrôle et confirmation du LNRL par PCR au niveau de 3 provinces

Après l'examen direct microscopique, 45 frottis cutanés FP et FN reçus en 2014 de trois laboratoires provinciaux (L11, L13 et L19) sont examinés par la technique PCR ITS1 dans le but de valider les résultats du LNRL et d'effectuer un contrôle de qualité interne. Un total de 43 frottis cutanés et 2 frottis médullaires ont été analysés. Parmi ces 45 frottis, 19 frottis cutanés se sont révélés FP et 22 frottis cutanés FN, les deux frottis médullaires se sont révélés 1 FP et 1 FN. Le résultat du diagnostic moléculaire a confirmé les résultats obtenus par le laboratoire LNRL concernant l'observation microscopique directe. En effet, les frottis cutanés faux positifs n'ont révélé aucune bande correspondante au genre *Leishmania* et les frottis cutanés faux négatifs ont permis la détection d'une bande d'ADN de ~320 pb relative au genre *Leishmania* (**Figure 4**).

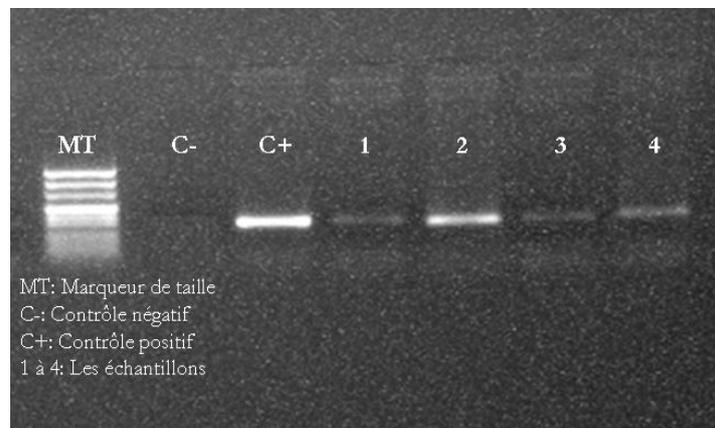


Figure 4 : Résultat de la PCR ITS1 des lames « faux négatives »

4. Discussion

Le LNRL assure la formation de base et la formation continue du personnel des laboratoires des maladies parasitaires impliqué dans le diagnostic des leishmanioses, depuis le prélèvement jusqu'à l'examen microscopique des frottis et le rendu des résultats. Pour le suivi de la performance des microscopistes, le LNRL confirme et contrôle chaque année les lames positives et négatives des cas diagnostiqués aux niveaux des laboratoires périphériques et des centres hospitaliers [8]. Cette activité permet d'évaluer la qualité du diagnostic des leishmanioses effectué au niveau des LSP et d'améliorer ainsi leur niveau. Malgré les efforts fournis par le LNRL pour l'amélioration du diagnostic direct des leishmanioses cutanées, notre étude entre 2002 et 2014, montre que le nombre de FP et FN reste élevé, le pourcentage des erreurs fluctue entre 4.66 % et 13.87 %. Ces résultats peuvent être expliqués par la non stabilité du personnel paramédical impliqué dans l'activité (mutation, départ en retraite, etc.) et leur remplacement par des personnes non formées, la création de nouveaux laboratoires en raison de l'extension de la maladie vers de nouvelles provinces, mais aussi à cause des formations insuffisantes dépendantes des décisions administratives et de la disponibilité des fonds budgétaires. D'après la relecture des lames, on déduit que les principales causes d'erreurs des cas faux négatifs sont dues soit au :

- prélèvement superficiel ne s'effectuant pas au niveau de la zone de prolifération des leishmanies, ce qui induit une présence rare des leishmanies difficilement détectable par un personnel non expérimenté;

- frottis épais ne permettrait pas la visualisation des leishmanies;
- coloration pâle ou foncée due à une mauvaise concentration en colorant Giemsa ou au non respect du temps de la coloration;
- Frottis pauvre dû soit à une mauvaise fixation (non respect du temps de fixation par le méthanol), soit à un prélèvement insuffisant.

