



Laboratoire de Référence de l'OIE sur les Trypanosomoses Animales d'Origine Africaine

RECUEIL DES PROTOCOLES STANDARDISES DES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMOSES ANIMALES D'ORIGINE AFRICAINE

Montpellier, octobre 2017

Marc Desquesnes,

avec les contributions de Zakaria Bengaly, David Berthier, Géraldine Bossard, Bila Cene, Hamidou Ilboudo, Vincent Jamonneau, Jacques Kaboré, Youl Mémé, Léopold Millogo, Sophie Ravel, Hassane Sakandé, Lassina Sanogo, Sophie Thévenon, Wilfrid Yoni et Adrien Zoungana.



Préambule

Les trypanosomoses animales d'origine africaine sont un ensemble de maladies causées par plusieurs espèces de protozoaires parasites du genre *Trypanosoma*, essentiellement transmises de manière cyclique par le genre *Glossina* (mouches tsé-tsé), mais également transmises mécaniquement par des insectes piqueurs (tabanidés, stomoxes, etc.). Les maladies peuvent affecter diverses espèces de mammifères mais d'un point de vue économique, elles sont particulièrement importantes chez le bétail, bovins, suidés, équins, ovins, caprins. Elles sont dues principalement à *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et de façon moindre à *T. brucei brucei*, mais également à *T. evansi*. L'agent responsable de la dourine, *T. equiperdum*, en fait également partie, bien qu'il constitue un cas particulier de maladie transmissible par voie principalement vénérienne chez les équidés ; il ne sera pris en compte dans le présent recueil, qu'au titre du diagnostic différentiel.

Les trypanosomoses animales d'origine africaine sont classiquement des maladies aiguës ou chroniques qui provoquent des accès de fièvre et sont accompagnées par de l'anémie, des œdèmes, du larmolement, une hypertrophie des ganglions lymphatiques, des avortements, une diminution de la fertilité, une perte d'appétit et une chute de poids, conduisant à une mort prématurée dans les formes aiguës, ou à des signes digestifs et/ou nerveux avec émaciation et une mort plus tardive dans les formes chroniques.

Le contrôle de la trypanosomose, comme de toute maladie infectieuse, passe d'abord par la détection de son agent et des réponses immunes des hôtes, aussi les diagnostics chez le vecteur et chez l'hôte sont-ils à la base de toutes études épidémiologiques et tous suivis de programmes de contrôle.

Dans le cadre du programme de jumelage du laboratoire de référence de l'OIE sur les trypanosomoses animales d'origine africaines (2012-2017), le CIRAD, en sa qualité de laboratoire de référence, laboratoire parrain, dans ses implantations de Montpellier et Bangkok, et le CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, laboratoire candidat, ont travaillé en

concertation pendant une durée de 6 années, afin de standardiser, optimiser et harmoniser les méthodes de diagnostic et les banques d'échantillons et souches de référence, dans l'objectif d'améliorer ces méthodes et de permettre au CIRDES de devenir laboratoire de référence de l'OIE pour les trypanosomoses animales d'origine africaines.



Bovin affecté par *T. congolense*, Afrique de l'Ouest



Bovin affecté par *T. evansi* Asie du Sud Est



Bovins affectés par *T. vivax*, Amérique du sud
(M. Desquesnes)

Remerciements

à toutes celles et ceux qui ont contribué à la réalisation du jumelage CIRAD-CIRDES dans le cadre du laboratoire de référence de l'OIE sur les trypanosomoses animales d'origine africaine, depuis la formation des contributeurs jusqu'à la diffusion du présent recueil, en passant par toutes les étapes de son élaboration, et avec l'espoir qu'il soit utile à la connaissance et aux bonnes pratiques.

Table des matières

Préambule	3
Table des matières.....	5
Introduction	7
1. Prélèvements, étiquetage et conservation.....	9
2. Examens microscopiques	13
2.1 Techniques d'examen direct.....	13
2.1.1 Goutte de sang frais.....	13
2.1.2 Goutte épaisse	14
2.1.3 Frottis sanguin (Étalement mince de sang)	15
2.2 Techniques de concentration parasitaire.....	21
2.2.1 Technique de centrifugation hématocrite (HCT / méthode de Woo).....	21
2.2.2 Technique du <i>buffy coat</i> en contraste de phase ou sur fond noir	24
2.2.3 Échange d'anions	26
2.3 Techniques de culture.....	27
2.3.2 Inoculation à l'animal.....	28
2.4 Sensibilité comparée des tests de détection parasitologique	29
3. Détection moléculaire	31
3.1 Épreuves de détection des antigènes de trypanosomes.....	31
3.2 Épreuves de détection de l'ADN des trypanosomes	31
3.2.1 Préparation des échantillons pour la PCR.....	32
3.2.2 PCR monospécifique.....	36
3.2.3 PCR multi-spécifique	39
3.2.4 LAMP.....	39
4. Épreuves sérologiques.....	41
4.1 Épreuve d'immunofluorescence indirecte	41
4.2 Épreuve immuno-enzymatique de détection d'anticorps	42
4.2.1 Protocole de préparation des antigènes solubles	43
4.2.2 Réalisation de l'ELISA (détection d'IgG).....	50
4.2.3 Standardisation de l'ELISA	53
4.3 Détection d'anticorps IgM.....	54
4.4 Test de trypanolyse.....	55
5. Recommandations sur l'usage des tests.....	57
5.1 Méthodes de diagnostic recommandées	57
5.1.1 Examen microscopique	57
5.1.2 PCR.....	58
5.1.3 ELISA.....	58
5.1.4 CATT/T. evansi.....	59
5.2 Méthodes recommandées chez les équidés et camélidés pour le surra	59
5.3 Méthodes recommandées dans les autres espèces pour toutes trypanosomoses	60
5.4 Propositions de recommandations pour le commerce international des équidés ou camélidés	61
6. Cahiers de laboratoire.....	62
7. Echantillons et souches de référence.....	63
7.1 Les souches de référence	63
7.2 Les ADN de référence	66
7.3 Les sérums ou plasma de référence	67

8.	Contrôles de qualité interne et biosécurité	69
9.	Standardisation inter-laboratoires	72
10.	Conditionnement et expédition des échantillons.....	74
10.1	Type d'échantillons et informations requises	74
10.2	Règles relatives à la sécurité sanitaire	75
10.3	Règles relatives à l'Accès et au Partage des Avantages	78
11.	Bibliographie	79
12.	Annexes: Fiches de protocole des tests	85
12.1	Identification des glossines.....	85
12.2	Détection de l'infection des glossines par les trypanosomes.....	88
12.3	Préparation des frottis sanguins colorés au Giemsa	91
12.4	Préparation de l'ADN pour la PCR	93
12.5	Séparation des trypanosomes sur colonne de DE52	97
12.6	Préparation des antigènes solubles pour l'ELISA	99
12.7	Protocoles ELISA	100
12.8	Protocoles de PCR	103
	Séquences des primers, cibles, taille des produits attendus, températures d'hybridation à appliquer et références publiées	103

Introduction

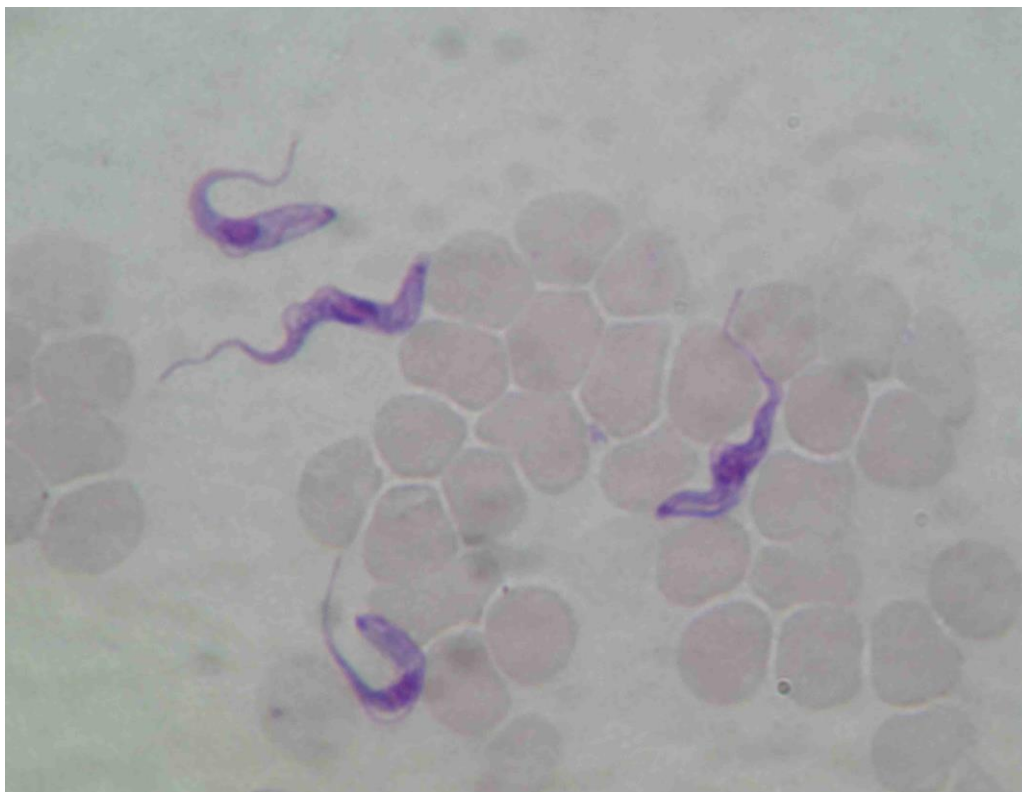
Le présent recueil est constitué pour servir de référence pour les méthodes de diagnostic des trypanosomoses effectuées dans le laboratoire de référence de l'OIE sur les trypanosomoses animales d'origine africaine, CIRAD Montpellier, et le laboratoire partenaire qu'est le CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, mais également dans les laboratoires partenaires nationaux et régionaux.

Il décrit les méthodes parasitologiques, sérologiques et de biologie moléculaire qui sont d'usage et font référence pour l'OIE dans le diagnostic des trypanosomoses africaines, conformément au chapitre 2.4.17 « TRYPANOSOMOSES (transmissibles par les tsé-tsés) » du manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE. Il en donne les principales caractéristiques, permettant aux utilisateurs de réaliser les tests et d'interpréter justement les résultats de leurs études. Il décrit en détail l'ensemble des protocoles permettant à d'autres laboratoires régionaux ou nationaux d'adopter ces méthodes pour effectuer les tests indépendamment des laboratoires de référence de l'OIE, même s'il reste recommandé de conserver des liens constants avec ces laboratoires de référence pour assurer les contrôles de qualité. Il décrit les méthodes de contrôle de qualité qui sont nécessaires pour certifier la valeur des tests effectués.

