

ÉTUDE EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE  
DE 200 CAS DE TRYPANOSOMIASE  
A *TRYPANOSOMA GAMBIENSE*

Par JEAN-LOUIS FREZIL (\*) et JOSEPH COULM (\*\*) (\*\*\*)

30 JAN. 1996

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 43755

Cote : B ex 1.

I. — INTRODUCTION

Depuis 1973, l'immunofluorescence indirecte est utilisée en République Populaire du Congo pour la lutte contre la Trypanosomiase humaine.

Nous avons déjà montré (FREZIL *et al.*, 1974, 1975, 1976) que cette technique est extrêmement précieuse dans le dépistage de masse et individuel.

La présente note analyse les résultats des examens des sérums et LCR de tous les malades que nous avons pu suivre à Brazzaville.

II. — ÉTUDE DES SÉRUMS

Les études sérologiques, en immunofluorescence indirecte, de la Trypanosomiase humaine africaine sont peu nombreuses. Elles se rapportent, pour la plupart, à des expérimentations de laboratoire effectuées sur un nombre limité d'échantillons (COURTOIS et BIDEAU, 1966 ; BAILEY *et al.*, 1967 ; LUCASSE, 1970).

Un remarquable progrès en ce domaine a cependant été apporté par WERY *et al.* (1973), qui ont travaillé sur 403 sérums de trypanosomés, testés en IFI avec *T. b. brucei* comme antigène.

Étant donné la rareté des travaux sur ce sujet, il nous semble intéressant de comparer nos résultats avec ceux de nos prédécesseurs.

II.1. — Matériel et méthodes.

La technique de préparation des tests, dont les détails figurent dans une note précédente (FREZIL *et al.*, 1974), est adaptée de celle de WERY *et al.*, 1970.

Les seules modifications concernent :

— l'antigène : nous utilisons une souche congolaise de *Trypanosoma gambiense*,

(\*) Maître de Recherches à l'O. R. S. T. O. M., Brazzaville.

(\*\*) Médecin en Chef du Service de Santé des Armées. Division Technique du Service de l'Épidémiologie et des grandes Endémies de la République Populaire du Congo.

(\*\*\*) Séance du 13 avril 1977.

Cette étude bénéficie d'un appui financier de l'O. M. S.

— le sérum fluorescent : l'immunsérum de l'Institut Pasteur est dilué au 1/200.

Dès leur isolement, les sérums des malades sont placés au congélateur ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) et testés, au plus tard, 1 semaine après le prélèvement.

Les dilutions habituellement utilisées sont les suivantes : 1/20, 1/40, 1/80 et 1/160.

Le titre du sérum correspond à la première dilution présentant une fluorescence douteuse, notée : ++.

Ainsi, dans nos tableaux, « ++ 1/80 » doit se lire : positif jusqu'au 1/80°.

## II.2. — Résultats.

Le tableau I donne les résultats obtenus sur 200 sérums de trypanosomés avant traitement.

TABLEAU I  
Étude des sérums en IFI.

	État du L.C.R.	Nombre d'examen	Résultats				
			Négatif	++ 1/20	++ 1/40	++ 1/80 et au-dessus	
I <sup>re</sup> période	0-3 cellules par mm <sup>3</sup>	56	0	2 (3,5 0/0)	11 (19,6 0/0)	14 (19,6 0/0)	32 (57,1 0/0)
	albumine jusqu'à 0 g. 22 fl.	86	0	2 (2,3 0/0)	18 (20,6 0/0)	16 (18,6 0/0)	50 (58,1 0/0)
II <sup>e</sup> période	4-20	62	0		12 (19,3 0/0)	17 (27,4 0/0)	33 (53,2 0/0)
	jusqu'à 0,40	69	0		17 (24,6 0/0)	20 (28,9 0/0)	32 (46,3 0/0)
	21-100	27	0		9 (33,3 0/0)	7 (25,9 0/0)	11 (40,7 0/0)
	jusqu'à 0,71	26	0		5 (17,8 0/0)	15 (53,5 0/0)	8 (28,5 0/0)
	+ de 100	55	0		11 (20,0 0/0)	25 (45,4 0/0)	19 (34,5 0/0)
	plus de 0,71	17	0		4 (23,5 0/0)	8 (47,0 0/0)	5 (29,4 0/0)
Total	200						

Les titres des sérums sont donnés en fonction de l'altération du L.C.R.

