

Intérêt de la PCR dans le diagnostic de la Trypanosomiase Humaine Africaine.

Simo, G¹, Grebaut, P^{1,2}, Herder, S^{1,2}, Nkinin, S.W.¹, Penchenier, L^{1,2}

¹Laboratoire de recherche sur les trypanosomoses - OCEAC BP 288 - Yaoundé - Cameroun.

²ORSTOM-IRD - Yaoundé - Cameroun.

Résumé

Dans le but de montrer l'intérêt de la PCR («Polymerase Chain Reaction») sur sang dans le diagnostic de la Trypanosomiase Humaine Africaine (T.H.A.), du sang a été collecté dans des tubes EDTA («Éthylène Diamine Tétra Acétate») chez 1.663 personnes dont 1.614 provenant de 3 foyers actifs de la T.H.A. (Bipindi, Campo et Fontem) au Cameroun et 49 chez des individus (Européens) non exposés à la maladie du sommeil. Les examens parasitologiques et la culture *in vitro* ont révélé 62 trypanosomés. La PCR a été positive sur 61 trypanosomés et la culture *in vitro* (KIVI) a apporté 4 malades de plus aux 58 positifs aux examens parasitologiques. Le pourcentage de positivité de l'ensemble des PCR positives parmi les malades, les suspects sérologiques et les témoins négatifs (7% - 117/1.663) est 2 fois celui des examens parasitologiques (3,5% - 58/1.663). Cette technique peut être utilisée pour détecter les trypanosomes chez les suspects sérologiques lorsque les examens parasitologiques s'avèrent inefficaces.

Abstract : The interest of PCR in the diagnosis of African Human Trypanosomiasis.

In order to show the importance of PCR performed on blood in the diagnosis of Human African Trypanosomiasis (H.A.T.), blood samples were collected in EDTA coated tubes from 1.663 individuals, 1.614 of whom were from 3 active sleeping sickness foci (Bipindi, Campo and Fontem) in Cameroon and 49 from individuals non-exposed to the disease (Europeans). A total of 62 sleeping sickness patients were revealed by a combination of parasitological examinations and *in vitro* culture (KIVI). KIVI added 4 more cases to the 58 detected by parasitological examinations, whereas PCR was positive for 61 of these patients. The percentage positivity rate for all PCR positive individuals from sleeping sickness patients, serological suspects and negative controls (7% - 117/1.663) is twice that of parasitological examinations (3,5% - 58/1.663). This technique can be used to detect trypanosomes in serological suspects where parasitological examinations prove inefficient.

Introduction

La Trypanosomiase Humaine Africaine (T.H.A.) est une maladie parasitaire causée par un protozoaire appartenant au complexe d'espèce *Trypanozoma brucei*. s.l. Cette maladie constitue l'un des plus grands fléaux en Afrique au sud du Sahara. Les tests immunologiques tel que le CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis) sont

utilisés en routine pour son dépistage de masse. Ces tests mettent en évidence la présence d'anticorps anti-trypanosomes. Ils ne peuvent donc faire la différence entre une infection présente et une infection passée et guérie. De plus on observe un grand nombre de faux positifs et quelques faux négatifs liés à des problèmes de spécificités antigéniques. Enfin, la faible sensibilité des examens parasitologiques utilisés et la faible charge parasitaire qui caractérise la maladie du

Article original



Bull. liais. doc. OCEAC 1999 : 32(1)

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : B * 18182 Ex : 1

sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense* font que les trypanosomes sont difficilement détectables dans le sang périphérique (Miezan *et al.*, 1994).

La biologie moléculaire offre des outils très sensibles et très spécifiques. La PCR constitue une alternative pour mettre en évidence la présence directe de l'ADN (acide désoxy-ribonuclease) du parasite chez les individus lorsque les méthodes parasitologiques classiques s'avèrent insuffisamment sensibles.

Dans cette étude, nous envisageons de montrer l'intérêt de la PCR sur sang dans le diagnostic de la T.H.A. En effet, cette technique est très sensible puisqu'elle permet de détecter un trypanosome par millilitre de sang (Penchenier *et al.*, 1996). De plus la PCR a déjà fait ses preuves dans le diagnostic d'autres maladies parasitaires telles que les filarioses (Dissanayake *et al.*, 1991; Zimmerman *et al.*, 1994), le paludisme (Baker *et al.*, 1992; Kain *et al.*, 1993; Snounou *et al.*, 1993; Contamin *et al.*, 1995; Long *et al.*, 1995), les infections à *Trichomonas vaginalis* (Riley *et al.*, 1992; Kengne *et al.*, 1994) et la leishmaniose (Rodgers *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1993; Mathis et Deplazes, 1995).