Il est rappelé que les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé figurent dans la Partie 2 « Maladies listées par l'OIE et autres maladies ayant une importance pour les

échanges internationaux », section 2.4 « Bovidae » (qui inclut les bovinés, antilopes, ovins caprins, etc). Toutefois, les trypanosomoses affectent des espèces d'autres familles, pour lesquelles le diagnostic peut également être requis, notamment les équidés et les carnivores. Des éléments du diagnostic dans ces espèces seront donc également considérés. La détection de l'infection par les trypanosomes ne présume pas de l'espèce en cause, et inclut en conséquence toutes les espèces transmises ou non par les glossines, ce qui implique de considérer, au moins au titre du diagnostic différentiel, *T. cruzi*, *T. evansi* et *T. equiperdum*.

Les méthodes de diagnostic qui sont décrites ci-après peuvent être utilisées soit en complément d'observations cliniques, soit comme outils d'enquêtes épidémiologiques. Outre les parties purement techniques que sont « Prélèvement, étiquetage et conservation », « Examens microscopiques », « Détection moléculaire » et « Epreuves sérologique », le présent recueil fournit les « Recommandations sur l'usage des tests », mais également les moyens d'assurer la qualité des diagnostics, avec la tenue des « Cahiers de laboratoire », le maintien d'une banque d'« échantillons et souches de référence », les modalités de « Contrôles de qualité interne et biosécurité » et des recommandations pour la « Standardisation inter-laboratoire », et le « Conditionnement et expédition des échantillons ». Il présente enfin une partie « Bibliographique » présentant une liste de références utiles et des « Annexes techniques » décrivant en détail chaque technique.



Trypanosoma vivax sur frottis coloré au Giemsa (M. Desquesnes)

1. Prélèvements, étiquetage et conservation

Chez les mammifères, le diagnostic de laboratoire de la trypanosomose est le plus souvent réalisé sur du sang, mais d'autres échantillons biologiques peuvent être testés, comme le liquide céphalo-rachidien (LCR), la lymphe, un liquide articulaire, un écoulement séreux ou muqueux d'origine oculaire ou génitale.

Chez les bovidés, le sang est habituellement obtenu par ponction à l'aide d'une aiguille stérile à partir de la veine jugulaire, la veine caudale ou une veine auriculaire. Cette dernière fournirait un examen direct plus sensible que les autres et peut être utilisée par scarification de la veine individuellement, toutefois, pour un usage collectif et/ou pour raisons pratiques (afin d'obtenir un volume suffisant à d'autres examens), les ponctions jugulaire ou caudale sont généralement préférées chez les bovins, et jugulaire chez les ovins et caprins. Chez le chien on prélèvera à la veine céphalique (veine du bras) ou à la veine saphène (membre postérieur), tandis que chez le cheval on préfère la veine jugulaire dans sa partie haute.

Les échantillons biologiques ne demandant pas d'anticoagulant (LCR, lymphe, etc) sont placés dans des tubes secs (microtubes coniques) et conservés au froid (0-4°C).

Les précautions usuelles telles que, l'utilisation de bottes, de blouse ou tablier et le port de gants sont prises pour effectuer les prélèvements. Le sang est récolté directement sur tubes sous vide secs (sans anticoagulant) et sur tubes sous vide avec anticoagulant (hépariné ou EDTA ou autres selon les exigences des protocoles), ou, collecté à la seringue et réparti dans des tubes. Les tubes secs sont conservés pendant 6 à 10 heures au frais (15-20°C) mais pas au froid, ni en contact direct avec de la glace pour éviter une prise en masse du sang toujours possible en cas de refroidissement brutal pouvant par ailleurs entraîner une lyse plus ou moins importante des globules rouges et altérer la qualité des sérums à récolter. Les tubes secs sont donc placés à l'ombre, dans un endroit frais pendant la journée, puis au réfrigérateur 6 à 10 heures plus tard, pour laisser se poursuivre la rétractation des caillots. La séparation du sérum peut être faite 24 à 48h plus tard par pipetage avec centrifugation (1500-2000 rpm) préalable si nécessaire.

Les tubes avec anticoagulant sont placés aussitôt au froid (dans une glacière à 0-4°C) jusqu'à la réalisation des tests à l'état frais ou autres préparations.



Prélèvement de sang à l'aide d'un tube sous vide, à la veine jugulaire



Préparation des tubes capillaires



Prélèvement de sang à la seringue, à la veine caudale, chez des vaches laitières (M. Desquesnes)

L'étiquetage des tubes lors du prélèvement doit être harmonisé pour permettre une compréhension commune. Idéalement il devrait utiliser les mêmes codes que pour l'étiquetage des échantillons biologiques conservés dans les banques, mais l'habitude et les diverses langues utilisées selon les pays font que, dans la pratique, les étiquetages de terrain sont souvent assez libres et pas toujours rigoureux. Il conviendra donc, autant que faire se peut, de se rapprocher le plus possible, (ou voire d'utiliser) les codes définis pour l'étiquetage en banque, à défaut, le passage de l'étiquetage de terrain à l'étiquetage de laboratoire peut engendrer des erreurs de transcription.

L'étiquetage des tubes est généralement effectué de la manière suivante :

2 lettres sont consacrées à définir l'espèce animale prélevée et, si possible, le type (laitier/viande par exemple) BV pour bovin à viande ou BC pour *beef cattle* selon la langue du pays ; on doit préférer adopter l'anglais pour permettre à tous les partenaires d'utiliser les mêmes codes. Le code complet universel des espèces est indiqué à la page suivante.

Pour des suivis d'animaux d'expérience : 2 lettres définissent l'espèce animale, suivi du numéro de l'animal, et, après un tiret (ou à la ligne), la date en jj/mm/aa; exemple pour le bovin à viande n° 224 prélevé le 8 février 2012 : BC224 - 08/02/12 ou BC224

08/02/12

Pour des prélèvements effectués dans des troupeaux de terrain, on indique l'espèce hôte suivie du numéro d'identification de l'animal, ou d'un numéro d'ordre de prélèvements ; puis le nom de la localité codé par ses trois premières lettres (ou un autre code si nécessaire mais de préférence limité à 5 lettres), par exemple le 14^{ème} bovin laitier (dairy cattle : DC) prélevé à Kou le 28 février 2013 : DC14 - KOU - 28/02/13.

S'il ne s'agit pas de sang, la nature du prélèvement doit être précisée séparément du reste de ces informations (Liquide Articulaire : LA ; liquide céphalo-rachidien : LCR, etc).

L'étiquetage des tubes au laboratoire doit être harmonisé pour permettre une compréhension commune, il est généralement effectué de la manière suivante, pour les plus courants : sérums, plasma, sang et buffy coat.

On doit conserver ces 4 types d'échantillons dans des boîtes différentes pour éviter toute confusion entre sérum et plasma ou sang et buffy coat. La nature est également indiquée sur la cryoboîte. De plus les cryotubes sont différents pour le sang total qui est conservé dans des cryotubes de 1,5ml (ou plus grands) et pour les buffy coats conservés dans des cryotubes plus petits, par exemple de 0,5ml. Toutefois, puisqu'on peut être amené à manipuler en même temps des échantillons de nature différente, une lettre est placée sur le bouchon des cryotubes « S » pour sérum, « P » pour Plasma, « B » pour blood et « C » pour buffy coat.

Lorsqu'un échantillon entre dans une banque d'échantillons, il reçoit un numéro d'ordre précédé de 2 lettres pour identifier l'hôte ; ce numéro alphanumérique est son identifiant unique définitif. Un code réduit le plus souvent à une lettre peut également être utilisé.

Codes universels à utiliser pour les différentes espèces hôtes:

Bovin à viande/beef cattle	BC	<i>Mus musculus</i> (mouse)	MM (or M)
Bovin laitier/dairy Cattle	DC	Cheval (Horse)	HH (or H)
Bos taurus	BT	Ane (donkey)	DD (or A)
Bos indicus	BI	Mule	HD
Buffle d'eau (<i>Bubalus bubalis</i>)	BB (or B)	Porc (<i>Sus scrofa</i>)	SS (or P)
Mouton (ovin)	OV (or S)	Chien	CN (or D)
Chèvre (caprin)	CP (or G)	Eléphant Asie	EM (or E)
Autres: indiquer les initiales de l'espèce		Rat	RN

2. Examens microscopiques

2.1 Techniques d'examen direct

Les microscopes doivent être équipés à minima de grossissements X400 ou X500 et X1000 et préférablement équipés d'un condenseur de lumière à fond noir et d'objectifs à contraste de phase (X40 ou X50) pour les examens directs à l'état frais. Le port de gants est nécessaire pour se protéger des risques infectieux et éviter de graisser les lames.

2.1.1 Goutte de sang frais

Déposer 2-3 microlitres de sang sur une lame porte-objet puis recouvrir aussitôt d'une lamelle (22 x 22 mm) et appuyer légèrement avec un papier absorbant pour assurer une bonne répartition du sang sous la lamelle et absorber l'excédent. Examiner au microscope à un grossissement de X400, sans condenseur de lumière, ou mieux, en contraste de phase sur fond noir, ou en contraste interférentiel, ou encore en descendant le condenseur de lumière afin de créer artificiellement la réfringence des membranes plasmiques. Approximativement 40 à 50 champs microscopiques sont observés. Les trypanosomes peuvent être reconnus par leur mouvement parmi les globules rouges. En fonction de la taille, de la forme (extrémité postérieure, membrane ondulante) et des mouvements et déplacements du trypanosome, une hypothèse de diagnose spécifique peut être faite. La confirmation finale de l'espèce est réalisée par l'examen d'une préparation colorée ou par PCR. Les critères de morphologie et de motilité suivants peuvent être exploités :

- Trypanosome de très grande taille (mais variable d'un spécimen à l'autre), extrémité postérieure très effilée et d'apparence rigide, mouvements généralement réguliers et peu productifs, et parasitémie très basse : ces éléments sont compatibles avec *T. theileri*.
- Trypanosome de grande taille, long et fin (parfois large dans la forme « stumpy ») avec des mouvements larges et un phénomène de « capture de la lumière » dans la membrane ondulante, qui accompagne les mouvements le long du corps, flagelle libre visible, extrémité postérieure effilée mais non rigide : ces éléments sont en faveur d'un *Trypanozoon* (*T. brucei* spp, *T. evansi*, *T. equiperdum*).
- Trypanosome de taille moyenne avec des mouvements rapides et une capacité à traverser les champs du microscope, phénomène de « capture de la lumière » parfois visible mais modéré, flagelle libre visible, et extrémité postérieure arrondie : ces éléments suggèrent *T. vivax*.

