Écologie des Leishmanioses dans le sud de la France

7 - Dépistage de l'enzootie canine par les méthodes immunosérologiques (1)

par **G. LANOTTE, J.-A. RIOUX, H. CROSET et Y. VOLLHARDT**

(Collaboration technique : A. MARTINI-DUMAS)

*Laboratoire d'Ecologie médicale et de Pathologie parasitaire (P^r J.-A. RIOUX),
Faculté de Médecine, rue Auguste-Broussonnet, F 34000 Montpellier*

SOMMAIRE

RÉSUMÉ-SUMMARY.

MATÉRIELS ET TECHNIQUES.

- A. — PRÉLÈVEMENT DES SÉRUMS.
- B. — RÉACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE (IF) :
 - antigène,
 - sérums,
 - réaction.
- C. — RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT (RFC) :
 - antigène,
 - sérums,
 - réaction.
- D. — MÉTHODE DE RÉFÉRENCE : RECHERCHE DIRECTE DU PARASITE :
 - technique.
- E. — TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES.

(1) Recherche réalisée grâce à l'aide de l'I.N.S.E.R.M.

RÉSULTATS. COROLLAIRES DIAGNOSTIQUES.

A. — ABANDON DE LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT COMME MÉTHODE DE RÉFÉRENCE :

- défaut de sensibilité,
- fréquence élevée des réactions anticomplémentaires.

B. — VALEUR DIAGNOSTIQUE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE :

- fidélité,
- précocité d'apparition et durée des anticorps,
- sensibilité,
- spécificité.

APPLICATION. STRATÉGIE OPÉRATIONNELLE.

A. — DÉPISTAGE EN UN TEMPS :

- utilisation d'indices de correction,
- choix d'un titre-seuil.

B. — DÉPISTAGE EN DEUX TEMPS :

- étude de la variation du taux d'anticorps dans un intervalle de temps défini.

C. — CONCLUSIONS.

Résumé

Dans le but de procéder à l'analyse épidémiologique du foyer leishmanien du sud de la France, les auteurs ont mis au point une stratégie opérationnelle simple, basée sur l'utilisation raisonnée de la réaction d'immunofluorescence.

Dans un premier temps, deux réactions immunosérologiques, l'immunofluorescence et la réaction de fixation du complément, ont été étudiées parallèlement sur 1.504 sérums provenant de 1.364 chiens et sur 96 sérums provenant de deux chiens infestés expérimentalement. Le contrôle parasitologique a été assuré par la recherche de leishmanies dans le suc ganglionnaire. Devant son manque de sensibilité et le nombre élevé de réactions anticomplémentaires, la réaction de fixation du complément a dû être abandonnée.

Dans un deuxième temps, la valeur de l'immunofluorescence a été confirmée grâce à l'étude de 2.421 sérums prélevés sur 2.203 chiens d'enquête et sur 2 chiens inoculés au laboratoire, le contrôle étant toujours assuré par l'examen parasitologique des ganglions.

Au terme de cette analyse, l'immunofluorescence se révèle fidèle et sensible. Toutefois, dans la pratique épidémiologique, son défaut de spécificité impose l'adoption de méthodes de corrections, en l'occurrence le choix d'un titre seuil (1/160) ou l'étude de la variation des anticorps dans un intervalle de temps défini.

En définitive, l'utilisation de l'immunofluorescence permet de poser les bases d'une stratégie opérationnelle satisfaisante et par là même d'envisager l'analyse structurale rationnelle du foyer leishmanien du sud de la France.

Summary (2)

Ecology of leishmaniasis in the South of France. 7. Research of canine reservoir by the mean of serological reactions.

In order to unravel the epidemiology of a focus of leishmaniasis in the South of France, the authors studied the question by the use of immunofluorescent techniques.

First, two serological reactions (immunofluorescence and complement fixation) were applied to (a) 1 504 samples of serum taken from 1 364 dogs, and (b) 96 samples taken from 2 experimentally infected dogs. These animals were examined for the presence of the parasite by puncture of the lymph glands. The complement fixation reaction was abandoned because of its lack of sensitivity and the frequency of anti-complementary sera.

Second, the above numbers were increased to 2 421 specimens of the taken from 2 203 dogs, with experimental controls, but only immunofluorescence was tested.

The immunofluorescence test was shown to be accurate and sensitive. However, in practice it is desirable to take into account only reactions of 1/160 and above, or to observe sero-conversion after a requisite interval of time. The application of these two criteria makes practicable a true analysis of the epidemiological situation in this focus of leishmaniasis.

Malgré de substantiels progrès, la structure des foyers méditerranéens de leishmaniose viscérale reste encore mal connue, particulièrement en ce qui concerne les réservoirs vertébrés. Alors que sur le plan clinique et biologique la maladie canine a donné lieu à d'importants travaux, sur le plan épidémiologique le chien n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune enquête à caractère statistique. De la sorte, les prévalences géographiques de l'enzootie ne peuvent être correctement exprimées, et, par là même, la plupart des interprétations proposées sur le fonctionnement des foyers étudiés sont entachées de subjectivité.

Or la programmation et l'exécution de telles enquêtes, s'appuyant obligatoirement sur des dépistages de masse, supposent la mise au point de techniques diagnostiques à la fois simples et sûres, permettant le traitement rapide et correct des échantillons de terrain. Seules les réactions immunosérologiques satisfont à ces conditions, à l'inverse de l'examen clinique ou de la recherche directe du parasite, trop incertain ou trop complexe.

