

P. Very ¹R. Bocquentin ¹G. Duvallet ¹

Sensibilité de la double microcentrifugation pour la recherche des trypanosomes

VERY (P.), BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (G.). Sensibilité de la double microcentrifugation pour la recherche des trypanosomes. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (3) : 325-329

Les auteurs ont testé au laboratoire et sur le terrain la technique de double microcentrifugation proposée par KRATZER et ONDIEK (1989) pour le diagnostic parasitologique des trypanosomoses. Les limites de détection trouvées ne sont pas aussi basses que celles indiquées par les auteurs initiaux mais montrent néanmoins une meilleure sensibilité que la simple microcentrifugation pour les trois espèces *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* et *T. vivax*. Facile à mettre en oeuvre sur le terrain, cette technique est recommandée, notamment pour des enquêtes épidémiologiques. Un protocole et une liste du matériel nécessaire sont indiqués. *Mots clés* : Trypanosomose - *Trypanosoma brucei* - *T. congolense* - *T. vivax* - Diagnostic - Double microcentrifugation.

INTRODUCTION

Le seul diagnostic de certitude pour les trypanosomoses est la mise en évidence du parasite dans un des liquides biologiques de l'hôte : sang, suc ganglionnaire ou liquide céphalo-rachidien notamment. Pour les examens sanguins, si l'on excepte l'inoculation à la souris, méthode surtout sensible pour *Trypanosoma brucei brucei* (8), les deux techniques les plus sensibles sont :

— la filtration sur mini-colonne de DEAE-cellulose (6), délicate, surtout employée pour le dépistage de cas de maladie du sommeil chez l'homme (5) ;

— la centrifugation différentielle en tubes capillaires (10). D'abord utilisée pour la détection des trypanosomes aviaires (1), puis adaptée au diagnostic de la trypanosomose humaine par WOO (11), elle a été adaptée par MURRAY *et al.* (7) au diagnostic des trypanosomoses animales. C'est sans doute, à l'heure actuelle, la plus employée, donnant à la fois la valeur de l'hématocrite et permettant un examen parasitolo-

gique plus sensible que le simple état frais ou la goutte épaisse (8).

Dans une précédente expérimentation (3), en examinant l'interface plasma-cellules en contraste de phase entre lames et lamelles après centrifugation en tubes capillaires (7), le seuil de détection de *T. congolense* chez les bovins a été situé à environ 10³ trypanosomes par millilitre.

Pour augmenter ce seuil de détection, suite aux travaux de BOCQUENTIN sur *T. b. evansi* (2) et de VAN MEIRVENNE et AERTS sur *T. brucei* (9), une méthode de lyse des globules rouges par un détergent suivie d'une centrifugation (3) a été proposée. Donnant de bons résultats au laboratoire, cette technique est difficile à mettre en oeuvre sur le terrain.

KRATZER et ONDIEK (4) ont proposé, au même moment, une technique très simple de double centrifugation de l'interface plasma-cellules.

La présente étude rapporte les résultats obtenus avec cette dernière technique, dénommée double microcentrifugation, au laboratoire et sur le terrain, en précisant les seuils de sensibilité pour *T. congolense*, *T. brucei* et *T. vivax*. La technique classique de MURRAY *et al.* (7), réalisée en comparaison, sera dénommée par la suite simple microcentrifugation.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Souches de trypanosomes

Les trois souches suivantes ont été utilisées pour l'étude au laboratoire :

— *T. congolense* Karankasso/83/CRTA/57, isolée sur zébu dans la région de Bobo-Dioulasso ;

— *T. vivax* Banan/87/CRTA/107, isolée sur zébu à la ferme du CRTA à Banankélédaya, et qui se développe bien sur la souris ;

— *T. brucei* Gaoua/89/CRTA/262, isolée sur taurin Baoulé dans la région de Gaoua.

¹. Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

Reçu le 5.3.1990, accepté le 24.4.1990.

P. Very R. Bocquentin G. Duvallet

Bovins

Pour une étude expérimentale *in vivo*, dix taurins Baoulé ont été infectés par transmission mécanique à la seringue avec la souche Karankasso. Les prélèvements sanguins à la jugulaire sur tubes héparinés ont été répétés tous les trois jours.