Les principales causes d'erreurs des cas faux positifs sont dues à la confusion des leishmanies avec les plaquettes, bactéries, levures et dépôts de colorant. Ainsi, selon les défaillances observées, des recommandations spécifiques sont communiquées aux microscopistes. Elles sont relatives au prélèvement, à l'étalement, à la fixation, à la coloration ou à l'identification microscopique des amastigotes. Cette action permet l'amélioration du diagnostic et la correction des erreurs. En parallèle, le LNRL effectue des missions de supervisions pour aider à résoudre les problèmes rencontrés in situ et pour le suivi des actions correctives. Les formations continues que ce soit au laboratoire central ou au niveau des provinces sont aussi des outils importants pour l'amélioration du diagnostic au niveau des LSP. Les erreurs les plus redoutées sont celles liées au diagnostic de la LV qui est une maladie mortelle en absence de traitement. Les cas supposés FN non corrigés courent le risque de décès, quant aux cas FP, il s'agirait des patients qui devraient avoir d'autres maladies ayant des symptômes similaires aux symptômes de la leishmaniose et sont donc traités à tort.

Concernant la LC, les FN échapperont au traitement et vont entraîner ainsi la continuité de la transmission de la maladie. Tous les patients déclarés positifs bénéficient du traitement gratuit et aussi d'un suivi durant la période de l'infection. Pour mieux évaluer l'état actuel des performances des microscopistes par province, ces dernières sont ainsi classées en 2014 en fonction du nombre d'erreurs (FP et FN). D'après ce classement, les techniciens ayant un niveau de performance élevé, sont valorisés et responsabilisés à l'échelle régionale pour la formation et l'encadrement d'autres techniciens. Les LSP effectuant beaucoup d'erreur de diagnostic font l'objet de formation appropriée et d'encadrement ciblé. Pour la validation interne du LNRL du contrôle et de confirmation des lames de LC par PCR, les résultats du diagnostic moléculaire des frottis FP et FN relevés par l'équipe du LNRL concernant les trois provinces (L11, L13 et L19) choisies confirment les résultats de l'observation microscopique directe obtenus par le personnel du laboratoire central. Ceci prouve la bonne qualité du diagnostic et l'expertise des membres de l'équipe.

5. Conclusion

Le contrôle et la confirmation des lames par le LNRL est d'une grande importance puisqu'il permet une déclaration exacte des cas sans introduire de sur ou de sous-estimation des cas FP et FN déclarés par la province. Il permet aussi de suivre et d'améliorer le niveau des LSP ayant des difficultés au niveau de la lecture et / ou du prélèvement. Ces laboratoires sont donc sujets à un appui technique au cours des supervisions ou des formations continues. Aussi le contrôle du diagnostic de la leishmaniose au niveau du LNRL a montré la nécessité de renforcer le contrôle des laboratoires par un suivi continu des différentes actions pour éviter tout diagnostic FP ou FN surtout de la LV qui est une maladie mortelle.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Dr. Bachir ADLAOUI de l'Institut Nationale d'Hygiène, Pr. Khalid HABBARI de la Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal et Dr. Fatima AMARIR pour leur contribution à la révision et à la modification de cet article.

Références

- [1] - OMS, "La lutte contre les leishmanioses, Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses", Genève, Mars (2010) 22 - 26.
- [2] - M. RHAJAOUI, F. SEBTI, H. FELLAH et al., "Identification of the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Chichaoua province, Morocco", *Parasite*, 19 (2012) 81 - 84.
- [3] - F. SEBTI, A. HMAMOUCHE, F. AMARIR et al., "Molecular epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Beni Mellal and Fquih Ben Saleh provinces in Morocco", *Act. Trop.*, 149 (2015) 106 - 112.
- [4] - Ministère de la santé, Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies (DELM) "Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires", Rabat-Maroc, (2014).
- [5] - A. AMRO, S. HAMDI, M. LEMRANI et al., "Moroccan *Leishmania infantum*: genetic diversity and population structure as revealed by multi-locus microsatellite typing", *PLoS. One*, 8 (2013) e 77778.
- [6] - G. SCHÖNIAN, A. NASEREDDIN, N. DINSE et al., "PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples", *Diagn. Micro. Boil. Infect. Dis.*, 47 (2003) 349 - 358.
- [7] - A. AL JAWABREH, LF. SCHNUR, A. NASEREDDIN et al., "The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *Leishmania major*", *Trop. Med. Int. Health.*, 9 (2004) 812 - 816.
- [8] - Ministère de la santé, Direction épidémiologique de lutte contre les maladies (DELM), "le contrôle des lames des provinces et préfectures pour confirmation par le laboratoire des leishmanioses de l'INH", circulaire N°31, (08 février 2000).