Au demeurant, tous les types de réactions ne sauraient convenir à de telles investigations. Ainsi, l'immunodiffusion et l'hémagglutination passive, dont l'intérêt diagnostique ou taxonomique est par ailleurs indiscutable (R. S. Bray et coll., 1966 ; J. Ranque et coll., 1969 ; R. S. Bray, 1969 ; D. Le Ray et coll., 1973), sont en général peu pratiquées en raison de la grande consommation en antigène soluble qu'elles entraînent. Par contre, la fixation du complément (E. Falchetti et coll., 1932 ; V. Nussenzweig et coll.,

(2) Nous remercions le Professeur P.-C. Garnham pour les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer tout au long de ce travail.

1957 ; J.W. Torrealba et coll., 1963) et l'immunofluorescence (M. Quilici et coll., 1968 ; A. Giauffret et coll., 1971) satisfont habituellement aux exigences imposées par la pratique épidémiologique.

FIG. 1. — Prévalence de la leishmaniose canine dans la zone prospectée de 1970 à 1972. Les localités à fréquence leishmanienne élevée (supérieure à 4 %) correspondent aux Basses Cévennes (région du Vigan) ; les localités à fréquence leishmanienne moyenne (de 1,1 à 4 %), faible et nulle (de 0 à 1 %) leur succèdent au Nord et au Sud. A noter, au Nord-Ouest de la région, le petit foyer des Gorges du Tarn aux environs de Millau

Au cours des trois dernières années, nous avons pu mettre au point et comparer ces deux techniques sur 2.421 sérums de chiens prélevés dans la région Cévennes-Bas-Languedoc (fig. 1). Une telle étude a montré que seule l'immunofluorescence pouvait être retenue en pratique courante. Son utilisation systématique a permis

d'autre part de jeter les bases d'une stratégie opérationnelle applicable à l'analyse structurale du foyer cévenol.

Matériels et techniques

A. Prélèvement des sérums

Le sang est prélevé sur tubes siliconés, par ponction des veines jugulaire ou céphalique. Après centrifugation, dix minutes à 4 000 t/mn, l'échantillon est placé à + 4° C pendant 12 heures. Le sérum est alors recueilli et conservé au froid (— 30° C). Dans certains cas (transport à longue distance, stockage prolongé), il peut être lyophilisé ou stabilisé par l'adjonction d'un produit antiseptique (merthiolate, azoture de sodium).

Lors des dépistages de masse, les prélèvements sont effectués par une équipe de six personnes disposant d'un camion-laboratoire et d'une voiture de liaison. Les autorités des localités retenues sont prévenues quelques jours avant la collecte, de manière à informer par voie d'affiches ou de presse les propriétaires de chiens et à assurer l'aménagement d'un local apte à recevoir nos installations. Un effort de sensibilisation est d'ailleurs réalisé directement par le laboratoire d'Ecologie. Le jour du sondage, les chiens sont regroupés. Pour chacun d'eux, une fiche de renseignements est remplie. Le rendement d'une telle opération peut atteindre 160 sérums par jour (fig. 2).

B. Réaction d'immunofluorescence (IF)

Elle est réalisée selon la méthode indirecte. Le complexe antigène-anticorps est révélé par un sérum antiglobuline de Chien, marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (3). L'antigène est constitué par des formes promastigotes de *Leishmania donovani* (souche humaine n° XXVII) entretenue sur milieu NNN.

ANTIGÈNE :

L'exsudat d'une culture de sept jours sur milieu NNN est centrifugé à 2.000 t/mn pendant cinq minutes. Le culot est lavé cinq fois en eau chlorurée à 9 ‰, puis remis en suspension de façon à obtenir une concentration finale de 2×10^6 parasites/ml. Cette suspension est répartie en gouttes sur des lames porte-objet et séchée sous ventilation à 37° C. L'antigène peut être utilisé immédiatement ou après stockage au congélateur à — 70° C (temps minimal de conservation : quatre mois).

SÉRUMS :

2.325 sérums, correspondent à 2.203 chiens « tout-venant » ponctionnés une ou plusieurs fois lors d'enquêtes systématiques ; 96 sérums correspondent à deux chiens

(3) Antiglobuline du commerce, délivrée par l'Institut Pasteur de Paris.

(A et B) infestés expérimentalement (4) avec le broyat d'un ganglion de chien leishmanien (chien 3732).

Les prélèvements sont effectués au niveau de la veine jugulaire. Le sang, recueilli sur matériel siliconé, est immédiatement centrifugé (4.000 t/mn pendant 10 mn), de façon à éviter l'hémolyse. Le sérum est récupéré le lendemain.

Fig. 2. — Prise de sang à la veine jugulaire.

Le chien, muselé par un licol noué successivement sous la gueule et sur l'occiput, est maintenu en position « assise ». L'aide a passé le bras droit sous le poitrail pour bloquer l'animal contre le dossier de la table de prélèvements. Sa main gauche redresse la tête de manière à étirer le cou. La ponction de la jugulaire est réalisée à l'aide d'une aiguille 40/12. Avec le pouce gauche, l'opérateur comprime le paquet vasculaire immédiatement au-dessus de l'extrémité interne de la première cote ; l'aiguille et le tube de prélèvement sont manipulés de la main droite.