Le travail sur le terrain a consisté, lors d'une enquête épidémiologique en pays Lobi (Burkina Faso), à effectuer 188 prélèvements sanguins à la jugulaire sur le cheptel bovin de cette région.

Préparation des suspensions de trypanosomes

Le sang prélevé à l'acmé de la parasitémie chez les souris par ponction intracardiaque est incubé 10 min à la température ambiante en présence de 10 p. 100 de phytohémagglutinine (PHA). Après centrifugation (10 min à 100 g), les trypanosomes contenus dans le surnageant sont dénombrés en cellules de Neubauer. Une gamme de 9 dilutions comprises entre 33 et 10⁶ parasites par millilitre de sang est obtenue en ajoutant des trypanosomes à 5 ml de sang d'un bovin non parasité et ne contenant pas d'anticorps anti-trypanosomes.

Technique de double microcentrifugation

Il faut, pour la réaliser, centrifuger 1,5 ml de sang dans des tubes Eppendorf à 12 500 tours par minute pendant 3 min au moins. L'interface globules rouges-plasma ainsi obtenu est alors aspiré dans des tubes capillaires puis centrifugé également à 12 500 t/min pendant 3 min. L'examen microscopique du nouvel interface se fait entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase selon la technique décrite par MURRAY *et al.* (7). Le protocole de la technique de double microcentrifugation est donné en annexe 1.

Annexe 1 : Protocole de la double microcentrifugation adapté de KRATZER et ONDIEK (4).

I. PROTOCOLE DOUBLE MICROCENTRIFUGATION adapté de KRATZER et ONDIEK (4).	
* Prélèvement sang jugulaire sur tube hépariné	
* 1ère centrifugation	1,5 ml en tube Eppendorf 12500 tpm / 3 mn
* Aspiration interface cellules/plasma dans 1 tube microhématocrite	
* 2ème centrifugation	microhématocrite 12500 tpm / 3 mn
* Section tube microhématocrite	
* Expression sur lame de l'interface cellules/plasma	
* Examen au microscope à contraste de phase ou à fond noir (oculaire x10, objectif x25)	

RÉSULTATS

Détermination des seuils de détection

Pour chaque souche de trypanosomes, les résultats sont rapportés sur les figures 1 à 3. Chaque figure représente la moyenne de 7 répétitions et indique les résultats obtenus pour la double microcentrifugation en comparaison avec la simple microcentrifugation (MC).

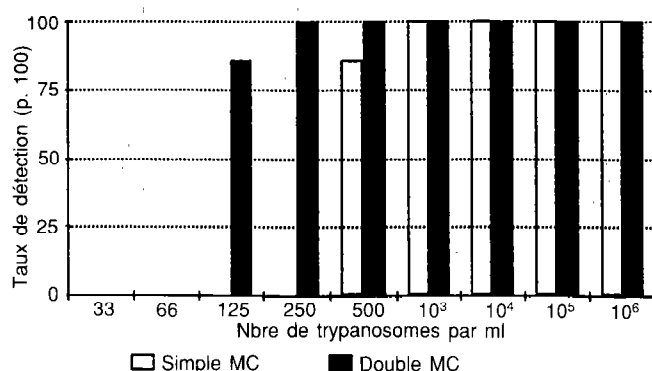


Fig. 1 : Sensibilité comparée de la simple et de la double microcentrifugation (MC) pour Trypanosoma brucei. Les taux de détection indiqués sont, pour chaque concentration de parasites, la moyenne de 7 gammes de dilution.

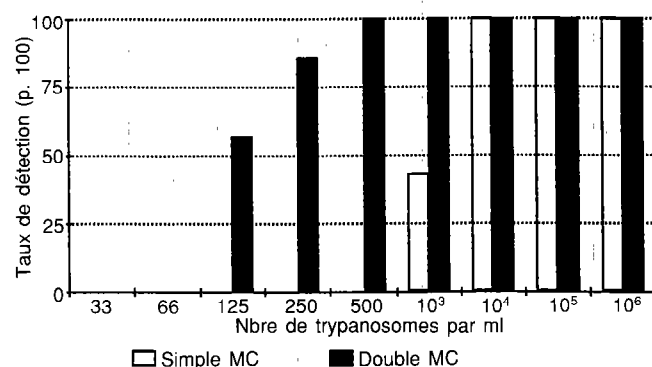


Fig. 2 : Sensibilité comparée de la simple et de la double microcentrifugation (MC) pour Trypanosoma congolense.