- Trypanosome de petite taille, vermiforme, avec des mouvements peu productifs et l'absence de flagelle libre : ces éléments sont caractéristiques de *T. congolense*.

- Trypanosome de taille moyenne avec des mouvements extrêmement rapides, et une capacité à traverser les champs du microscope de manière très rapide (stade 2) ou en exécutant des cercles réguliers à l'intérieur du champs microscopique (stade 1) : ces critères suggèrent *T. lewisi*. Bien qu'il soit un parasite des rats, il peut être rencontré lors de cultures sur animaux de laboratoire :

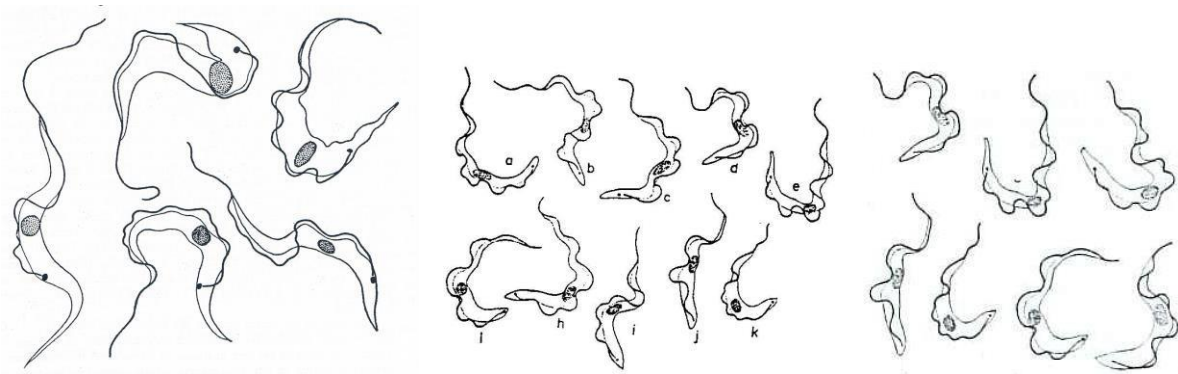
L'identification d'espèce à l'état frais n'est possible qu'après avoir acquis une grande expérience et observé de nombreuses espèces de trypanosomes dans des conditions diverses pour être fiable ; elle demeure donc l'apanage de quelques techniciens spécialisés.

2.1.2 Goutte épaisse

Cet examen est réalisé en plaçant une goutte de sang de 6-8 microlitres sur une lame porte-objet et en l'étalant de manière concentrique sur une surface d'environ 2 cm de diamètre en utilisant le coin d'une autre lame. L'épaisseur du film doit être telle que, après séchage, on puisse lire un texte au travers de la lame. Le séchage est effectué en agitant la lame qui, sans fixation, est immergée dans l'eau distillée pendant quelques secondes pour provoquer l'hémolyse, puis séchée avant coloration. L'étalement séché doit être conservé au sec et à l'abri de la poussière, de la chaleur, des mouches et autres insectes. Il est coloré avec la solution de Giemsa à 0.4 % préparée avec une solution commerciale pure diluée au 1/20^{ème} dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,2 ; la lame est immergée durant 30 min, puis rincée une fois à l'eau dé-ionisée, puis abondamment rincée à l'eau de robinet. Le temps de coloration et la dilution de la solution varient en fonction du colorant et de la méthode. Par conséquent, il est important de suivre les recommandations du fabricant et d'adapter le temps de coloration et la concentration du colorant (1/10-1/20) pour obtenir un résultat optimal. La goutte épaisse colorée est ensuite bien séchée avant d'être examinée au grossissement de X 500 ou X 1000. Voir le site :

<http://www.sleeping-sickness.ird.fr/diagnostic42.htm>

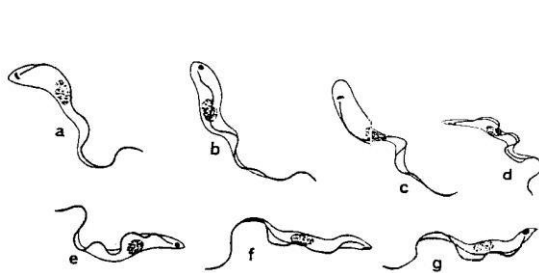
La méthode est simple et peu chère, mais les résultats sont différés du fait de la coloration. Les trypanosomes sont reconnus par leur aspect morphologique, mais peuvent être déformés durant la coloration, ce qui peut rendre difficile l'identification des espèces. Les figures ci-dessous présentent les caractéristiques des principales espèces de trypanosomes.



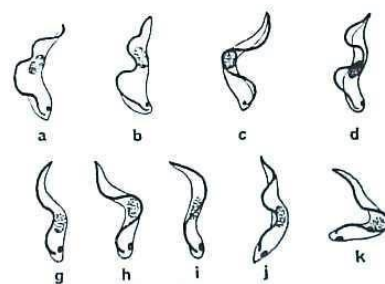
T. theileri

T. evansi

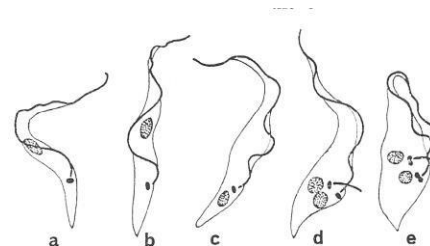
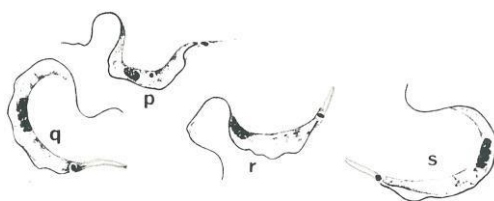
T. brucei



T. vivax



T. congolense



T. lewisi, forme sanguine adulte (gauche) et en multiplication chez le rat (droite)

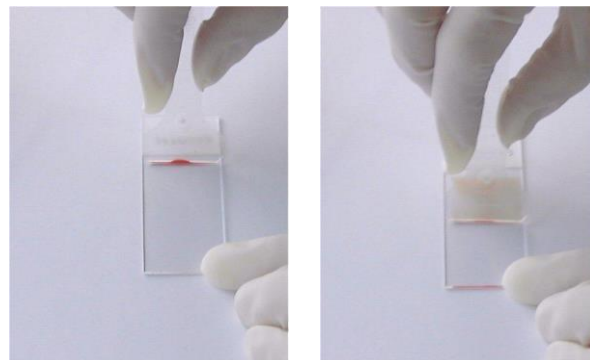
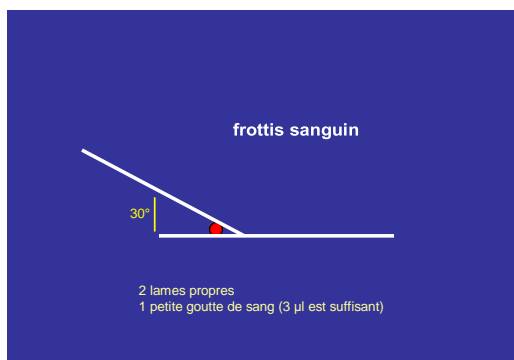
d'après Hoare, 1972

2.1.3 Frottis sanguin (Étalement mince de sang)

La propreté des lames microscopiques est déterminante dans le succès des examens qui suivent. Des lames grasses ou poussiéreuses sont un support inexploitable. Il est capital de bien dégraisser les lames avant de réaliser ces examens.

Les étalements de sang en goutte mince sont réalisés en déposant une petite goutte de sang, environ 3-4 microlitres, par exemple à partir d'un tube capillaire à microhématocrite ou du bouchon d'un tube EDTA, sur une lame porte-objet parfaitement propre et dégraisée (à l'éthanol) ; si nécessaire, on placera cette goutte approximativement à 20 mm de l'extrémité de

la lame afin de laisser un espace libre pour un examen en goutte épaisse. Le sang est étalé avec le bord parfaitement propre et lisse d'une autre lame (à bord biseautés de préférence). Cette lame est inclinée selon un angle de 30° environ avec la première lame et tirée en arrière pour rentrer en contact avec la gouttelette. Le sang se répand ainsi le long du bord de la lame qui est ensuite poussée vers l'autre extrémité de façon rapide et régulière dès que le sang a atteint les 2 bords de la lame de traction ; le sang est ainsi étalé par un phénomène de traction capillaire. Si la quantité de sang utilisée est correcte, la lame doit être recouverte d'un film de sang homogène et présentera la forme d'un obus (la quantité de sang au milieu de la lame étant supérieure à celle des bords, elle gouverne la forme globale de l'étalement). De façon idéale, les étalements doivent être préparés de telle sorte que les globules rouges soient contigus, sans se superposer. La lame est séchée rapidement à l'air et protégée de la poussière, des mouches et autres insectes (un frottis piqueté de petits ronds d'environ 1 mm de diamètre témoigne du repas de sang réalisé par des mouches suceuses...). La propreté de la lame est déterminante pour le succès de cet examen (bien dégraisser les lames à l'éthanol et faire sécher avant de réaliser le frottis). Nettoyer aussitôt la lame ayant servi à la traction du sang, sans lui laisser le temps de sécher ; à défaut, le frottis suivant sera strié et illisible.



a



b



c



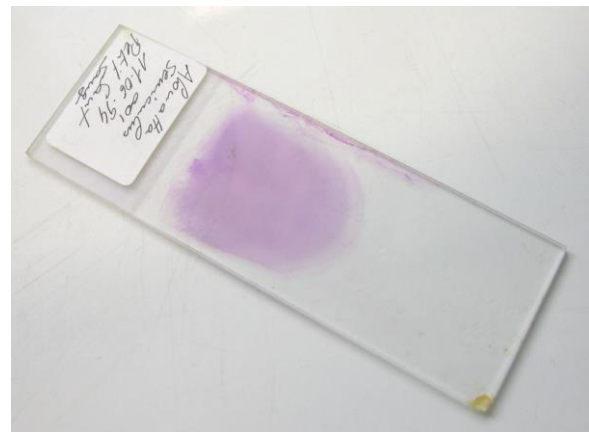
d

- (a) Lame grasse, « vacuolisation » du frottis ; (b) correct (c) excès de sang et absence de « tête » de frottis ; (d) excès de sang et étalement insuffisant, superposition des cellules.