(4) Le chien A a reçu quatre injections de formes amastigotes, à savoir : 165 millions par la voie sous-cutanée, 165 millions par la voie intrapéritonéale, 110 millions par la voie intraveineuse et 110 millions par la voie intrahépatique. Le chien B a reçu la moitié de cette dose par les mêmes voies.

RÉACTION :

La technique, décrite par P. Ambroise-Thomas (1963) et appliquée au diagnostic des leishmanioses par M. Quilici et coll. (1968), comporte les temps suivants :

- fixation de l'antigène par l'acétone (10 mn à la température ambiante) ;
- dilution du sérum en tampon phosphate de pH 7,2 en progression de raison 2, de 1/20 à 1/2.560 et plus si nécessaire ;
- dépôt d'une goutte de sérum dilué par plage d'antigène ;
- mise à l'étuve à 37° C pendant 30 mn ;
- lavage en tampon phosphate suivi de séchage ;
- addition d'une goutte de conjugué fluorescent (dilué au 1/75 dans une solution de bleu d'Evans au 1/10.000) par plage ;
- mise à l'étuve à 37° C suivie d'un nouveau lavage en tampon ;
- séchage, puis montage entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine tamponnée (9 parties de glycérine, 1 partie de tampon) ;
- lecture au microscope à fluorescence (5).

C. Réaction de fixation du complément (RFC)

La fixation du complément est obtenue à froid selon la méthode de Kolmer. La lecture se fait par appréciation de l'hémolyse à 100 %. L'antigène est un extrait aqueux de formes promastigotes de *Leishmania donovani* (souche humaine XXVII et XI), maintenues en culture sur milieu NNN.

ANTIGÈNE :

Les formes promastigotes sontensemencées sur milieu cœur-cerveau-sang (J.-A. Rioux et coll., 1970), de façon à obtenir une multiplication rapide et massive (6).

Les parasites sont récoltés au 10^e jour et lavés en eau chlorurée à 9 ‰. L'antigène soluble est extrait en eau distillée après éclatement des corps par congélation à — 20° C, suivie de décongélation-broyage (5 fois). La suspension obtenue est centrifugée (15.000 t/mn pendant 60 mn à + 4 °C). Le surnageant est lyophilisé. L'antigène est titré par dilution à partir d'une solution mère en tampon de Mayer (10 mg de poudre par millilitre de tampon), conformément à la « méthode de l'échiquier ». La suspension finale utilisée dans la réaction varie entre 1/25 et 1/50 selon le lot. Aucun pouvoir anticomplémentaire n'est noté.

(5) Type Fluorpan Reichert avec brûleur à vapeurs de mercure HBO 50 et filtre excitateur BG 12.

(6) Des difficultés de repiquage sur le milieu cœur-cerveau-sang nous ont amenés à remplacer la souche XXVII par la souche XI. 759 sérums ont été examinés avec le premier antigène, 745, dont ceux des chiens A et B, avec le second. Les deux antigènes, étudiés comparativement sur 83 sérums, répondaient de façon parfaitement concordante.

SÉRUMS :

La RFC a été pratiquée parallèlement à l'IF sur 1.504 sérums se répartissant comme suit : 1.408 sérums provenaient de 1.364 chiens d'enquête, 96 des chiens A et B. Avant la réaction, les sérums sont décomplémentés 30 mn à $+56^{\circ}\text{C}$.

Fig. 3. — Ponction du ganglion poplitée.

Sur le terrain, la ponction s'effectue le plus souvent sur la table de prélèvements. Dans le cas d'un chien de taille moyenne, l'opération est réalisée en décubitus latéral. Après rasage et désinfection du pli de la fesse, le ganglion est saisi entre le pouce et l'index et ponctionné le « vide à la main ». La pulpe splénique est recueillie dans 1 ml d'eau chlorurée à 9‰.

RÉACTION :

Elle s'effectue sur plaque de microtitration (7). Le titrage du complément hémolytique en présence d'antigène précède toujours la réaction proprement dite.

Le sérum est dilué en tampon de Mayer, selon une progression de raison 2 du 1/10 au 1/640 ou plus. Dans chaque cupule sont introduits 25 μl de sérum, 25 μl d'antigène et 50 μl de complément (2 unités hémolytiques). Chaque plaque comporte les témoins suivants : sérums, antigène, complément et système hémolytique. La fixation est obtenue à froid pendant 18 heures. Après réchauffement 10 mn à 37°C , 25 μl

(7) Plaques de microtitration à 96 cupules.

de globules rouges de mouton à 2 % et 25 μ l de sérum hémolytique au 1/1.000 sont ajoutés dans chaque cupule. Les plaques sont remises à l'étuve. La lecture débute 10 mn après la lyse des témoins.

D. Méthode de référence : recherche directe du parasite

Pour contrôler la valeur des réactions d'immunofluorescence et de la fixation du complément, nous avons pratiqué systématiquement l'examen parasitologique du suc ganglionnaire prélevé par ponction (adénite poplitée ou cervicale). Par ce moyen, la

Fig. 4. — Ponction ganglionnaire (détail).

mise en évidence du parasite est possible dans la plupart des cas, à condition d'utiliser concurremment l'examen direct et la culture sur milieu NNN, et de réitérer le prélèvement à trois reprises, en cas de résultat négatif. La régression de C. Zippin (1956-1958) montre en effet que 63 ± 3 % de chiens parasités sont détectés à la première ponction, 86 ± 3 % à la deuxième et 94 ± 4 % à la troisième.