Matériels et Méthodes

Ce travail a été réalisé lors de prospections médicales dans trois foyers (Bipindi, Campo et Fontem) actifs de la maladie du sommeil au Cameroun. Sur le terrain, chaque individu a été soumis à un test immunologique (CATT 1.3 sur sang total). Tout individu positif au CATT est considéré comme un suspect immunologique et par conséquent subit des examens parasitologiques tels que la ponction ganglionnaire (PG), la technique du «quantitative buffy-coat» (QBC) et la technique de la «miniature anion-exchange centrifugation» (mAEC). En plus, un échantillon d'individus CATT négatif a subi également ces examens parasitologiques. Ceux-ci constituent le groupe des témoins négatifs exposés au risque de la maladie. Le sang des personnes fortement suspectes immunologiquement et présentant ou non des signes cliniques de la maladie a été prélevé etensemencé dans le milieu de culture KIVI («Kit for in vitro isolation») afin de rechercher

au laboratoire, la présence des parasites après leur multiplication.

Un total de 1.663 tubes de sang prélevés sur EDTA a été utilisé dans cette étude. Sur 1.614 tubes provenant de personnes exposées aux risques de la maladie du sommeil, 805 ont été prélevés dans le foyer de Fontem, 540 à Campo et 269 à Bipindi. Le nombre de suspects immunologiques dans les différents foyers est de 1.405 et celui des témoins négatifs exposés aux risques de la trypanosomiase est de 209. Les 49 autres tubes proviennent de personnes (européennes) non exposées aux risques de la maladie du sommeil.

Au laboratoire, le sang a été traité en utilisant le kit «ReadyAmp® Genomic DNA Purification System» (Promega). Un millilitre de sang et un millilitre d'eau stérile (Nuclease-Free Water) sont mélangés dans un tube. L'hémolyse est réalisée par homogénéisation pendant 5 à 10 secondes toutes les 2 minutes et ceci pendant 10 minutes. Les tubes sont centrifugés à 14000 rpm pendant 5 minutes. Au culot issu de la centrifugation, 200µl de résine (ReadyAmp™ Resin) ont été ajoutés et l'ensemble a été homogénéisé. Après une incubation à 56°C pendant 30 minutes au bain-marie, les tubes sont incubés pendant au moins 25 minutes dans un bain-marie à 100°C et sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes. Le surnageant est collecté et peut être utilisé directement pour la PCR ou être stocké à -20°C.

La PCR est réalisée en utilisant des amorces spécifiques (TBR₁ et TBR₂) de *Trypanosoma brucei s.l.* (Masiga *et al.*, 1992). Dans un tube Eppendorf, ont été introduits 25µl d'un mélange contenant 5µl de sang traité, 3mM de MgCl₂, 20 pmoles de chaque amorce, 200µM de chaque dNTP (déoxynucléoside 5'-triphosphate) et 1 unité de Taq polymérase. Une dénaturation à 94°C pendant 5 minutes a précédé 40 cycles d'amplification. Chaque cycle d'amplification comprenait une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute. Une élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 10 minutes. Les produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium (2%) et visualisés sous U.V. (ultraviolet).

Tableau I.

Résultats de la PCR en fonction de la présence et de l'absence de trypanosomes chez les suspects immunologiques dans les différents foyers.

Foyers	Trypanosomés(*)		CATT +/T- (**)		Total
	PCR+	PCR-	PCR+	PCR-	
Bipindi	41	1	5	162	209
Campo	19	0	2	370	391
Fontem	1	0	44	760	805
Total	61	1	51	1292	1405

T- = personnes négatives aux examens parasitologiques.

(*) = personnes positives aux examens parasitologiques.

(**) = CATT⁺/T⁻ (Suspects immunologiques).

Tableau II.

Résultats de la PCR chez les témoins négatifs exposés (Camerounais) et non exposés (Européens) aux risques de la trypanosomiase.

	Témoins négatifs exposés (*)	Témoins négatifs non exposés (**)	Total
PCR+	5	0	5
PCR-	204	49	253
Total	209	49	258

(*) = CATT⁺/T⁻

(**) = Expatriés n'ayant jamais résidés dans un foyer de la T.H.A.

Résultats

La culture (KIVI) a permis de trouver 4 personnes trypanosomées initialement négatives aux examens parasitologiques utilisés (PG, QBC et mAEC).