Le frottis est ensuite fixé sur la lame par immersion dans du méthanol durant 3 min et colorée avec la solution de Giemsa à 0,4 % (solution commerciale pure) diluée au 1/10 ou 1/20^{ème} dans un tampon de PBS pH 7,45 fraîchement constitué par un mélange de 17,5% de Solution A (KH_2PO_4 (Merck Art. 4873) 9,08 g/l molarité 1/15) et 82,5% de solution B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck Art. 6580) 11,87 g/l, molarité 1/15), durant 30 min, puis rincée une fois à l'eau dé-ionisée, puis rincée abondamment à l'eau de robinet. Un kit de coloration rapide type RAL555 peut également être utilisé, il procède par 5 immersions d'une seconde successivement dans des solutions de fixateur (méthanol), éosine et bleu, puis un rinçage à l'eau de robinet. Dans tous les cas le frottis coloré est ensuite bien séché avant d'être examiné au grossissement de X500 ou X1000. Il est important de bien sécher la lame, à défaut, l'eau et l'huile d'immersion constituent un mélange rendant la lame illisible du fait des interférences lumineuses créées par l'eau et l'air emprisonnés sous l'huile. Un frottis bien réalisé laisse apparaître un liseré clair autour de la tête de frottis ; cette zone est particulièrement riche en cellules blanches (et en éventuels trypanosomes), du fait de forces capillaires élevées liées à leur grande taille. Ce phénomène de « concentration » est voisin de celui exploité par la méthode de centrifugation hématocrite.



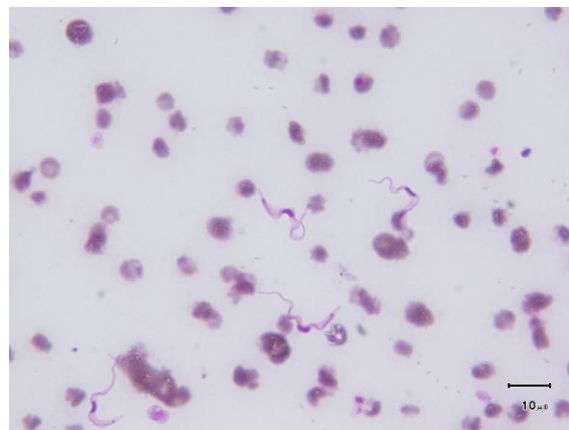
Kit de coloration



Frottis coloré



Objectif et huile d'immersion



Trypanosomes sur frottis en immersion (X 1000)

Approximativement, 50 à 100 champs de l'étalement coloré doivent être examinés au grossissement X500, puis X1000 avec l'huile à immersion avant de considérer l'échantillon comme négatif. Même après l'observation d'un trypanosome, environ 20 champs supplémentaires doivent être examinés pour déterminer l'éventuelle présence d'espèces différentes. La zone du frottis qui doit être préférentiellement explorée est celle de la tête, où sont concentrés les cellules blanches, les trypanosomes et d'éventuels globules rouges parasités (du fait de l'augmentation de leur taille et donc de leur adhérence à la lame de traction).

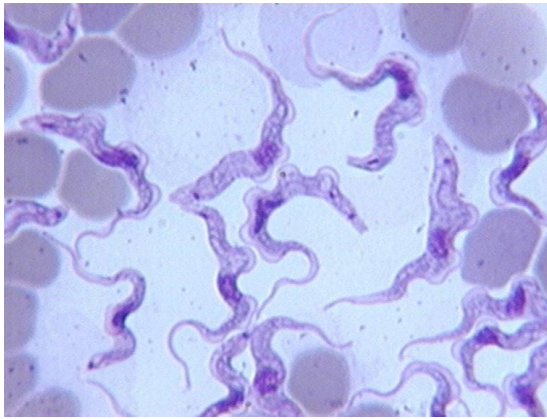
La technique décrite ci-dessus peut être également être utilisée sur des prélèvements de lymphes obtenus par ponction de nœuds lymphatiques. Habituellement, la goutte épaisse et l'étalement sur lame sont faits à partir du même échantillon. La goutte épaisse concentre plus de sang que l'étalement et par conséquent a une sensibilité diagnostique supérieure. D'un autre côté, l'étalement autorise une diagnose d'espèces. Les espèces de trypanosomes peuvent être identifiées sur frottis selon les critères morphologiques suivants :

- *Trypanosoma vivax* : 20 à 27 µm de longueur, largeur 2-4µm, membrane ondulante visible mais peu développée, portion libre du flagelle présente à l'extrémité antérieure, noyau central, extrémité postérieure arrondie, kinétoplaste gros (1,1µm) et terminal.
- *Trypanosoma brucei* est une espèce polymorphe. Deux formes différentes peuvent être distinguées, d'une part une forme mince et allongée, et de l'autre, une forme courte et trapue. Des formes intermédiaires possédant les caractères des 2 formes, longue et courte, sont souvent observées. Le cytoplasme renferme fréquemment des granules basophiles chez les exemplaires colorés. Le kinétoplaste est petit (0.5-0.7µm).
- *Trypanosoma brucei*, forme allongée et mince, dite « slender » : 17 à 30 µm de longueur sur 2,8 µm de largeur, membrane ondulante très développée et présentant 3 à 5 circonvolutions, portion libre du flagelle présente à l'extrémité antérieure, noyau central, extrémité postérieure effilée, kinétoplaste petit et subterminal. *T. evansi* se présente presque exclusivement sous la forme longue de *T. brucei*.
- *Trypanosoma brucei*, forme courte et trapue, dite « stumpy » : 17 à 22 µm de longueur sur 3,5 µm de largeur, membrane ondulante bien visible, noyau central, portion libre du flagelle absente, extrémité postérieure pointue, kinétoplaste petit et subterminal.
- *Trypanosoma congolense* : 8 à 22 µm (petite espèce) de longueur, membrane ondulante peu visible, noyau central, portion libre du flagelle absente, extrémité postérieure arrondie, kinétoplaste de dimension moyenne et sub-terminal, souvent en position latérale. Bien que *T. congolense* soit considéré comme une espèce monomorphe, une grande variabilité morphologique peut être observée. Le sous-genre *Nannomonas* comporte 2 taxons d'espèce

T. simiae et *T. congolense* qui lui-même comporte différents types ou sous-groupes (savane, forêt, kilifi, tsavo) ayant des pouvoirs pathogènes différents. Toutefois, ils ne peuvent être distingués que par la PCR. Au total 7 morphotypes de *T. congolense* ont été décrits (incluant ceux de *T. simiae*), du plus mince au plus trapu: hyperleptomorphe (très long et mince avec flagelle libre), leptomorphe (long et mince avec flagelle libre), isomorphe (mince, avec ou sans flagelle libre), pachymorphe (court et trapu, $0,25 < \text{largeur} / \text{longueur} < 0,34$, sans flagelle libre), hyperpachymorphe (très court et trapu, $0,35 < \text{largeur} / \text{longueur} < 0,70$, sans flagelle libre) et sphaeromorphe (globulaire, $\text{largeur} / \text{longueur} > 0,8$, avec ou sans flagelle libre).

-*Trypanosoma theileri* : a une taille variable allant de 15 à 70µm voire 110µm, mais située en moyenne autour de 50µm, avec une largeur importante (3-5µm), un gros kinétoplaste (1,1µm de diamètre), de forme circulaire, situé en position marginale, loin de l'extrémité postérieure (à 12-40µm de distance), proche du noyau (KI = 2.4-5.8) qui est lui-même central. La membrane ondulante est bien développée et le flagelle en partie libre. L'extrémité postérieure très effilée est droite, ou légèrement courbe, mais jamais sinueuse. A noter, une bande claire qui traverse le noyau chez *T. ingens*, un Megatrypanum voisin, trouvé chez les bovins et les antilopes. *Trypanosoma theileri* est normalement non pathogène, mais sa présence peut gêner la diagnose parasitaire. En Europe de l'ouest, *T. theileri* est normalement la seule espèce de trypanosome observée chez le bétail car elle est cosmopolite.

-*Trypanosoma lewisi* et *T. musculi* : bien que ces parasites, respectivement du rat et de la souris, ne soient pas spécialement africains (cosmopolites) et qu'ils soient absents chez le bétail, ils peuvent être rencontrés dans les cultures faites sur des rongeurs de laboratoire et doivent à ce titre pouvoir être identifiés. Leur taille est variable de 21 à 36 µm, mais située en moyenne autour de 30µm, avec une largeur importante (1,5 - 2,2 µm), un gros kinétoplaste (0,7-1 µm de diamètre), de forme ovale, situé en position marginale, loin de l'extrémité postérieure (à 5-8µm de distance), le noyau est proche de l'extrémité antérieure. Des formes très larges épimastigotes voire amastigotes peuvent être observées. Dans la forme adulte classique, le cytoplasme est en forme de C avec membrane ondulante à l'extérieur, un flagelle libre long et bien visible, un kinétoplaste gros et ovale, distant de l'extrémité postérieure et un noyau dense très antérieur.