TECHNIQUE :

Après rasage et désinfection soigneuse, la peau et l'atmosphère périganglionnaire sont anesthésiées (xylocaïne à 2 %). Le ganglion, maintenu comprimé entre le pouce et l'index, est ponctionné à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue contenant 1 ml d'eau salée isotonique stérile (fig. 3 et 4). Le suc aspiré est immédiatement ense-

mencé sur milieu NNN ; une petite partie, demeurant en général dans le corps de la seringue, est étalée sur lame pour servir à l'examen direct (coloration May-Grunwald-Giemsa). L'adénoculture est vérifiée tous les sept jours. En cas de négativité, les repiquages sont répétés jusqu'à concurrence de cinq passages.

E. Traitement statistique des données

Les pourcentages, accompagnés de leur intervalle de confiance, sont comparés par le test de « l'écart-réduit » (cf. D. Schwartz, 1963).

La comparaison des résultats obtenus par les techniques IF et RFC est réalisée au moyen du test de corrélation (8). Les modifications des taux d'anticorps en fonction du temps sont appréciées par le test de corrélation après transformation logarithmique, le temps nécessaire à l'évolution des titres 1/20 et 1/40 étant calculé d'après la valeur du coefficient de pente.

Le rendement de la ponction ganglionnaire, servant de méthode de référence, est obtenu par le calcul de la régression de C. Zippin, méthode utilisée par ailleurs pour l'échantillonnage absolu par « effort constant de pêche » (cf. T.-R. Southwood, 1966).

Résultats. Corollaires diagnostiques

Dans un premier temps, les trois techniques décrites ci-dessus (recherche du parasite, RFC, IF) ont été appliquées sur un lot de 1.364 chiens pris au hasard, dont 44 parasitologiquement confirmés. Ultérieurement, le lot a été porté à 2.203 chiens, de manière à parfaire la mise au point de la technique d'immunofluorescence. A ces lots se sont ajoutés les deux chiens (A et B) inoculés expérimentalement.

L'ensemble des résultats obtenus a permis de discuter, sur des bases statistiques, de la valeur diagnostique des deux réactions immunologiques. Les qualités reconnues à la réaction d'immunofluorescence ont rendu possible son application au dépistage de la maladie et par là même à l'analyse épidémiologique du foyer Cévennes-Bas-Languedoc (cf. ci-après).

A. Abandon de la réaction de la fixation du complément comme méthode de dépistage

La RFC n'a pas été retenue, pour deux raisons principales : défaut de sensibilité d'une part, mise en échec fréquente due à l'anticomplémentarité des sérums d'autre part.

(8) Toutefois, cette comparaison a été préalablement effectuée au moyen des classiques tests de χ^2 et de l'« écart-réduit ». Les résultats conformes obtenus de cette manière ont permis d'appliquer les tests moins « robustes » mais plus élaborés dont il sera question dans ce mémoire.

DÉFAUT DE SENSIBILITÉ :

Deux cas doivent être distingués : celui des leishmanioses déclarées telles qu'on les observe chez les chiens adressés au laboratoire pour consultation, et celui des formes asymptomatiques, dépistées par exemple à l'occasion d'enquêtes systématiques.

Si l'on fait abstraction des sujets à sérum anticomplémentaire (cf. ci-après), les chiens qui nous sont présentés pour confirmation d'une leishmaniose sont en général porteurs d'anticorps fixant le complément. Il en est de même chez les chiens inoculés expérimentalement (A et B). Chez ces derniers, les anticorps apparaissent dès le 8^e jour et augmentent assez régulièrement, amorçant la phase exponentielle de la courbe (fig. 5). Ici, la sensibilité de la méthode est satisfaisante.

Le problème diffère lorsqu'on s'adresse à des chiens « pris au hasard ». Ainsi, lors d'un sondage portant sur 1.364 chiens, le premier examen sérologique n'a pas mis en évidence d'anticorps fixant le complément chez 17 individus sur les 44 (soit 38 %) parasitologiquement confirmés (tableau I). Au surplus, sur ces 17 cas, 14 ne présentaient aucun symptôme clinique.

FRÉQUENCE ÉLEVÉE DES RÉACTIONS ANTICOMPLÉMENTAIRES :

Au cours des enquêtes, les phénomènes d'anticomplémentarité sont fréquemment observés. De 5 % (65 sur 1.320) pour les animaux non parasités, ce taux s'élève à 25 % (11 sur 44) chez les animaux leishmaniens.

De même, chez les chiens inoculés expérimentalement (A et B), la courbe des anticorps fixant le complément est interrompue vers le 40^e jour par l'apparition des réactions anticomplémentaires (fig. 5).

En définitive, le manque de sensibilité et la grande fréquence des réactions anticomplémentaires nous ont conduits à abandonner, pour l'instant tout au moins, la réaction de fixation de complément en tant que méthode pratique de dépistage. Restait à savoir si la réaction d'immunofluorescence prise isolément était en mesure de répondre aux exigences de notre enquête.

B. Valeur diagnostique de l'immunofluorescence

FIDÉLITÉ :

On sait que la lecture de l'IF comporte une part non négligeable de subjectivité. Néanmoins, grâce à quelques précautions (méthode quantitative, lecture effectuée par la même personne, contrôles fréquents du brûleur à vapeurs de mercure), on peut facilement s'assurer de la fidélité et de la reproductibilité de la technique.