Pour *T. brucei*, la simple MC détecte 100 p. 100 des parasitémies à 10³ parasites par ml et 85,7 p. 100 des parasitémies à 500 parasites par ml, mais elle ne détecte plus de parasitémies positives pour des concentrations inférieures.

En revanche, la double MC détecte 100 p. 100 des parasitémies positives jusqu'à une concentration de

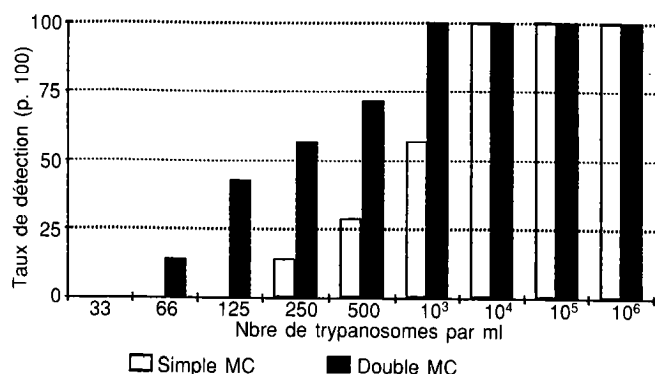


Fig. 3 : Sensibilité comparée de la simple et de la double microcentrifugation (MC) pour Trypanosoma vivax.

250 parasites par ml. A 125 parasites par ml, 85,7 p. 100 des parasitémies sont encore détectés.

Pour *T. congolense*, simple et double MC sont légèrement moins sensibles que pour *T. brucei*. Mais à 500 parasites par ml, la double MC détecte 100 p. 100 des parasitémies alors que la simple MC n'en détecte aucune. A 125 parasites par ml, la double MC détecte encore 57,1 p. 100 des parasitémies.

Pour *T. vivax*, à 10³ parasites par ml, simple et double MC détectent respectivement 57,1 p. 100 et 100 p. 100 des parasitémies. Ensuite, la sensibilité décroît régulièrement. A 66 parasites par ml, la double MC a détecté une parasitémie sur sept (14,3 p. 100) alors que dès 125 parasites par ml, la simple MC ne détecte plus de parasitémies positives.

Le tableau I indique, pour chaque espèce de trypanosome, la concentration de parasites donnant 100 ou 50 p. 100 de détection par simple ou double centrifugation.

TABLEAU I Nombre de parasites par ml nécessaires pour détecter 100 ou 50 p. 100 des parasitémies par simple (sMC) ou double (dMC) microcentrifugation.

	100 p. 100		50 p. 100	
	sMC	dMC	sMC	dMC
<i>T. brucei</i>	10 ³	250	500	125
<i>T. congolense</i>	10 ⁴	500	10 ⁴	125
<i>T. vivax</i>	10 ⁴	10 ³	10 ³	250

Infection expérimentale

A l'occasion du suivi parasitologique de 10 taurins Baoulé infectés par *T. congolense*, 300 prélèvements ont été trouvés positifs avec la répartition suivante : sMC seule : 3 ; dMC seule : 17 ; sMC + dMC : 280

Enquête épidémiologique

Lors d'une enquête en pays Lobi (Burkina Faso), dix-huit troupeaux ou groupements d'animaux ont été visités et 188 prélèvements effectués. Les examens parasitologiques, simple et double microcentrifugations, ont été réalisés sur le terrain moins de 3 heures après le prélèvement, les échantillons étant gardés au frais en glacière. Il a été trouvé 62 parasitémies positives (tabl. II).