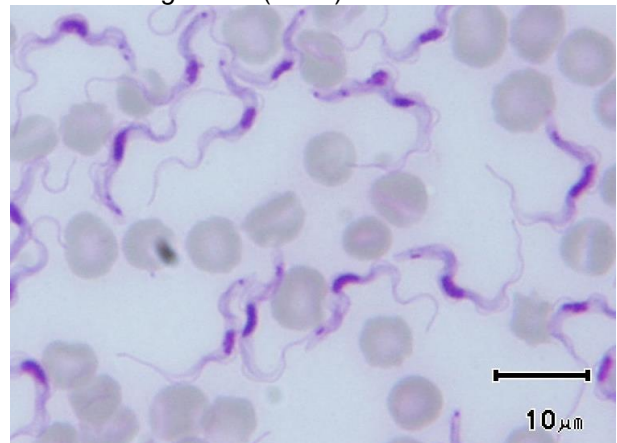
T. brucei (souris)



T. congolense (bovin)



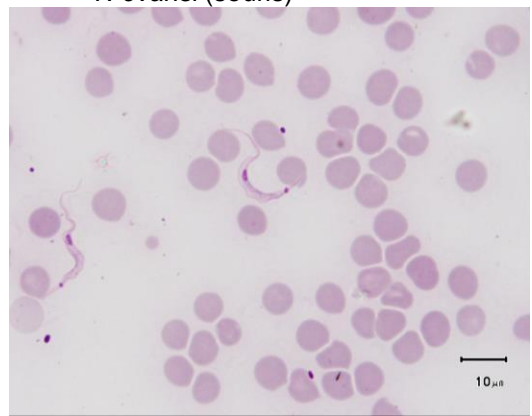
T. vivax (bovin)



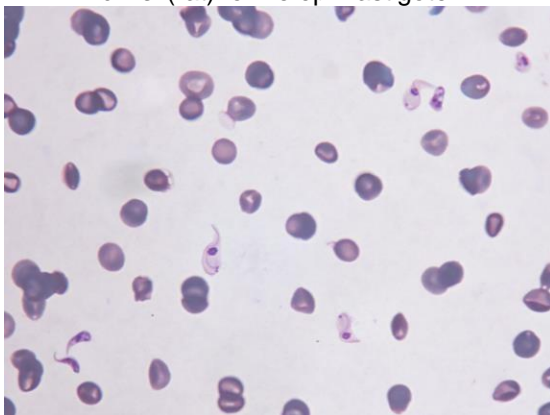
T. evansi (souris)



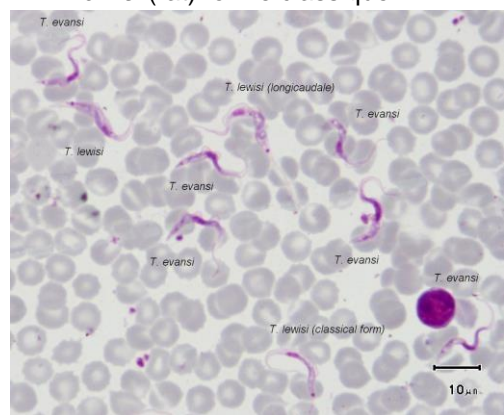
T. lewisi (rat) forme épimastigote



T. lewisi (rat) forme classique



T. congolense forêt (chien) : isomorphes (bas, hyperpachymorphes (au centre) et sphaeromorphes haut à droite).



T. lewisi et *T. evansi* chez un rat, gauche), (facilement distingués par la taille (en du kinétoplaste)

(M. Desquesnes)

2.2 Techniques de concentration parasitaire

La probabilité de détecter des trypanosomes dans un échantillon provenant d'un animal infecté dépend largement de la quantité de sang examiné et du niveau de parasitémie. La quantité de sang examiné avec les techniques d'examen direct est faible et les parasites sont souvent peu abondants dans le sang d'un animal infecté. Ces 2 facteurs contribuent à une faible sensibilité des techniques d'examen direct. La sensibilité peut être accrue en augmentant le volume de sang examiné et en concentrant les trypanosomes.

2.2.1 Technique de centrifugation hématocrite (HCT / méthode de Woo)

La technique de centrifugation en microtubes à hématocrite ou méthode de Woo (*Hematocrit centrifuge technique*, HCT) est largement utilisée pour le diagnostic des trypanosomoses animales. Elle est fondée sur la séparation selon les propriétés spécifiques de sédimentation des différents composants de l'échantillon de sang, qui sont fonctions de leur taille, leur forme et leur densité. La méthode se déroule comme suit :

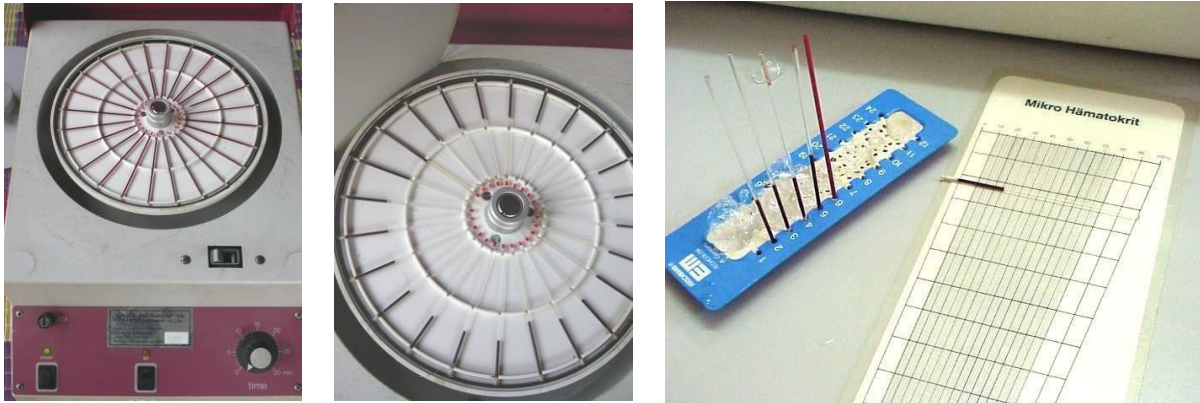
i) du sang frais de la veine auriculaire (environ 70 µl) est collecté sur tube capillaire hépariné (75 x 1,5 mm) ou rempli à l'aide d'un tube de sang sur EDTA ou héparine, dans ce cas on utilise un tube capillaire sec; en remplissant le tube capillaire on doit s'assurer qu'aucune bulle d'air ne vient fracturer la colonne de sang, sinon l'examen peut échouer ; il convient donc de remplir continûment le tube capillaire et, lorsque le niveau est proche (environ 0,5cm) de l'extrémité sèche, on obture cette dernière avec le doigt avant de planter le tube dans la plasticine.

ii) au moment où le tube capillaire est planté dans la plasticine, on enlève le doigt qui obture l'extrémité sèche afin de laisser la plasticine pénétrer dans le tube; il convient d'incliner le tube en lui appliquant une rotation pour emporter à coup sûr la plasticine, et de répéter ce mouvement une fois afin d'obturer solidement l'extrémité du tube ; à défaut, la plasticine peut être éjectée pendant la centrifugation et le sang expulsé dans la centrifugeuse. Il est également possible de refroidir la plasticine avec de la glace si la chaleur la rend trop molle.

iii) le tube capillaire scellé est placé au regard de repères numériques dans une centrifugeuse à microtube à hématocrite avec l'extrémité obturée dirigée vers l'extérieur et placée en contact du ruban de caoutchouc qui habille la périphérie du rotor de centrifugation capillaire. Pour assurer un bon équilibre, les tubes sont placés de façon symétrique.

iv) Bien visser le couvercle du rotor (sans déranger les tubes) avant de fermer la centrifugeuse, à défaut, les tubes s'éparpillent et se briseront au démarrage de la centrifugation.

v) les tubes capillaires sont soumis à une centrifugation de 9 000 **g** pendant 5 min (environ 12.000 rpm (rotor par minute));



Légende : Tubes capillaire avant (gauche) et après (centre) centrifugation, lecture de la valeur de l'hématocrite à l'aide d'un abaque (à droite)

vi) Après centrifugation la valeur de l'hématocrite est lue à l'aide d'un abaque et exprimée en % (packed cells volume : PCV). Cette donnée est importante car elle permet de sélectionner des échantillons suspects qui présentent un hématocrite faible (< 24% par exemple, chez les bovins) et les soumettre à des examens par PCR. La valeur de 24% est usuellement retenue chez les bovins ; elle correspond à la valeur moyenne de l'hématocrite dans l'espèce, diminuée de 30% ($35\% - 10,5\% = 24,5\%$); d'autres valeurs doivent être définies dans les autres espèces.

vii) une cellule de Neubauer peut être utilisée ou un porte-tube capillaire conçu à partir d'une lame porte-objet sur laquelle 2 morceaux de lames de verre de 25 x 10 x 1,2 mm sont collés, séparés de 1,5 mm pour former une gorge dans laquelle les tubes capillaires sont placés pour la lecture;

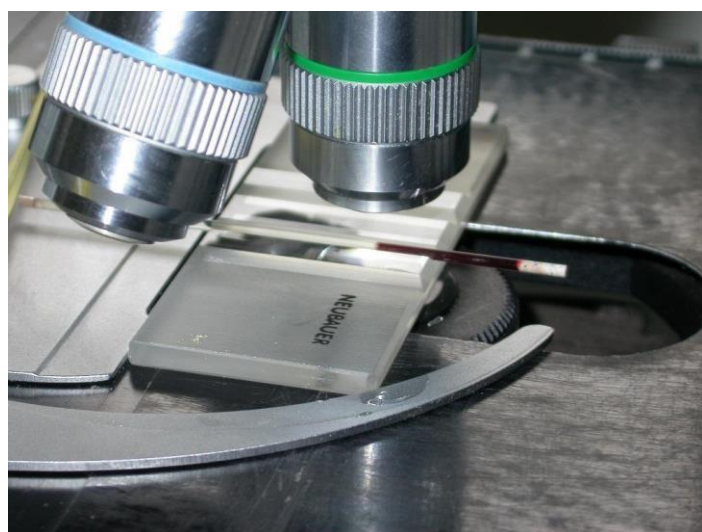
viii) le tube placé dans la gorge peut être maintenu par un ruban élastique faisant le tour du plateau porte objet du microscope. Le *buffy coat* est placé grossièrement sous l'objectif. Le condenseur de lumière du microscope doit être abaissé fortement et éventuellement le diaphragme fermé pour accroître la réfringence des cellules et les rendre visibles, les trypanosomes et les globules blancs étant par nature presque transparents. Apercevoir un liseré gris-noir autour des globules blancs indique que le réglage du microscope est correct pour cet examen.

ix) l'interface plasma/globules blancs (*buffy coat*) est examiné lentement en faisant tourner le tube. Les mouvements des trypanosomes peuvent être détectés en premier en utilisant l'objectif de X 40 avec une distance telle qu'elle est en adéquation avec la profondeur de champ au travers du tube capillaire. Pour imposer des rotations continues au tube capillaire on peut utiliser un crayon à papier (section hexagonale) coincé par l'élastique sur le bord gauche du plateau porte-objet ; lorsque le crayon est tourné le ruban élastique impose une rotation au tube capillaire. De la sorte on peut explorer toute la périphérie du tube capillaire, et en actionnant la vis micrométrique, on peut explorer une partie de la profondeur du tube après chaque mouvement de rotation (environ 90° de rotation appliqués à chaque mouvement permet d'explorer la circonférence du tube en 4 rotations partielles).