PRÉCOCITÉ D'APPARITION ET DURÉE DES ANTICORPS :

Dans la leishmaniose expérimentale, les anticorps IF apparaissent très précocement (fig. 5). Au 4^e jour de l'infestation, on détecte des taux de 1/10 (chien B) et de 1/40 (chien A). Entre le 40^e jour (A) et le 65^e jour (B), ils atteignent leurs valeurs les plus élevées, soit 1/40.960 (A) et 1/81.920 (B). La courbe accuse alors un assez long palier

de 100 (A) et 220 (B) jours, puis s'infléchit lentement (9). Chez le chien A, le taux en est encore au 1/640 390 jours après l'infestation, alors que seule est apparue (265° jour) une discrète adénopathie poplitée (culture positive). Au 450° jour, le taux se maintient aux environs du 1/320. Chez le chien B, une hypertrophie unguéale et une dépilation diffuse ne sont notées qu'au 243° jour ; le taux d'anticorps est redescendu

Fig. 5. — Evolution des anticorps fluorescents et des anticorps fixant le complément chez un chien (A), inoculé avec *Leishmania donovani* (Souche XXXV). La zone d'anticomplémentarité en RFC correspond, en IF, aux taux d'anticorps les plus élevés

au 1/10.240. Au 390° jour, tandis que le tableau clinique s'est complété (dépilation, ulcération des coudes, polyadénopathie, amaigrissement), ce taux est encore de 1/2.560 ; au 450° jour, le taux se maintient aux environs du 1/320.

Quoi qu'il en soit, l'immunofluorescence est donc susceptible de révéler très tôt et pendant toute la durée de la maladie expérimentale la présence d'anticorps circulants.

SENSIBILITÉ :

Les observations réalisées à l'occasion de nos enquêtes ont également montré la grande sensibilité de la réaction de l'IF ; ainsi :

- à l'exception d'un cas, les 108 sérums d'animaux leishmaniens examinés contenaient des anticorps fluorescents (10) ;

(9) D'après ce que l'on sait de l'incurabilité de la leishmaniose viscérale du chien, les anticorps fluorescents doivent persister indéfiniment.

(10) Il s'agissait d'un animal (n° 1605) examiné quatre fois (intervalle des examens : 55, 100 et 100 jours) chez lequel la réaction d'immunofluorescence a été mise en défaut une fois (55° jour).

- les titres pouvaient atteindre le taux de 1/40.960 ;
- lors de la découverte des Leishmanies, les taux d'anticorps fluorescents n'étaient jamais inférieurs au 1/80 (11) (tableau II) ;
- ces anticorps étaient décelables avant l'apparition des premiers signes cliniques ; ainsi, parmi 25 chiens leishmaniens ne présentant aucun symptôme au moment du dépistage sérologique, 16 au moins, développaient une leishmaniose évolutive dans les mois suivants.

TABLEAU I. — Corrélation des taux d'anticorps IF et RFC dans la leishmaniose canine.
Examen pratiqué lors du dépistage séro-immunologique
[$r = 0,37$; $ddl = 31$; AC (2) : sérum anticomplémentaire]

TABLEAU II. — Corrélation des taux d'anticorps IF et RFC dans la leishmaniose canine
Examen pratiqué sur le même lot (cf. tabl. I) au moment de l'isolement du parasite
[$r = 0,66$; $ddl = 24$; AC (2) : sérum anticomplémentaire]

(11) Dans notre statistique de 44 chiens leishmaniens, 14 se trouvaient dans ces conditions. Le phénomène conduit à penser que l'atteinte parasitaire du ganglion est postérieure à l'apparition des anticorps fluorescents ou tout au moins se limite à des « nids » très circonscrits.

En définitive, dans la leishmaniose canine, on peut conclure à l'excellente sensibilité de la technique d'immunofluorescence, qui décèle les anticorps dans 99 % (± 1) des cas.

SPÉCIFICITÉ :

La grande sensibilité de la réaction d'immunofluorescence est assortie, une fois encore, d'un certain manque de spécificité. Ainsi, sur 122 chiens porteurs d'anticorps, la confirmation parasitologique n'a pu être apportée que dans 37 % des cas (tableau III).

TABLEAU III

Titre d'anticorps IF au moment du dépistage	Leishmaniose confirmée (12)	Leishmaniose non confirmée	Totaux
1/20	12	36	48
1/40	2	18	20
1/80	4	9	13
1/160	10	7	17
1/320 et plus	18	6	24
Totaux	46	76	122

Comme il se doit, ce défaut est particulièrement marqué pour les faibles taux de dilution (1/20, 1/40, 1/80). Alors que 68 % (28/41) des chiens porteurs d'anticorps à des taux égaux ou supérieurs au 1/160 fournissent la preuve parasitologique d'une leishmaniose, ce pourcentage tombe à 22 % (18/81) pour les dilutions inférieures.

Application. Stratégie opérationnelle.

Ainsi que nous l'avons exposé, l'orientation essentiellement écologique de nos recherches nous amène à utiliser, donc à établir, une série d'indices de morbidité tels que l'incidence, la prévalence, la fréquence géographique, etc. A ce prix seulement, il devient possible de replacer le foyer leishmanien cébenno-languedocien dans son contexte méditerranéen et plus encore d'en poursuivre l'analyse structurale.

(12) Par la découverte du parasite.

Pour atteindre ce but, deux types de techniques sont à notre disposition : la mise en évidence du parasite et la détection des anticorps.