Les différentes étapes de cette altération correspondent à la classification des fiches mécanographiques de l'OCEAC.

Étant donné qu'il existe des dissociations albuminocytologiques du L.C.R. parfois importantes, les résultats sont donnés séparément en fonction de la

cytologie et de l'albuminorachie. En effet, ces dissociations peuvent être gênantes pour l'estimation du passage de 1<sup>re</sup> en 2<sup>e</sup> période, surtout dans les cas-limites (ex. : 0 g. 18 d'albumine et 5 cellules).

Notre échantillon ne comprend que 50 trypanosomés effectivement en 1<sup>re</sup> période (— de 4 cellules et — de 0 g. 22/l. d'albumine), car :

— parmi les 56 examens du groupe 0-3 cellules, 6 ont plus de 0 g. 22/l. d'albumine,

— parmi les 86 examens du groupe « albuminorachie normale », 36 ont une cytologie élevée.

En fait, ces dissociations ont peu d'influence sur le résultat des tests en IFI, puisque les pourcentages des deux séries de valeurs correspondant à la 1<sup>re</sup> période sont tout à fait comparables.

L'examen du tableau montre que, sur 200 examens :

— 99 0/0 des sérums ont une positivité supérieure ou égale au 1/40,

— les fortes positivités (1/160 et au-dessus) sont surtout enregistrées en 1<sup>re</sup> période et leur proportion diminue en fonction de l'altération du LCR, comme le montre l'histogramme A ci-dessous.

Cette deuxième observation confirme celles de nos prédécesseurs qui ont même obtenu des sérums de 2<sup>e</sup> période parfaitement négatifs.

Selon LUCASSE (1970), les plus fortes réactions sont observées dans les premiers stades de la maladie lorsque les trypanosomes sont dans le sang

Il ne nous semble cependant pas que la parasitémie décelable ait une influence sur le degré de fluorescence. En effet, les titres sont très souvent élevés chez des malades asymptomatiques où la mise en évidence du parasite est particulièrement difficile.

Nous préférons donc admettre que l'organisme du malade, qui est de plus en plus affaibli, produit de moins en moins d'anticorps ; ce qui rejoint l'opinion de WERY *et al.* (1973).

### III. — ÉTUDE DES LIQUIDES CÉPHALO-RACHIDIENS

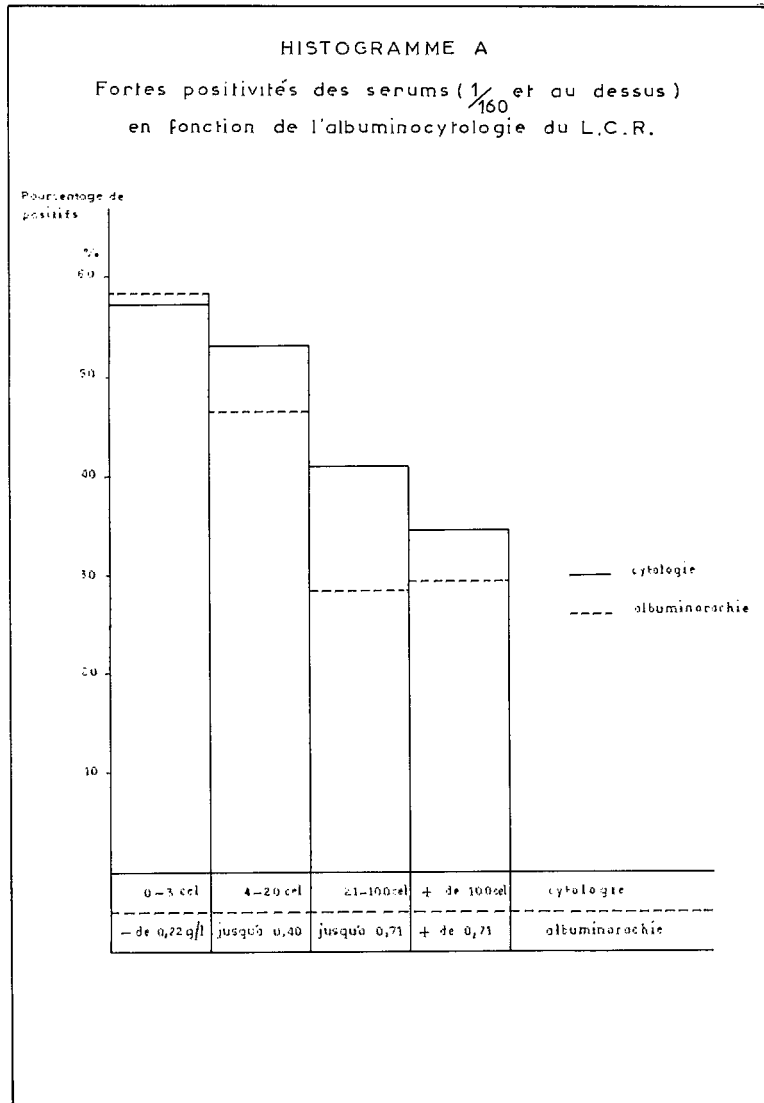
La plupart des recherches sur l'immunofluorescence indirecte dans la trypanosomiase ont été orientées vers la mise au point d'une méthode de dépistage. De ce fait, presque toutes ces études sont de nature sérologique.