La technique de centrifugation en microtube à hématocrite est plus sensible que les techniques d'examen direct. Dans le cas d'infections à *T. vivax*, la sensibilité de la méthode de Woo approche 100 % quand la parasitémie est supérieure à 700 trypanosomes/ml de sang. La sensibilité décroît à 50 % quand la parasitémie est comprise entre 60 et 300 trypanosomes/ml de sang. Les trypanosomes deviennent très difficiles à détecter quand la parasitémie est inférieure à 60 trypanosomes/ml de sang ; on peut donc considérer que la technique permet globalement de détecter des parasitémies supérieures à 200 trypanosomes/ml. L'identification de l'espèce de trypanosome est difficile. Comme la vitesse de sédimentation de *T. congolense* est proche de celle des globules rouges, les parasites sont souvent observés en dessous du *buffy coat* ou dans la couche des globules blancs. Pour augmenter la séparation globules rouges / parasites et accroître la sensibilité, pour *T. congolense*, la densité propre des globules rouges peut être augmentée par addition de glycérol.



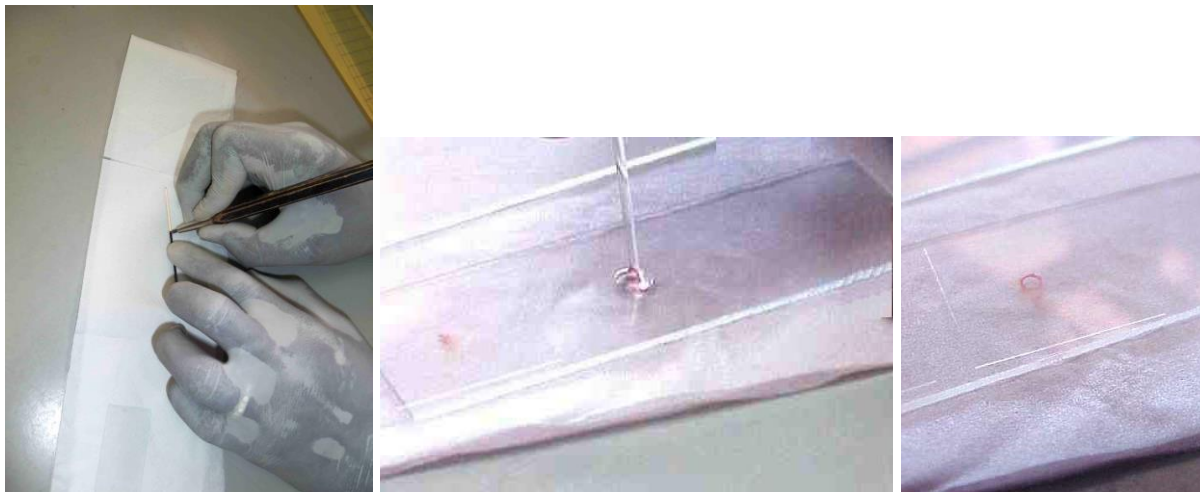
Microscope équipé d'un à fond noir



Dispositif d'exploration microscopique du tube système capillaire à l'interface buffy-coat/plasma

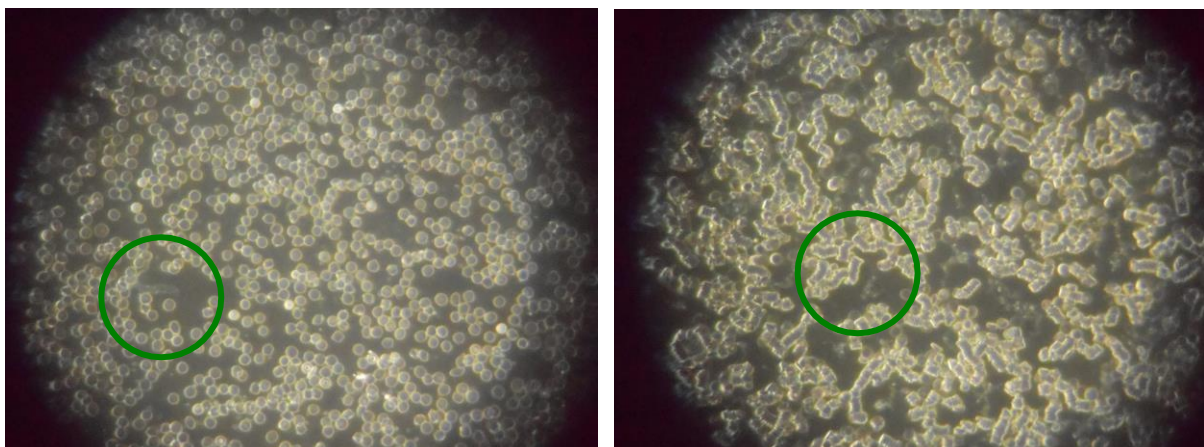
2.2.2 Technique du *buffy coat* en contraste de phase ou sur fond noir

Les premières étapes de la technique du *buffy coat* ou méthode de Murray sont identiques aux étapes i) à vi) décrites ci-dessus après lesquelles le tube est coupé avec une pointe diamant, 0,5 mm en dessous du *buffy coat*, en y incluant la couche supérieure des globules rouges. Le *buffy coat* et la couche supérieure des globules rouges sont déposés sur une lame et recouverts d'une lamelle (22 x 22 mm). Cette étape est cruciale ; pour être réussie, on doit apercevoir le *buffy coat* sur la lame avant de recouvrir avec la lamelle ; ce dernier étant assez dense, forme un amas de cellules qu'il convient d'écraser avec la lamelle pour éviter qu'elle reste en porte-à-faux. Si le *buffy coat* n'est pas visible, c'est qu'il est resté accroché au bord du tube capillaire ; l'examen sera impossible. Pour ces raisons l'effet « technicien » est assez fort, certains parvenant facilement à déposer le *buffy coat*, d'autres n'y parvenant pas bien ; pour les mêmes raisons la répétabilité du test est limitée.



Section du tube à la pointe diamant, dépôt du *buffy coat* et recouvrement avec la lamelle

L'observation microscopique est réalisée avec le condenseur de lumière en position *dark ground* et à l'aide un objectif *Phase contrast* (PhaCo) X40 ou X50 pour obtenir un grossissement X400 ou X500 avec des oculaires X10.



T. lewisi faible parasitémie

T. evansi très forte parasitémie

Environ 200 champs de la préparation sont examinés en vue de déceler des trypanosomes mobiles, au grossissement X400 d'un microscope à fond noir ou à contraste de phase. A l'instar de l'examen direct de la goutte de sang à l'état frais, les espèces de trypanosomes peuvent être identifiées en référence aux critères suivants :

- *Trypanosoma vivax* : grand, extrêmement mobile, traverse rapidement le champ, s'arrêtant occasionnellement.
- *Trypanosoma brucei* : dimensions variées, mouvements rapides dans des zones limitées, poches de lumière circulant le long de la membrane ondulante au fur et à mesure des mouvements du parasite.
- *Trypanosoma congolense* : petit, vermiforme, peu mobile, adhère aux globules rouges par son extrémité antérieure.
- *Trypanosoma theileri* : plus de 2 fois les dimensions des trypanosomes pathogènes, tend à tourner ou rester sur place comme si il était collé au verre, fouette le milieu avec son extrémité postérieure effilée dont l'extrémité semble rigide.

Comme la technique de centrifugation des microtubes à hématocrite, la technique du *buffy coat* est plus sensible que les techniques d'examen direct. La sensibilité de la méthode du *buffy coat* peut être augmentée en utilisant la technique de la double centrifugation. Une quantité totale de 1500 µl de sang est centrifugée, puis le *buffy coat* est recueilli dans un tube capillaire à hématocrite et centrifugé de nouveau. Le « *buffy coat de buffy coat* » est examiné. Cette méthode est toutefois plus couteuse et chronophage, et elle présente encore davantage de variations entre techniciens car la récolte du *buffy coat* est délicate ; elle est donc rarement utilisée.

En comparaison avec la technique de Woo, la technique de Murray présente l'avantage supplémentaire de pouvoir fixer et colorer les préparations pour une identification précise des espèces et pour un enregistrement permanent, toutefois il est délicat de retirer la lamelle sans perdre ou endommager le matériel biologique, et la lecture de l'échantillon fixé est moins sensible que celle de l'échantillon frais. Un protocole mixte peut être appliqué avec recherche de parasite par la technique de Woo, et, en cas de positivité, réalisation d'un étalement de *buffy coat* pour coloration et confirmation de l'identification d'espèce.

La centrifugation en microtube et la technique du *buffy coat* donnent des résultats directs et peuvent être utilisées pour contrôler de grands effectifs d'animaux. Elles requièrent un équipement spécialisé et de l'électricité rendant ces techniques plus onéreuses que l'examen à l'état frais, mais ces inconvénients mineurs sont largement compensés par une sensibilité accrue. Les 2 techniques s'appuient sur la détection de trypanosomes vivants et

Mobiles. Parce que les trypanosomes peuvent perdre leur vigueur et mourir rapidement une fois le prélèvement effectué, les échantillons collectés en tubes capillaires doivent être refroidis immédiatement et ne pas être chauffés dans la centrifugeuse à hématocrite ou sur le plateau du microscope ou pendant une longue attente entre centrifugation et lecture. Les échantillons doivent donc être préparés et examinés aussitôt que possible après la collecte et leur préparation, si possible dans les 2 à 4 heures qui suivent la collecte et les quelques minutes qui suivent la centrifugation.

La centrifugation en microtube à hématocrite et la technique du *buffy coat* sont particulièrement utiles dans la mesure où l'hématocrite (PCV) peut être évalué en même temps. Pour déterminer le PCV après centrifugation, le tube capillaire à hématocrite (contenant du sang de la veine auriculaire ou jugulaire) est placé dans un lecteur à hématocrite. La hauteur de la colonne des globules rouges est exprimée comme un pourcentage du volume total de sang. Mesurer le PCV est utile pour déterminer l'importance de l'anémie. L'anémie peut être causée par d'autres facteurs que les trypanosomoses. Elle reste néanmoins l'un des indicateurs les plus importants des trypanosomoses du bétail. Comme les trypanosomoses sont un problème de troupeau, le niveau de l'hématocrite d'un troupeau est influencé par le nombre d'animaux infectés par des trypanosomes et peut être utilisé pour apprécier l'importance de la maladie. Le PCV moyen est aussi influencé par l'âge et le niveau de susceptibilité génétique du bétail. Pour des raisons économiques, afin de réduire le nombre d'échantillons à traiter par la PCR, on peut s'appuyer sur la valeur de l'hématocrite individuel pour sélectionner des échantillons suspects qui seront soumis électivement au diagnostic par PCR. Selon les cas, le seuil sous lequel la suspicion d'infection est portée peut être fixé entre 24% et 20% d'hématocrite. Lorsque la valeur de l'hématocrite est établie avant lecture microscopique des tubes, ces derniers doivent impérativement être aussitôt replacés à la verticale dans l'attente de la lecture ; à défaut on constatera la désorganisation du buffy coat et la lecture microscopique sera altérée, voire impossible.