TABLEAU II Résultats des examens parasitologiques.

	sMC seule	dMC seule	sMC + dMC	Total
<i>T. vivax</i>	0	2	5	7
<i>T. congolense</i>	1	1	1	3
<i>T. brucei</i>	0	1	0	1
<i>T. theileri</i>	17	23	11	51
Total	18	27	17	62

Si l'on ne considère que les trypanosomes pathogènes (*T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei*), on constate que la sMC détecte 7 parasitémies alors que la dMC en détecte 10 sur 11 positives.

DISCUSSION

Le diagnostic parasitologique des trypanosomes chez les animaux domestiques est difficile en raison de la rareté des parasites et des fluctuations des parasitémies. Aussi est-on à la recherche d'un test le plus sensible possible tout en restant facile à réaliser sur le terrain et peu coûteux.

Le test le plus utilisé au laboratoire et sur le terrain est la simple microcentrifugation avec examen en contraste de phase ou fond noir de l'interface cellules-plasma d'un tube microhématocrite centrifugé proposé par MURRAY *et al.* (7). Ils précisent que les trypanosomes peuvent être détectés à une concentra-

P. Very R. Bocquentin G. Duvallet

tion comprise entre 10^2 et 10^3 parasites par ml. Outre le petit matériel usuel, cette technique nécessite une centrifugeuse à microhématocrite et un microscope équipé pour l'examen en fond noir ou contraste de phase (annexe 2).

Annexe 2 : Matériel nécessaire.

II. MATERIEL NECESSAIRE :
Tubes à prélèvements héparinés (type Vacutainer)
Aiguilles à prélèvements
Tubes Eppendorf 1,5 ml
Tubes microhématocrites et plasticine
Centrifugeuse microhématocrite / tubes Eppendorf
Microscope équipé en fond noir (moins onéreux) ou en contraste de phase
Lames, lamelles, pointe diamant pour couper les microtubes

KRATZER et ONDIEK (4) ont proposé une amélioration de ce test en réalisant une double centrifugation. D'abord centrifugation d'un volume de 1,5 ml en tube Eppendorf puis, après récupération (phase critique) de l'interface cellules-plasma en tube microhématocrite, centrifugation de ce dernier et examen comme dans le test précédent.

Certaines centrifugeuses* permettent d'effectuer la manipulation, sur un même plateau, des tubes hématocrites et des tubes Eppendorf. Cette technique ne demande donc pas plus de matériel que la simple microcentrifugation.

La nécessité de disposer d'un volume de 1,5 ml de sang oblige à prélever à la jugulaire et non à l'oreille. Cependant, ce type de prélèvement est couramment réalisé pour disposer de sérum ou de plasma, et les tubes hématocrites peuvent être remplis à partir du sang prélevé. La charge de travail n'est donc pas augmentée, de même que le matériel s'il est bien choisi.

KRATZER et ONDIEK (4) indiquent comme limites de détection : 15 parasites par ml pour *T. congolense* et

VERY (P.), BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (G.). Sensitivity of double microcentrifugation for parasitological diagnosis of trypanosomes. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (3) : 325-329

The double microcentrifugation technique, described by KRATZER and ONDIEK (1989) for the parasitological diagnosis of trypanosomes, has been tested both in the laboratory and in the field. The limits of detection obtained here were not as low as those described in the original experiment, but the sensitivity of this technique for the detection of *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* and *T. vivax* was better than the phase contrast buffy coat method. This technique, which is easy to apply in the field, is highly recommended, especially for epidemiological surveys. A protocol and a list of equipment are included. *Key words* : Trypanosomosis - *Trypanosoma brucei* - *T. congolense* - *T. vivax* - Diagnosis - Double microcentrifugation.

* Hawksley and Sons Ltd., Marlborough Road, Lancing, W. Sussex, BN15 8TN, England. Modèle MCH (Micro Haematocrit Centrifuge) avec Combination Rotor.

T. vivax et 20 parasites par ml pour *T. brucei* et *T. evansi*.

Les présents résultats ne montrent pas de limites aussi basses mais indiquent néanmoins que le gain en sensibilité par rapport aux autres méthodes est important. Pour l'ensemble des trypanosomes testés au laboratoire (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*), la simple microcentrifugation détecte 4,8 p. 100 des parasitémies (1 sur 21) à 250 parasites par ml et seulement 23,8 p. 100 des parasitémies à 500 parasites par ml. La double microcentrifugation détecte 4,8 p. 100 des parasitémies (1 sur 21) à 66 parasites par ml et 61,9 p. 100 des parasitémies à 125 parasites par ml.