Les résultats de la PCR sont regroupés dans les tableaux I et II.

Sur les 62 personnes trypanosomées, 58 étaient positives aux examens parasitologiques (PG et/ou QBC et/ou mAEC) et 61 positives en PCR. Des 1343 suspects immunologiques et négatifs aux examens parasitologiques, 51 étaient positifs en PCR dont 44 provenant du foyer de Fontem, 5 de Bipindi et 2 de Campo. Des 209 témoins négatifs exposés, 5 étaient positifs en PCR. Aucun des témoins non exposés n'était positif en PCR. Pour l'ensemble des foyers, le pourcentage de positivité des examens parasitologiques est de 3,5% (58/1663) alors que celui de la PCR est de 7% (117/1663).

Discussion

Dans cette étude, des amorces spécifiques de *Trypanosoma brucei s.l.* ont été utilisées pour cibler l'ADN de trypanosomes dans une réaction où l'ADN était extrait du sang avec une résine. Les 4 personnes présentant des anticorps anti-trypanosomes qui se sont révélées être positives en culture mais dont la recherche des trypanosomes a été négative, sont vraisemblablement des malades ignorés du fait de la faible sensibilité des examens parasitologiques classiques.

Les 5 témoins négatifs exposés et positifs en PCR pourraient être :

- des individus en phase d'incubation dont les anticorps n'ont pas encore été produits contre les antigènes de surface des trypanosomes,
- des individus porteurs de faible charge de trypanosomes et dont les anticorps sont dirigés contre des variants antigéniques différents du Litat 1.3 utilisé dans le CATT puisque Dukes *et al.* (1992) ont démontré l'absence du gène codant pour ce variant antigénique chez certaines souches de trypanosomes isolées au Cameroun,

- des faux positifs en PCR provenant de l'existence de traces d'ADN de *Trypanosoma brucei brucei* dans le sang de ces personnes. En effet, ces trypanosomes animaux peuvent être inoculés à l'homme par les glossines, mais leur développement est arrêté par le système immunitaire. La dégradation de ces parasites peut ainsi laisser suffisamment d'ADN pour positiver la PCR.

La prévalence de PCR positive est 2 fois plus élevée que celle des examens parasitologiques (respectivement 7% et 3,5%). Asonganyi *et al.* (1998) ont également utilisé une méthode à base de résine (Walsh *et al.*, 1991) pour extraire l'ADN du sang et ont obtenu un pourcentage de positivité de la PCR de 13,9% pour la Tanzanie (24/194) et 79,9% pour le Cameroun (115/144). Le grand nombre de positifs observés dans leur étude peut s'expliquer par le fait que les individus étaient sélectionnés sur la présence non seulement des anticorps anti-trypanosome (mis en évidence par le CATT) mais aussi des antigènes circulants (mis en évidence par le CIATT : Card Indirect Agglutination Test for Trypanosomiasis). La T.H.A. à *Trypanosoma brucei gambiense* est souvent caractérisée par une faible charge parasitaire ; les examens parasitologiques utilisés pour son diagnostic étant peu sensibles et en l'absence de croissance *in vitro* (Kanmogne *et al.*, 1996) de certaines souches, la PCR constitue une méthode alternative pour l'identification des trypanosomes dans le sang. La méthode utilisée pour extraire l'ADN est très simple et limite les contaminations enregistrées lors de l'extraction de grandes quantités d'échantillons. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la PCR sur sang serait une méthode sensible quoique nous ne nous expliquons pas le cas du seul malade négatif en PCR. S'il fallait considérer la personne comme malade, il est surprenant qu'elle soit demeurée négative à 3 PCR successives alors que le KIVI était positif. Il est probable qu'une erreur de secrétariat ait été faite, mais la personne ayant été traitée (pentamidine), il ne nous est pas possible de le confirmer. Cette étude montre également que cette méthode serait spécifique et utile dans le diagnostic de la T.H.A. Cependant, son coût élevé et le fait que le diagnostic soit différé

en limite l'utilisation comme test de dépistage sur le terrain. Néanmoins, elle pourrait servir à suivre les suspects sérologiques afin d'en préciser le statut parasitologique.