2.2.3 Échange d'anions

La technique de chromatographie en minicolonne d'échange d'anions est largement utilisée pour le diagnostic de la maladie du sommeil humaine causée par *T. b. gambiense*. Le sang est passé au travers d'une colonne de diéthyl amino-éthyl (DEAE)-cellulose équilibrée par une solution tampon (PBS) et d'une teneur ionique adaptée au sang de l'espèce examinée. Comme les globules rouges sont chargés plus négativement que les trypanosomes, ils sont retenus dans la colonne, contrairement aux trypanosomes qui passent au travers avec l'éluat.

Celui-ci, une fois collecté, est centrifugé pour concentrer les trypanosomes et les examiner au microscope. Un volume de sang important peut ainsi être examiné pour chaque animal et la méthode possède une sensibilité élevée. Néanmoins, la technique est chronophage et n'est donc pas adaptée à l'examen d'un grand nombre d'animaux. En outre elle est très couteuse du fait du prix élevé du diéthyl amino-éthyl de cellulose (DE52) et du temps passé pour sa préparation.

Voir le site <http://www.sleeping-sickness.ird.fr/diagnostic61.htm>

En médecine vétérinaire, la méthode n'est employée que pour séparer les trypanosomes cultivés sur rat (ou autre) en vue de préparer les antigènes utilisés en technique ELISA (voir ci-après, partie 3).

2.3 Techniques de culture

Technique d'enrichissement par excellence, la culture est pratiquée soit *in vivo*, de préférence chez des animaux de laboratoire (rats ou souris), mais parfois sur des hôtes d'élevage quand les souches ne poussent pas sur rongeurs (exemple des *T. vivax* d'Amérique Latine) soit *in vitro*, ce qui est préférable pour des raisons d'éthique, mais pas toujours réalisable.

2.3.1 Culture *in vitro*

La culture *in vitro* des trypanosomes est souvent délicate, réclame des protocoles adaptés et présente des résultats très variables selon les espèces, voire les souches de trypanosomes (biais de sélection); elle demeure une méthode couteuse. Pour ces raisons, les techniques de culture *in vitro* sont très peu utilisées, en particulier dans le domaine vétérinaire où la seule espèce présentant un avantage comparatif est *T. theileri*, une espèce non pathogène, présente en très faible quantité dans le sang mais se cultivant assez facilement. Toutefois, des efforts de recherche ont été développés pour adapter à la culture plusieurs espèces de trypanosomes.

Un procédé de culture *in vitro* de *T. brucei* a été décrit, sa réussite est irrégulière ; la méthode nécessite un équipement sophistiqué, produit des résultats après un temps important et n'est pas adaptée à une utilisation à grande échelle. Une trousse de diagnostic (KIVI) pour l'isolement *in vitro* des trypanosomes a présenté un intérêt pour l'isolement et l'amplification de toutes les espèces de *T. brucei* chez l'homme, les animaux domestiques et sauvages. La valeur de l'épreuve pour l'isolement de *T. congolense* et de *T. vivax* n'est pas

Connue. S'agissant de la culture de formes procycliques de trypanosomes, la différenciation spécifique n'est pas possible et l'intérêt conséquemment plus limité en médecine vétérinaire.

En diagnostic de routine, seule l'espèce *T. theileri* pourrait être détectée avec une bonne sensibilité par culture *in vitro*, toutefois, étant donné qu'elle n'est pas considérée comme pathogène, cette culture est rarement effectuée. Il faut noter que les trypanosomes des rongeurs *T. lewisi* et *T. musculi* peuvent être cultivés *in vitro* pour la production d'antigènes.

2.3.2 Inoculation à l'animal

L'inoculation de sang à des rongeurs, habituellement souris ou rats, est particulièrement utile pour révéler des infections inapparentes. Les animaux de laboratoire reçoivent, par voie intrapéritonéale, 0,1 à 0,5 ml (en fonction de la taille du rongeur) de sang fraîchement collecté sur anticoagulant. Une immunodépression artificielle de l'animal receveur par irradiation ou par médicament type cyclophosphamide (200mg/Kg) (Endoxan®) augmente considérablement les chances d'isoler le parasite. Une ponction de sang est réalisée 3 fois par semaine par prélèvement de sang à l'extrémité de la queue des rongeurs, pendant 2 semaines à 2 mois. Le sang collecté est déposé sur une lame, recouvert d'une lamelle et examiné directement au microscope à l'état frais (de préférence en contraste de phase au grossissement X400 ou X 500). Le sous-genre est facilement identifié comme indiqué au point 1.1.1. Certaines espèces comme *T. evansi* peuvent pousser très rapidement et tuer les rongeurs en quelques jours ; il est donc nécessaire d'assurer un suivi rapproché des animaux inoculés en particulier quand on ignore l'identité de la ou des espèces qui peuvent être isolées.



Inoculation intrapéritonéale de sang infecté à une souris (volume 0,1 à 1ml) et à un rat (0,5-1,5ml)

L'inoculation à l'animal est plus sensible que l'examen direct à l'état frais. Néanmoins, la méthode n'est pas pratique; elle est chère et le diagnostic n'est pas immédiat. La méthode est très sensible pour la détection des infections à *T. b. brucei*. Cependant, quelques souches de *T. congolense* ne sont pas facilement cultivables et *T. vivax* infecte rarement les animaux de laboratoire, à l'exception de quelques souches poussant spontanément. En outre, l'inoculation à l'animal doit être évitée parce qu'elle soulève des problèmes éthiques liés au bien-être animal.

Pour ce qui concerne le diagnostic, cette méthode doit être strictement réservée à :

- l'isolement de souches parasitaires d'un intérêt particulier (suspicion de chimiorésistance, pathogénicité prononcée, etc) ;
- la détection très sensible et l'identification de l'infection chez des animaux suspects vivants dans une zone non infectée, ou étant destinés à entrer dans une zone non infectée, ou encore à des animaux de grande valeur étant amenés à circuler régulièrement à l'international (chevaux de course par exemple).

La technique est en revanche très utile pour la production massive de parasites chez des rats en vue de la préparation des antigènes, que ce soit pour l'IFI, l'ELISA ou le CATT.

2.4 Sensibilité comparée des tests de détection parasitologique

Les tests de détection parasitologique présentent des sensibilités analytiques différentes (la sensibilité analytique est la plus petite quantité de parasites détectable dans un échantillon, mesurée généralement en nombre de parasites/ml de sang). A titre d'illustration, le tableau 1 récapitule les caractéristiques et les ordres de grandeur de la sensibilité analytique des tests pour la détection de parasitémies exprimées en nombre de trypanosomes par ml de sang. Il précise les coûts relatifs des tests et divers autres avantages ou inconvénients (reproductibilité, chronophagie, etc). La sensibilité analytique peut être calculée par rapport à une valeur donnée de parasitémie, en revanche, la sensibilité d'un test sur le terrain, qui est la probabilité d'obtenir une réponse positive par une technique de diagnostic chez un sujet infecté, dépendra en outre du stade de l'infection, de l'état immun de l'hôte, de l'espèce parasitaire, de la susceptibilité de l'hôte..., et devrait être réestimée dans les populations étudiées.

Dans le tableau qui suit la sensibilité analytique est indiquée par un seuil en dessous duquel l'examen sera probablement négatif.

Tableau 1 : Comparaison des tests de détection parasitologique

Technique	Sensibilité (parasites/ml)	Spécificité	Avantages	Désavantages	Indications
Observations microscopiques					
Examen direct de sang	10 ⁵ - 10 ⁶	faible	simple, rapide, économique	faible sensibilité (Se)	<i>Trypanosoma</i> sp.
Goutte épaisse (Giemsa)	10 ⁴ -10 ⁵	faible	simple, économique	retardé, faible sensibilité	<i>Trypanosoma</i> sp.
Frottis sanguin coloré	10 ⁵ -	sous-genre	Spécifique (Sp), simple, économique	retardé, faible sensibilité	<i>Trypanosoma</i> sp.
HCT (Woo)	10 ² - 10 ³	sous-genre	Se, Sp, rapide, fournit l' Hématocrite (Ht)	doit être fait rapidement	<i>Trypanosoma</i> sp.
BCM (Murray)	10 ² - 10 ³	sous-genre	Se, Sp, Ht	Urgent et chronophage	<i>Trypanosoma</i> sp.
QBC Quantitative Buffy coat	10 ² - 10 ³	faible	Ht	Coûteux abandonné	<i>Trypanosoma</i> sp.
Lyse / Centrifugation	10 ² - 10 ³	faible	Ht	Long, coûteux abandonné	<i>Trypanosoma</i> sp.
Mini-colonne DE52	10 ² -10 ³	sous-genre	Isolement de parasites	Long et coûteux	<i>Trypanosoma</i> sp.
Centrifugation en silicone	10 ² -10 ³	sous-genre	Isolement de parasites	Long, coûteux abandonné	<i>Trypanosoma</i> sp.
<i>In vivo</i> culture					
Inoculation rongeurs	10- 10 ³	espèce ou genre	sensibilité	Incertain, long, coûteux, éthique	<i>T. evansi</i> , <i>T. cruzi</i> , <i>T. equiperdum</i> ?
<i>In vitro</i> culture					
Hémoculture	10- 10 ²	espèce ou genre	Sensibilité pour certaines espèces	Long, coûteux différencié	<i>T. theileri</i> <i>T. cruzi</i>

Se : sensibilité, **Sp** : spécificité ; **Ht** : valeur de l'hématocrite (%)

3. Détection moléculaire

Outre la mise en évidence directe des parasites au microscope, des méthodes indirectes permettent de détecter les infections par des trypanosomes, en mettant en évidence spécifiquement leurs protéines ou leur ADN. Bien que la démonstration de ces molécules ne constitue pas en soi la preuve d'une infection active (une infection active est définie par la présence de trypanosomes vivants dans l'hôte au moment du prélèvement), étant donnée l'élimination rapide des protéines et de l'ADN parasitaire du sang des hôtes après la mort des parasites (ce délai d'élimination étant estimée à 24-48H00 pour l'ADN et à quelques jours pour les protéines), on peut généralement considérer que la détection de l'ADN est synonyme d'infection active, en particulier si l'anamnèse ne fait pas état de traitements trypanocides récents. A cette réserve près, on considère donc ces deux méthodes comme des techniques de détection d'infections actives.