À notre connaissance, les seuls travaux effectués sur les LCR sont ceux de LUCASSE (1964), puis de COURTOIS et BIDEAU (1966), qui ont respectivement testé en IFI les produits biologiques de 24 et 27 sommeilleux.

Nos résultats portent sur l'examen de 195 LCR de trypanosomés avant traitement.

#### III.1. — Matériel et méthodes.

Le LCR est prélevé au moment de l'évaluation albuminocytologique. Il est immédiatement placé au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  et testé dans la semaine qui suit.



Dans la réaction d'immunofluorescence, les LCR sont utilisés à l'état pur. La lecture est assez différente de celle des sérums : en effet, à l'opposé de ces derniers, les trypanosomes sont parfaitement confondus avec le fond très sombre dans un LCR négatif.

Par contre, dans les cas positifs, on peut observer des brillances aussi intenses qu'avec les sérums.

Le code de lecture est le suivant :

— = négatif,

+ = trypanosomes nettement détachés du fond, sans fluorescence,

++ = fluorescence faible, mais nette,  
+++ = forte fluorescence.

### III.2. — Résultats.

Précisons tout d'abord que 109 LCR de malades à la recherche d'un diagnostic, finalement autre que la trypanosomiase, ont été testés : tous se sont avérés parfaitement négatifs (—).

Le tableau II présente les résultats obtenus avec 195 LCR correspondant aux sérums déjà étudiés.

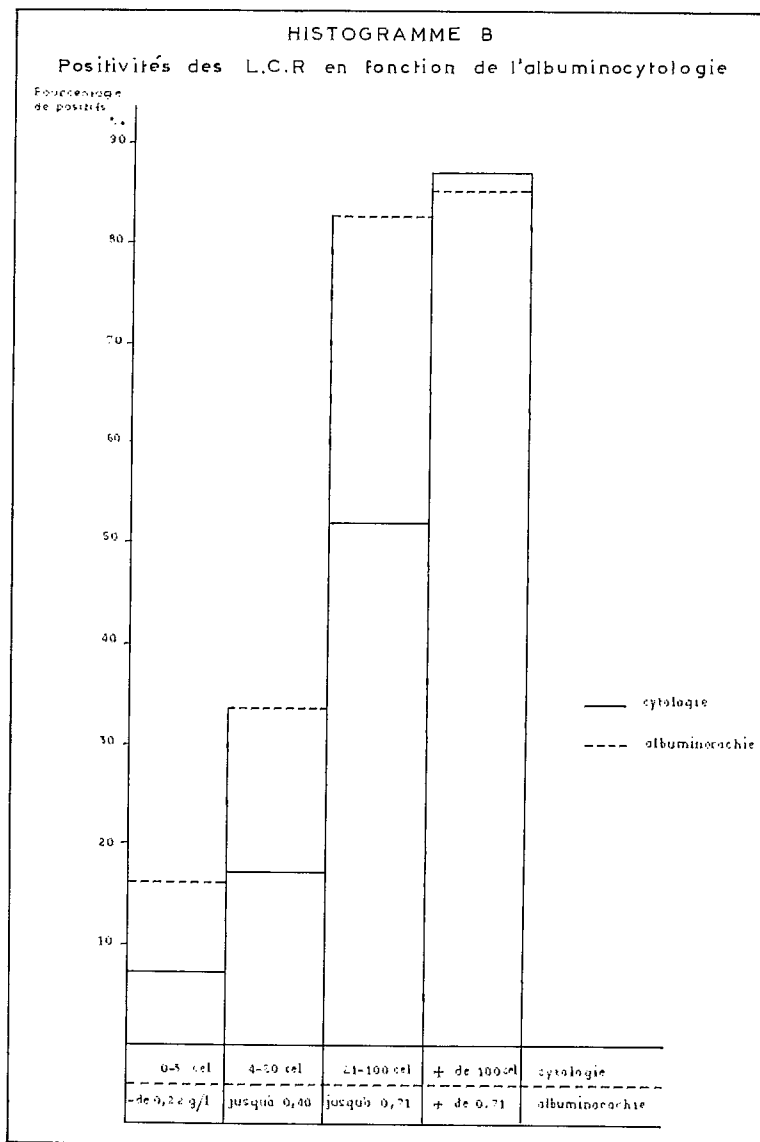
Le nombre d'examens n'est pas rigoureusement identique à celui des sérums car il faut compter avec les difficultés de prélèvement (ponction « blanche » ou sanglante) et quelques maladroites du manipulateur.