La recherche du parasite (cf. méthode de référence), effectuée en un ou trois temps sur des chiens « tout-venant » ou porteurs d'anticorps ne saurait être retenue : associée à la sérologie, elle fait double emploi ; pratiquée dans l'optique de la méthode de C. Zippin, elle entraîne des contraintes logistiques beaucoup trop lourdes. Seule demeure la méthode immunosérologique qui, dans notre cas, relève essentiellement de la technique d'immunofluorescence.

Le présent chapitre a précisément pour but d'étudier les modalités d'application de cette technique et, par là même, de dégager les éléments d'une stratégie opérationnelle souple, permettant de faire face, sans difficultés excessives, aux problèmes déjà complexes de l'échantillonnage.

Pour ce faire, trois méthodes seront éprouvées : d'une part, l'utilisation d'indices de correction ou d'un titre-seuil (dépistage en un seul temps) ; d'autre part, l'étude de la variation du taux d'anticorps dans un intervalle de jours défini (dépistage en deux temps).

A. Dépistage en un temps

UTILISATION D'INDICES DE CORRECTION (tableau IV) :

Le rapport du nombre de chiens leishmaniens au nombre de chiens porteurs d'anticorps permet de calculer une série d'indices de correction pour chaque titre ou groupe de titres. Malheureusement, si ce procédé permet d'obtenir des résultats globaux corrects, les difficultés qu'entraîne sa pratique ne permettent pas de le considérer comme véritablement opérationnel. Au surplus, il donne à l'analyse sectorielle des résultats significativement différents de la méthode de référence.

Tableau IV

CLASSES DE PRÉVALENCE	CRITÈRE PARASITOLOGIQUE Nombre de cas retenus après 3 examens	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus après correction indiciaire
Faible	0/46 (0 %)	8/46 (17 %)
	$\varepsilon = 2,96$	
Moyenne	14/46 (30 %)	17/46 (37 %)
	$\varepsilon = 0,66$	
Forte	32/46 (70 %)	21/46 (46 %)
	$\varepsilon = 2,32$	

Tableau V

CLASSES DE PRÉVALENCE	CRITÈRE PARASITOLOGIQUE Nombre de cas retenus après 3 examens	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus au seuil du 1/80 ^{ème}
Faible	0/46 (0%)	12/54 (22%)
	$\varepsilon = 3,40$	
Moyenne	14/46 (30%)	18/54 (33%)
	$\varepsilon = 0,30$	
Forte	32/46 (70%)	24/54 (45%)
	$\varepsilon = 2,52$	

Tableau VI

CLASSES DE PRÉVALENCE	CRITÈRE PARASITOLOGIQUE Nombre de cas retenus après 3 examens	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus au seuil du 1/160 ^{ème}
Faible	0/46 (0%)	5/41 (12%)
	$\varepsilon = 2,43$	
Moyenne	14/46 (30%)	16/41 (39%)
	$\varepsilon = 0,84$	
Forte	32/46 (70%)	20/41 (49%)
	$\varepsilon = 1,96$	

Tableau VII

CLASSES DE PRÉVALENCE	CRITÈRE PARASITOLOGIQUE Nombre de cas retenus après 3 examens	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus après séroconversion
Faible	0/46 (0%)	4/59 (7%)
	$\varepsilon = 1,8$	
Moyenne	14/46 (30%)	19/59 (32%)
	$\varepsilon = 0,2$	
Forte	32/46 (70%)	36/59 (61%)
	$\varepsilon = 0,9$	

Tableau VIII

CLASSES DE PRÉVALENCE	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus au seuil du 1/80 ^{ème}	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus au seuil du 1/160 ^{ème}
Faible	12/54 (22%)	5/41 (12%)
	$\varepsilon = 1,26$	
Moyenne	18/54 (33%)	16/41 (39%)
	$\varepsilon = 0,60$	
Forte	24/54 (45%)	20/41 (49%)
	$\varepsilon = 0,39$	

Tableau IX

CLASSES DE PRÉVALENCE	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus au seuil du 1/80 ^{ème}	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus après séroconversion
Faible	12/54 (22%)	4/59 (7%)
	$\varepsilon = 2,35$	
Moyenne	18/54 (33%)	19/59 (32%)
	$\varepsilon = 0,13$	
Forte	24/54 (45%)	36/59 (61%)
	$\varepsilon = 1,8$	

Tableau X

CLASSES DE PRÉVALENCE	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus au seuil du 1/160 ^{ème}	CRITÈRE IMMUNOLOGIQUE Nombre de cas retenus après séroconversion
Faible	5/41 (12%)	4/59 (7%)
	$\varepsilon = 0,9$	
Moyenne	16/41 (39%)	19/59 (32%)
	$\varepsilon = 0,7$	
Forte	20/41 (49%)	36/59 (61%)
	$\varepsilon = 1,2$	

CHOIX D'UN TITRE-SEUIL (tableaux V, VI, VIII, IX et X) :

La fréquence globale de l'enzootie leishmanienne calculée sur la base des titres-seuils 1/80 (44,26 %) ou 1/160 (33,6 %) n'est pas significativement différente (ϵ 1/80 = 1,04 ; ϵ 1/160 = 0,66) de celle que donne la méthode de référence (37,7 %). Chacun de ces deux titres peut donc être pris comme « seuil significatif », encore que le 1/160 permette d'obtenir une prévalence globale plus proche de celle indiquée par la méthode de référence. Toutefois, lorsqu'il s'agit d'exprimer des fréquences partielles, l'analyse statistique montre que seul le titre-seuil du 1/160 reste conforme. Il en est ainsi (tableaux V et VI) lorsqu'on regroupe les localités du foyer en trois classes de prévalence, faible, moyenne et forte (13).