Son utilisation lors d'une infection expérimentale et à l'occasion d'une enquête épidémiologique sur le terrain a permis de trouver des parasitémies positives non détectées par la simple microcentrifugation.

CONCLUSION

La technique de double microcentrifugation proposée par KRATZER et ONDIEK (4) a été testée en laboratoire et sur le terrain en vue d'établir le diagnostic parasitologique des trypanosomes.

Avec un équipement similaire à la simple microcentrifugation, le gain en sensibilité est important. Cette technique est donc fortement recommandée, en particulier lors d'enquêtes épidémiologiques sur le terrain.

REMERCIEMENTS

Nous remercions toute l'équipe du CRTA qui nous a aidés sur le terrain lors de l'enquête épidémiologique, le Dr P.H. CLAUSEN pour la lecture du manuscrit et le Dr R. GIDEL, directeur du CRTA, pour la lecture du manuscrit et l'autorisation de publication.

VERY (P.), BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (G.). Sensibilidad de la doble microcentrifugación para la búsqueda de tripanosomas. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (3) : 325-329

Los autores comprobaron en laboratorio y sobre terreno la técnica de doble microcentrifugación propuesta por KRATZER y ONDIEK (1989) para el diagnóstico parasitológico de los tripanosomas. No son tan bajos los límites de detección encontrados como los indicados por los autores iniciales sino muestran sin embargo una mejor sensibilidad que al simple microcentrifugación para las tres especies : *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* y *T. vivax*. Se aconseja dicha técnica, fácil de utilización sobre terreno, en particular para encuestas epidemiológicas. Se indican el modo de empleo y una lista del material necesario. *Palabras claves* : Tripanosomosis - *Trypanosoma brucei* - *T. congolense* - *T. vivax* - Diagnóstico - Doble microcentrifugación.

BIBLIOGRAPHIE

1. BENNETT (G.F.). The haematocrit centrifuge technique for the laboratory diagnosis of Hematozoa. *Can. J. Zool.*, 1962, **40** : 124-125.
2. BOCQUENTIN (R.). Contribution à l'étude d'une souche de *Trypanosoma brucei evansi*. Mém. DEA, Univ. Bordeaux-II, 1988. 30 p.
3. BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (G.), BALTZ (T.). Une méthode très sensible de détection des trypanosomes : lyse avec détergent-centrifugation. In : 20e réunion CSIRTC, Mombasa, Kenya, 10-14 avril 1989.
4. KRATZER (R.D.), ONDIEK (F.O.). The buffy coat double centrifugation technique, an improved method for the diagnosis of African trypanosomiasis. In : 20e réunion CSIRTC, Mombasa, Kenya, 10-14 avril 1989.
5. LUMSDEN (W.H.R.), KIMBER (C.D.), DUKES (P.), HALLER (L.), STANGHELLINI (A.), DUVALLET (G.). Field diagnosis of sleeping sickness in the Ivory Coast. I. Comparison of the miniature anion-exchange centrifugation technique with other protozoological methods. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1981, **75** : 242-250.
6. LUMSDEN (W.H.R.), KIMBER (C.D.), EVANS (D.A.), DOIG (S.J.). *Trypanosoma brucei* : miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias : adaptation for field use. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1979, **73** : 312-317.
7. MURRAY (M.), MURRAY (P.K.), McINTYRE (W.I.M.). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1977, **71** : 325-326.
8. PARIS (J.), MURRAY (M.), McODIMBA (F.). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta trop.*, 1982, **39** : 307-316.
9. VAN MEIRVENNE (N.), AERTS (D.). Use of SDS for detection of trypanosomes in haemolyzed blood samples. In : Workshop on modelling sleeping sickness epidemiology and control, OMS, Antwerp, Belgium, 25-29 January 1988.
10. WOO (P.T.K.). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta trop.*, 1970, **27** : 384-386.
11. WOO (P.T.K.). Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. *Acta trop.*, 1971, **28** : 298-303.