Bien que nous soyons persuadés qu'un résultat simplement « + » traduise déjà une atteinte du LCR, nous estimerons, pour la lecture du tableau, que seuls les tests ++ et +++ sont positifs.

Le tableau montre de façon très nette que le degré de fluorescence du LCR augmente en fonction de son altération et l'histogramme B ci-dessous est parfaitement significatif à cet égard.

TABLEAU II  
*Examen des LCR en IFI.*

	État du L C R	Nombre d'examens	Résultats				Total des positifs (+ + et + + +)
			Négatif	+	++	+++	
I <sup>re</sup> période	0-3 cellules	52	42 (80,7 0/0)	6 (11,5 0/0)	0 (0 0/0)	4 (7,6 0/0)	4 (7,6 0/0)
	Albumine jusqu'à 0 g. 22 /l.	87	60 (68,9 0/0)	13 (14,9 0/0)	6 (6,9 0/0)	8 (9,2 0/0)	14 (16,1 0/0)
II <sup>e</sup> période	4-20	59	33 (55,9 0/0)	16 (27,1 0/0)	6 (10,1 0/0)	4 (6,7 0/0)	10 (16,9 0/0)
	jusqu'à 0,10	65	24 (36,9 0/0)	19 (29,2 0/0)	9 (13,8 0/0)	13 (20,0 0/0)	22 (33,8 0/0)
	21-100	25	5 (20,0 0/0)	7 (28,0 0/0)	5 (20,0 0/0)	8 (32,0 0/0)	13 (52,0 0/0)
	jusqu'à 0,71	29	1 (3,4 0/0)	4 (13,8 0/0)	9 (31,0 0/0)	15 (51,7 0/0)	24 (82,7 0/0)
	+ de 100	54	1 (1,8 0/0)	6 (11,1 0/0)	12 (22,2 0/0)	35 (64,8 0/0)	47 (87,0 0/0)
	+ de 0,71	14		2 (14,2 0/0)		12 (85,7 0/0)	12 (85,7 0/0)
	Total	190					
	195						



Toutefois, dans la « 1<sup>re</sup> période », 7,6 0/0 ou 16,1 0/0 des tests sont positifs avec une cytologie ou une albuminorachie normale. En fait, sur les 14 cas correspondant à ces positifs, 7 ont une dissociation albuminocytologique avec albumine normale et cytologie élevée qui les classe en 2<sup>e</sup> période.

Les 7 autres sont effectivement en 1<sup>re</sup> période « classique ».

Comme on l'a vu dans l'étude sérologique, 50 examens seulement correspondent à d'authentiques 1<sup>res</sup> périodes.

Done, 14 0/0 des malades en 1<sup>re</sup> période présentent un LCR positif en immunofluorescence.

Pour nous, cette positivité témoigne de façon certaine du passage du parasite dans les centres nerveux et nous considérons ces malades en 2<sup>e</sup> période.

Cette observation rejoint celle de BURKE *et al.* (com. pers.) qui ont noté, au Zaïre, la présence de trypanosomes dans des LCR non altérés du point de vue cytochimique.

BERTRAND *et al.* (1973) pensent qu'il n'existe pas en fait deux périodes séparées dans la trypanosomiase et que, dès le début, la maladie intéresse l'organisme en entier. Nous pensons plutôt que les perturbations cytochimiques du LCR ne sont pas un indice précoce du passage en 2<sup>e</sup> période.