B. Dépistage en deux temps

ETUDE DE LA VARIATION DU TAUX D'ANTICORPS DANS UN INTERVALLE DE TEMPS DÉFINI (tableau VII) :

La variation moyenne du titre des anticorps fluorescents dans un laps de temps de six mois montre soit une séroconversion chez les animaux parasitologiquement confirmés, soit une diminution de deux dilutions chez les autres (14). Toutefois, les variations individuelles ne sont pas homogènes d'une classe de dilution à l'autre. Ainsi, en partant du titre trouvé lors du premier examen, on observe les trois éventualités suivantes :

- du 1/20 au 1/40 : séroconversion (15) chez les chiens parasitologiquement confirmés, variation négative ou nulle chez tous les autres ;
- du 1/80 au 1/160 : augmentation ou stabilité chez les chiens parasitologiquement confirmés ; chez les autres, abaissement des taux dans 60 % des cas, mais stabilité ou augmentation dans 40 % (16) ;
- au 1/320 et au-delà : aucune différence n'est observée dans la variation des titres entre les chiens parasitologiquement confirmés et les autres ; compte tenu de la proportion de chiens parasitologiquement confirmés (75 %) à partir de ce titre, on peut le considérer d'emblée comme significatif de la leishmaniose.

En définitive, les individus dont le titre initial est au 1/320 et au-delà peuvent être considérés d'emblée comme leishmaniens. Les individus dont le titre initial est inférieur au 1/320 doivent être revus après 80 jours. Sont alors considérés comme leishmaniens :

(13) Les classes de prévalence ont été établies après calcul de l'intervalle de confiance à la fréquence moyenne ($2,2 \% \pm 1 \%$) :

- de 0 à 1 %, prévalence faible ;
- de 1,1 à 4 %, prévalence moyenne ;
- au-dessus de 4 %, prévalence forte.

(14) La comparaison des deux répartitions conduit à un χ^2 de 21,8 pour ddl 6, soit une différence significative à 10-2 près.

(15) Dans cette classe, la plus difficile à interpréter, la séroconversion est obtenue en moyenne en 80 jours.

(16) Dans cette classe de dilution et compte tenu de la similitude de variation dans le temps, des anticorps trouvés chez les chiens leishmaniens et chez ces 40 % de cas non confirmés, on est en droit de penser que ce dernier lot se rapporte à des chiens parasités.

- du 1/80 au 1/160, les animaux dont le taux d'anticorps est stable ou en progression ;
- du 1/20 au 1/40, les individus présentant une augmentation significative (séro-conversion) du taux d'anticorps.

FIG. 6. — Fréquences des titres AIF obtenus par l'examen de 2612 sérums de chiens prélevés en zone d'endémie leishmanienne (courbe A) et hors de cette zone (courbe B). La distribution bimodale des titres (I. G. Kagan 1973) traduirait l'existence d'anticorps spécifiques au-delà du 1/80 (courbe A)

C. Conclusions

Si l'on se réfère au foyer cévenol, la comparaison statistique des résultats obtenus par les trois méthodes (indices de correction, titre-seuil, séroconversion) permet de dégager les conclusions suivantes :

a) *L'utilisation des indices de correction*, méthode complexe en soi, conduit à une expression inexacte des fréquences sectorielles. Pour ces raisons, nous l'écartons de la pratique opérationnelle (tableau IV).

b) *Le choix du seuil du 1/80* n'apporte que peu d'amélioration, simplicité d'application mise à part. Lorsqu'il s'agit d'exprimer les fréquences sectorielles, les résultats sont, en effet, significativement différents de ceux obtenus par la méthode de référence (tableaux V et IX).

c) *Le choix du seuil du 1/160* permet, quant à lui, une représentation satisfaisante de l'enzootie, tant sur le plan global que sur le plan sectoriel (17). C'est en tout cas la seule qui peut être valablement utilisée lorsqu'on ne dispose que d'une seule épreuve sérologique (tableaux VI et X).

d) *L'étude de la séroconversion* n'est pas supérieure aux méthodes précédentes dans l'expression des fréquences globales. Ses performances sont par contre excellentes dans l'analyse sectorielle d'un foyer (tableau VII).

Compte tenu des difficultés rencontrées dans la mise en application de la méthode directe, ces deux dernières solutions paraissent donc bien adaptées aux enquêtes épidémiologiques réalisées dans le foyer méditerranéen.