Références bibliographiques

- Asonganyi, T., Doua, F., Kibona, S. N., Nyasulu, Y. M. Z., Masake, R. & Kuzoe, F. A multi-centre evaluation of the card indirect agglutination test for trypanosomiasis (*Trypt Test CIATT®*). *Ann Trop Med Path* 1998, 92 : 1693-1700.
- Baker, R. H., Banchongaksorn, T., Courval, J. M., Suwonkerd, W., Rimwungtragoon, K. & Wirth, D. F. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1992, 46 : 416-426.
- Contamin, H., Fandeur, T., Bonnefoie, S., Skouri, F., Ntoumi, F. & Mercereau-Puijalon, O. PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol* 1995, 33 : 944-951.
- Dissanayake, S., Min, X. & Piessens, W. F. Detection of amplified *Wuchereria bancrofti* DNA in mosquitoes with a nonradioactive probe. *Mol Biochem Parasitol* 1991, 45 : 49-56.
- Dukes P., Gibson, W. C., Gashumba, J. K., Hudson, K. M., Bromidge, T. J., Kaukas, A., Asonganyi, T & Magnus, E. Absence of the Litat 1.3 (CATT-antigen) gene in *Trypanosoma brucei* stock from Cameroon. *Acta tropica* 1992, 51 : 123-134.
- Kain, K. C., Brown, A. E., Mirabelli, I. & Webster, H. K. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *J Inf Dis* 1993, 168 : 1323-1326.
- Kanmogne, G. D. Genetic characterization of *Trypanosoma brucei gambiense* isolated from Cameroon. *ph D thesis* 1996, University of Bristol, U.K.
- Kengne, P., Veas, F., Vidal, N., Rey, J. L. & Cuny, G. *Trychomonas vaginalis* : repeated DNA target for highly sensitive and specific polymerase chain reaction diagnosis. *Cell Mol Biol* 1994, 40 : 819-831.

- Long, G. W., Fries, L., Watt, G. H. & Hoffman, S. L. Polymerase chain reaction amplification from *Plasmodium falciparum* on dried blood spots. *Am J Trop Med Hyg* 1995, 52 : 344-346.
- Lopez, M. W., Inga, R., Gangalaya, M., Echevarria, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C. & Arevalos, J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction : a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 49 : 348-356.
- Masiga, D. K., Smith, J. A., Hayes, P. Bromidge, J. T. & Gibson, W. C. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int J Parasitol* 1992, 22 : 909-918.
- Mathis, A. & Deplazes, P. PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* ssp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* 1995, 33 : 1145- 1149.
- Miezan, D. K., Meda, A. H., Doua, F. & Cattand, P. Evaluation des techniques parasitologiques utilisées dans le diagnostic de la Trypanosomiase Humaine Africaine à *Trypanosoma brucei gambiense* en Côte d'Ivoire. *Bul Soc Path Exot* 1994.
- Penchenier, L., Dumas, V., Grebaut, P., Reifenberg, J. M. & Cuny, G. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomiasis. *Parasite* 1996, 4 : 387-389.
- Riley, D. E., Roberts, M. C., Takayama, T. & Kriger, J. N. Developpement of polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trychomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1992, 30 : 465-472.
- Rodgers, M. R., Popper, S. J. & Wirth D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990, 71 : 267- 275.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaitong, S. & Brown, K. N. Identification of four human malaria parasites species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993, 58 : 283-292.
- Walsh, S. P., Metzger, D. A. & Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing of forensic material. *Bio Technique* 1991, 10 : 506-513.
- Zimmerman, P. A., Guderian, R. H., Aruajo, E., Elson, L., Phadke, P., Kubofcik, J. & Nutman, T. B. Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection : Improved detection of patients with onchocerciasis. *J inf Dis* 1994, 169 : 686-689.



Organisation de Coordination pour la lutte
contre les Endémies en Afrique Centrale

Le Bulletin

de liaison et de documentation

de l'OCEAC

Sommaire

- La vie de l'OCEAC

- Articles originaux :

Isoenzyme characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. stocks from different foci in the Central African Region. - Nkinin, S.W. *et al.*

Intérêt de la PCR dans le diagnostic de la Trypanosomiase Humaine Africaine. - Simo, G. *et al.*

Biodiversité culicidienne dans la station de traitement des eaux usées par lagunage à macrophytes de Biyem-Assi (Yaoundé-Cameroun). - Agendia, P.L. *et al.*

Evolution des cas de Sida pris en charge dans le Service de Médecine de l'Hôpital Provincial de Garoua : janvier 1989 - décembre 1997. - Talla, P. *et al.*

Endoscopie digestive haute de l'enfant camerounais. A propos de 80 cas. - Nsangou, I. *et al.*

- Mise au point

- Flash Info

- Informations générales

- Revue bibliographique

- Les clés d'Internet

PM 253
3 JUN 1999
Santé

188 N 0255-5352