Le fait que le pourcentage des LCR positifs augmente en fonction de leur altération n'est pas une règle absolue.

En effet, nous trouvons 7 cas négatifs avec plus de 100 cellules ou plus de 0 g. 71/l. d'albumine.

Cette absence de réaction est d'autant plus troublante que le trypanosome a été trouvé dans 4 des sept liquides.

Donc, environ 13 0/0 de malades en 2<sup>e</sup> période avancée peuvent être négatifs en IFI dans le LCR.

D'après LUCASSE (1964), tous les malades avec plus de 30 g./l. de protéines montrent une fluorescence brillante du LCR tandis que les premières périodes restent négatives. COURTOIS et BIDEAU (1966) rapportent des observations analogues.

Cependant, le premier trouve un cas de 1<sup>re</sup> période avec une faible fluorescence et les seconds deux cas négatifs en 2<sup>e</sup> période.

Cette observation confirme la nôtre, mais la négativité des LCR altérés reste énigmatique. On serait tenté d'attribuer cette carence d'anticorps à la faiblesse de l'organisme malade ; mais, la sérologie de ces cas étant « normalement » positive, cette hypothèse est difficile à soutenir.

#### IV. — ÉTUDE DES RECHUTES

Le tableau III donne les résultats observés sur 21 cas de rechutes.

TABLEAU III

*Étude des rechutes en IFI.*

	Sérum					LCR				Total
	—	1/20	1/40	1/80	1/160	—	+	++	+++	
Rechutes confirmées T+ . . .		3	5	2	2		1	1	10	12
Rechutes cliniques et biologiques (altération du LCR) . . . .		2	2	3	2			1	8	9
Total . . . .		5	7	5	4		1	2	18	21

Nous entendons par rechutes cliniques et biologiques les malades dont l'état général se dégrade progressivement, avec persistance ou aggravation des altérations du LCR sans que le trypanosome puisse être décelé.

Dans la grande majorité des cas (18 sur 21), le LCR est très positif. On peut toutefois observer 2 cas faiblement positifs et un cas négatif.

Par contre, les positivités du sérum sont pour la plupart faibles ou même douteuses (5 fois sur 21).

Ces faibles positivités sont peut-être liées à l'élimination des trypanosomes du sang par les traitements répétés.

Le malade en rechute T+ avec un IFI négatif dans le LCR présente également une fluorescence ++ 20 dans le sérum. Il faut évoquer une carence de production des anticorps dans un organisme très affaibli pour tenter d'expliquer ce cas.

#### COMMENTAIRE

L'étude sérologique prouve, une fois de plus, la spécificité de l'immunofluorescence indirecte puisque 99 0/0 des sérums sont nettement positifs.

Les titres les plus élevés étant enregistrés en 1<sup>re</sup> période, cette technique apparaît particulièrement fiable comme moyen de dépistage car c'est à ce stade que la maladie est le plus souvent difficile à diagnostiquer.

Le fait que 14 0/0 des LCR de 1<sup>re</sup> période soient positifs en IFI présente un grand intérêt sur le plan de la thérapeutique.

En effet, les trypanosomés sont classiquement traités selon le protocole de NEUJEAN, en fonction de l'état du LCR. Par crainte de la toxicité des arsenicaux, de nombreux traitements sont encore effectués à la pentamidine sur les malades en 1<sup>re</sup> période.

Si l'on admet que le trypanosome puisse franchir la barrière nerveuse sans provoquer l'apparition de perturbations cytochimiques, tout au moins dans un premier temps, ce protocole doit être définitivement abandonné.

Cette tactique est d'ailleurs appliquée depuis 3 ans en République Populaire du Congo, où, par crainte de voir apparaître des souches résistantes, tous les trypanosomés reçoivent au moins 2 séries de 3 injections d'Arsobal®.

L'immunofluorescence indirecte donne également d'excellents résultats dans l'étude des rechutes. En effet, les LCR produisent, dans la presque totalité des cas, une réaction de forte intensité.

On peut donc envisager cette technique comme moyen de surveillance des trypanosomés traités, mais ceci fera l'objet d'une prochaine note.

#### RÉSUMÉ

Les auteurs étudient en immunofluorescence indirecte les sérums et LCR de 200 trypanosomés avant traitement.