Bibliographie

- AMBROISE-THOMAS (P.), 1963. — L'immunofluorescence dans le diagnostic direct et indirect des parasitoses ; application à la toxoplasmose. *Thèse Doct. Méd.*, Lyon, 160 p. (ronéo).
- , GARIN (J.-P.) et RIGAUD (A.), 1966. — Amélioration de la technique d'immunofluorescence par l'emploi de contre-colorants. *Presse Méd.*, 74, 2215-2216.
- BRAY (R. S.), 1969. — Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. VI. Search for antigenic variation in single strains of *Leishmania* sp. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63, 378-382.
- et LAINSON (R.), 1965. — The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 59, 535-544.
- , —, 1966. — The immunology and serology of leishmaniasis. IV. Results of Ouchterlony double diffusion test. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60, 605-609.
- DEDET (J.-P.) et LANOTTE (G.), 1969. — Culture en masse de *Leishmania* pour la préparation d'antigènes. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 46, 69-81.
- DUXBURY (R. E.) et SADUN (E. H.), 1964. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 525-529.
- FALCHETTI (E.) et FAURE-BRAC (G.), 1932. — La leishmaniose canine à Nice. Etude épidémiologique. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 25, 1091-1099.
- GABRIAC (J.), 1963. — Réactions sérologiques dans l'étude des leishmanioses. *Thèse Doct. Méd.*, Montpellier, 74 p. (ronéo).
- GIAUFFRET (A.) et TALIERCIO (Y.-P.), 1971. — Mise en évidence d'anticorps sériques chez le chien atteint de leishmaniose, par une technique d'immunofluorescence indirecte. *Rec. Méd. Vét.*, 147, 141-151.

(17) En fait, la distribution bimodale des titres, caractéristique des zones hypoendémiques (E.-A. Migram et col., 1966 et I.-G. Kagan, 1973), situe ce seuil entre le 1/80 et le 1/160 (cf. fig. 6).

- KAGAN (I. G.), 1973. — Parasitic diseases, 13, 155-168. In : J.-R. Paul et C. White. *Serological Epidemiology*, Acad. Press., édit., 218 p.
- LE RAY (D.), AFCHAIN (D.), JADIN (J.), CAPRON (A.), YASAROL (S.), LANOTTE (G.) et FAMEREE (L.), 1973. — Diagnostic immuno-électrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de *Leishmania donovani*. Résultats préliminaires. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 53, 31-41.
- MAYRINK (W.), ARAUJO (F. G.) et MAGALHAES (P. A.), 1967. — Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. I. Sensitivity of the test. *Rev. Inst. Med. Trop.*, Sao Paulo, 9, 172-174.
- MILGRAM (E. A.), HEALY (G. R.) et KAGAN (I. G.), 1966. — Studies on the use of the indirect hemagglutination test in the diagnosis of Amebiasis. *Gastroenterology*, 50, 645-649.
- NERY-GUIMARAES (F.), LAGE (H. A.), VENANCIO (I. A.) et GRYNBERG (N. F.), 1969. — Estudo comparativo da reação indireta de anticorpos fluorescentes em doença de Chagas, leishmanioses tegumentares e calazar com varios antigenos de « *Leishmania* » e « *Trypanosoma* ». *O. Hospital*, 75, 1811-1825.
- NUSSENZWEIG (V.), NUSSENZWEIG (R. G.) et DE ALENCAR (J. E.), 1957. — Leishmaniose viscéral canina : reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo da tuberculose. *O. Hospital*, 51, 325-332.
- , —, —, 1957. — Leishmaniose viscéral canina nos arredores de Fortaleza, estado do Ceara : inquerito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo de tuberculose. Observações sobre o diagnostico e epidemiologia da doença. *O. Hospital*, 52, 111-129.
- ODDO (F. G.) et CASCIO (G.), 1963. — Il test di immuno-fluorescenza nelle leishmaniosi viscerale e cutanea. *Riv. Ist. Sieroter. Ital.*, 38, 139-145.
- QUILICI (M.), DUNAN (S.) et RANQUE (J.), 1968. — L'immunofluorescence dans les leishmanioses. Comparaison avec la réaction de fixation du complément. *Méd. Trop.*, 28, 37-43.
- RANQUE (J.), RANQUE (M.), CABASSU (J.) et CABASSU (H.), 1948. — Le diagnostic précoce de la leishmaniose canine par la ponction ganglionnaire. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 132, 339-340.
- RIoux (J.-A.) et GOLVAN (Y.-J.), avec CROSET (H.), TOUR (S.), HOUIN (R.), ABONNENC (E.), PETITDIDIER (M.), VOLLHARDT (Y.), DEDET (J.-P.), ALBARET (J.-L.), LANOTTE (G.) et QUILICI (M.), 1969. — Épidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. *Monographie I.N.S.E.R.M.*, n° 37, 220 p.
- , LANOTTE (G.), DEDET (J.-P.) et MARTINI-DUMAS (A.), 1970. — Utilisation du milieu « cœur-cerveau-sang de mouton » pour la culture en masse des formes promastigotes de Leishmanies. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 45, 381-384.
- ROUQUETTE (C.) et SCHWARTZ (D.), 1970. — Méthodes en épidémiologie. Flammarion, édit., Paris, 272 p.
- SHAW (J. J.) et VOLLER (A.), 1964. — The detection of circulating antibody to Kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58, 349-352.
- SOUTHWOOD (T. R.), 1966. — Ecological methods. *Methuen and Co. Ltd*, 391 p.

- TORREALBA (J. W.), TORREALBA (J. F.), TORREALBA (R. T.), MALPICA (N. Z.), RAMOS (I.) et HENRIQUEZ (C. E.), 1963. — Kala-azar canino en el estado guarico. Resultados de una encuesta en 1 105 perros, empleando la tecnica de reaccion de fijacion del complemento en sangre desecada, retirada con papel de filtro. Quince nuevos casos de Kala-azar canino comprobados parasitologicamente. *Fol. Clin. Biol.*, 32, 1-13.
- ZIPPIN (C.), 1956. — An evaluation of the removal method of estimating animal populations. *Biometrics*, 12, 63-89.
- , 1958. — The removal method of population estimation. *J. Wildl. Mgmt.*, 22, 82-90.
-