Ils constatent que :

— le pourcentage des sérums fortement positifs est très important en 1<sup>re</sup> période et décroît progressivement avec l'altération du LCR ;



— 14 0/0 des LCR de 1<sup>re</sup> période présentent une fluorescence qui traduit certainement le passage du parasite dans ce milieu.

Cette 2<sup>e</sup> observation les conduit à remettre en question la définition de la périodicité et le protocole de traitement de la Maladie du Sommeil.

#### SUMMARY

The sera and CSF collected on 200 patients suffering from sleeping sickness were collected before treatment and tested with fluorescent antibody test.

The proportion of strongly positive sera is very important in the first period and decreases progressively with the alteration of CSF. This shows the reliability of the FAT technique as a screening method because it is in the first period that it is difficult to diagnose the disease.

14 0/0 of CSF collected during the 1st period are positive with FAT: this fluorescence certainly reflects the presence of the parasite and confirms BURKE *et al.* observations.

The notion of periodicity can be questioned as well as the treatment protocol which is traditionally based on the CSF cytochemistry.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BAILEY (N. M.), KIMBER (C. D.) et CUNNINGHAM (M. P.). — The indirect fluorescent antibody technique applied to dried blood samples in the diagnosis of human trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1967, 61 (5), 696-700.
- BERTRAND (E.), SERIE (F.), KONE (I.), RIVE (J.), COMPAORE (L.), SENTILHES (L.) et PHILIPPE (J.). — Symptomatologie générale de la trypanosomiase humaine africaine au moment du dépistage. *Méd. Afrique Noire*, 1973, 20 (4), 303-314.
- COURTOIS (D.) et BIDEAU (J.). — L'immunofluorescence appliquée au diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. Valeur comparative avec le titrage de l'immunoglobuline IgM. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1966, 59 (5), 809-817.
- FREZIL (J. L.), CARRIE (J.) et RIO (F.). — Application et valeur de la technique d'immunofluorescence indirecte au dépistage et à la surveillance épidémiologique de la trypanosomiase à *Trypanosoma gambiense*. *Cahiers O. R. S. T. O. M. Sér. Méd. Para.*, 1974, XII (2), 111-126.
- FREZIL (J. L.) et COULM (J.). — Apport de l'immunofluorescence indirecte dans le dépistage et le contrôle de la trypanosomiase à *Trypanosoma gambiense*. Rapp. final 10<sup>e</sup> Conf. Techn. O. C. E. A. C., Yaoundé, avril 1975, 160-173.
- FREZIL (J. L.) et COULM (J.). — Étude épidémiologique du foyer réurgent de Comba. Rapp. final. 11<sup>e</sup> Conf. Techn. O. C. E. A. C., Yaoundé, 25-27 mars 1976, 218-227.
- FREZIL (J. L.) et COULM (J.). — Conception actuelle de la stratégie antisommeilleuse en République Populaire du Congo. Colloque international sur la trypanosomiase humaine africaine. Anvers, décembre 1976 (*sous presse*).
- FREZIL (J. L.), COULM (J.) et ALARY (J.). — L'immunofluorescence indirecte et la stratégie de lutte contre la trypanosomiase humaine en Afrique centrale (*sous presse*), 1976.

- LUCASSE (C.). — Fluorescent antibody test as applied to cerebrospinal fluid in human sleeping sickness. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1964, **57** (2), 283-292.
- LUCASSE (C.). — Fluorescent antibody tests applied to serum of patients with Gambian sleeping sickness. *Trop. Geogr. Med.*, 1970, **22**, 227-236.
- WERY (M.), VAN WETTERE (P.), WERY-PASKOFF (S.), VAN MEIRVENNE (N.) et MESAFEWA (M.). — The diagnosis of human African trypanosomiasis (*Trypanosoma gambiense*) by the use of the fluorescent antibody test. 2. First results of field application. *Ann. Soc. Belges Méd. Trop.*, 1970, **50** (6), 711-730.
- WERY (M.), WERY-PASKOFF (S.), VAN WETTERE (P.). — The diagnosis of human African trypanosomiasis (*Trypanosoma gambiense*) by the use of fluorescent antibody test. 1. Standardisation of an easy technique to be used in mass surveys. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop. Parasitol.*, 1970, **50** (5), 613-634.
- WERY (M.), WEYS (J.) et BURKE (H.). — Quatre années d'utilisation de la réaction de l'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic de la trypanosomiase au Zaïre. Rapp. final 8<sup>e</sup> Conf. Techn. O. C. E. A. C., Yaoundé, 140-154.