3.1 Épreuves de détection des antigènes de trypanosomes

Des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) de détection d'antigènes pour les trypanosomoses ont été décrites, reposant sur des sérums immuns ou des anticorps monoclonaux ; les évaluations de terrain de ces tests ont donné des résultats variables, généralement non satisfaisants. Les ELISA-Ag basés sur des anticorps monoclonaux ont présenté notamment un manque de spécificité entre espèces de trypanosomes, mais également des croisements avec d'autres agents non identifiés qui ont été responsables de taux élevés de faux positifs en zone non endémique. La sensibilité s'est également avérée très décevante, jusqu'à être inférieure à 15% dans certains cas d'infections à *T. vivax*. La détection des antigènes par ELISA n'est donc pas utilisée en diagnostic de routine des trypanosomoses (Desquesnes, 1996).

3.2 Épreuves de détection de l'ADN des trypanosomes

Plusieurs méthodes de détection de l'ADN des trypanosomes par PCR ont été développées comme outils de diagnostic des infections à trypanosomes chez les hôtes mammifères, homme ou animal, aussi bien que chez la mouche tsé-tsé. Des séquences répétées (ADN satellite) et spécifiques d'ADN nucléaire peuvent être amplifiées ; leur amplification permet la détection et l'identification du sous-genre Trypanozoon (*T. brucei* spp, *T. evansi* et *T. equiperdum*), de l'espèce *T. vivax*, de plusieurs types de *T. congolense* (savane, forêt et

Kilifi) et d'autres espèces de *Nanomonnas* (*T. simiae*, *T. godfreyi*). Les amorces disponibles pour les différents sous-genres, espèces et types de trypanosomes des mammifères sont présentées dans le Tableau 2. Certaines amorces permettraient de distinguer *T. evansi* de *T. brucei*, mais les études n'ayant pas été exhaustives, aucun jeu d'amorce n'est à ce jour universellement considéré comme permettant de faire cette distinction; en outre la distinction avec *T. equiperdum* est encore plus délicate et controversée. En effet, l'amplification du gène codant pour la rhode protéine RoTat1.2 a été proposé pour distinguer *T. evansi* qui le possède, de *T. equiperdum* qui en est dépourvu ; malheureusement, cette distinction ne prend pas en compte l'existence de *T. evansi* groupe B mis en évidence en Afrique de l'Est qui ne possède pas ce gène; certains parasites peuvent même posséder le gène sans l'exprimer. Enfin, une sonde est disponible pour la détection des 3 sous-espèces de *T. brucei*, mais la méthode est peu usitée car lourde à mettre en place.

Par la suite des méthodes de diagnostic ont été développées par amplification de l'ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*) de l'ADN ribosomal ; elles permettent l'identification des mêmes taxons, en infection simple ou mixte, en utilisant une seule épreuve. Les avantages majeurs sont le coût qui est réduit pour un nombre de valence non-limité, et la possibilité d'amplifier toutes les espèces de trypanosomes, donc éventuellement des espèces non connues ou non recherchées. En revanche, la sensibilité du test est plus faible que celles des PCR monospécifiques et l'observation de certains produits de taille mal déterminée peut être d'interprétation délicate voire impossible.

Plus récemment, une méthode d'amplification à température constante (LAMP) a été développée et appliquée à plusieurs espèces de trypanosomes, toutefois ces méthodes ne sont pas encore suffisamment validées pour une application pratique sur le terrain.

Au préalable de l'application des techniques de PCR, des étapes importantes sont la collecte et la conservation, voire la concentration des parasites, et la préparation des échantillons voire la purification de l'ADN pour permettre les réactions de PCR.

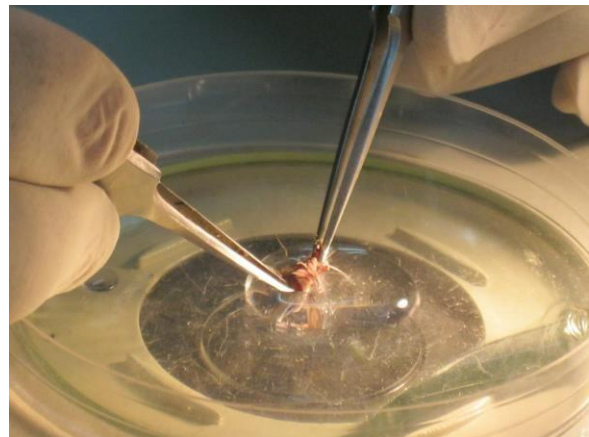
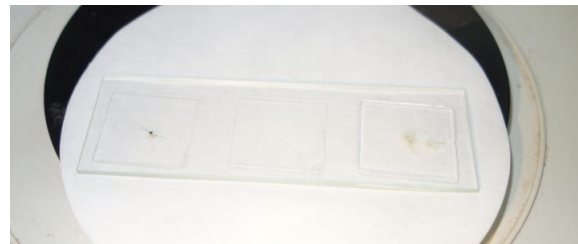
3.2.1 Préparation des échantillons pour la PCR

Les échantillons biologiques prélevés sur les hôtes ou vecteurs contenant des éléments capables d'inhiber les réactions de PCR, une étape importante et préalable à l'application des méthodes d'amplification moléculaire de l'ADN est la préparation des échantillons. Cette étape est cruciale, et variable selon la nature de l'échantillon de départ.

Les échantillons peuvent provenir d'un mammifère ou d'un insecte, être conservés au froid ou déposés sur papier filtre, ou encore dans de l'alcool ; de fait, de nombreux protocoles existent qui nécessitent d'être adaptés selon les diverses étapes ultérieures du diagnostic.

Echantillons de glossines :

Les glossines sont identifiées puis disséquées dans quelques gouttes de liquide physiologique et 3 organes sont récoltés séparément pour examen microscopique et/ou PCR.



Dissection de glossines et préparation du proboscis, des glandes salivaires et de l'intestin moyen

- Proboscis de glossine : les organes sont disséqués et placés dans une goutte de liquide physiologique pour observation microscopique, puis/ou collectés dans 30 μ l d'eau distillée ; à ce stade ils peuvent être congelés jusqu'à la préparation. Au dégel, on triture l'échantillon à l'aide d'un cône, on ajoute 30 μ l de Chelex 5% puis on applique le protocole Chelex (voir ci-après).

- Glandes salivaires et intestins de glossines : ils sont collectés et placés dans une goutte de liquide physiologique pour observation microscopique, puis/ou placés respectivement dans des volumes de 30 et 50 μ l d'eau distillée. Avec ces échantillons d'une richesse moléculaire modérée, on triture, homogénéise et dilacère les échantillons en les pipétant plusieurs fois, puis on ajoute un volume équivalent de Chelex 5% (30 μ l pour les glandes salivaires et 50 μ l pour les intestins) et l'on applique le protocole de préparation au Chelex (voir ci-après).

Protocole de préparation au Chelex : les échantillons suspendus dans le Chelex 5% (volume a volume) sont passés au vortex puis placés 1 heure à 56°C, puis passés au vortex et placés ensuite 30 minutes à 95°C, puis passés au vortex et centrifugés pendant 2 minutes à 5000 rpm ; l'échantillon est pipeté en surface pour éviter que les particules débris et billes de résine n'obturent le cône et/ou n'interfèrent dans la PCR.

Si l'examen par PCR n'est pas réalisé immédiatement après la préparation, il convient de pipeter la totalité du surnageant (en évitant les billes de Chelex) pour le placer dans un microtube et le conserver congelé à -20°C jusqu'à réalisation des PCR.

Echantillons sanguins :

Le sang collecté sur anticoagulant est centrifugé à haute vitesse (> 9000 rpm, 5 minutes) pour accélérer la décantation des parasites et des globules sanguins comme il a été décrit pour les méthodes d'enrichissement préalables à l'examen microscopique; les trypanosomes sont ainsi concentrés au-dessus du buffy coat (couche leucocytoplaquettaire).



Section du tube capillaire et récolte du buffy-coat, ou pipetage à partir d'un tube de prélèvement

Les buffy coats peuvent être récoltés soit à partir de tubes capillaires (environ 10-15µl d'échantillons de buffy coat déposés sur 30µl d'eau distillée) soit à partir de tubes ou microtubes (environ 100-150µl de buffy coat) qui peuvent être ensuite préparés selon diverses méthodes pour optimiser la sensibilité des tests de PCR.

- Sang ou buffy-coats déposés sur papier filtre : le sang ou le buffy coat sont déposés sur papier filtre (par exemple un confetti) ; ils peuvent être élués avec un tampon d'éluion Tris-EDTA (TE), ou mieux, directement à l'aide du Chelex (voir ci-après).

Des études de sensibilité ont été réalisées pour comparer diverses méthodes de préparation des échantillons de sang infecté avec des séries de dilutions de parasites. Des études récentes menées avec un parasite du sous-genre *Trypanozoon* ont révélé que la méthode classique phénol-chloroforme demeure la meilleure méthode tant pour la sensibilité des tests

obtenus que pour la qualité, l'intégrité et la durée de conservation de l'ADN récolté (Pruvot et al 2012). Toutefois, compte tenu du caractère chronophage de la méthode et de la menace que représente la manipulation de produits toxiques (phénol et chloroforme), d'autres méthodes, plus rapides et parfois économiques ont fait leurs preuves, comme celle de l'utilisation du Chelex (Walsh et al., 1991; Penchenier et al., 1996). D'autre part, il existe de nombreux kits commerciaux permettant de préparer ou récolter l'ADN, mais le coût est généralement prohibitif, surtout pour un diagnostic de routine utilisant des lots importants d'échantillons. En outre, leur supériorité diagnostique est rarement démontrée, et la durée de conservation des ADN ainsi préparés est assez brève (quelques semaines) ce qui affecte la répétabilité des examens en cas de besoin.

Préparation au Phénol-chloroforme : Placer 500µl de solution dénaturante (thiocyanate de guanidine) dans un microtube de 1,5ml et ajouter 100µl de buffy coat (ou de sang à défaut), agiter au vortex à haute vitesse pendant 5 minutes. Ajouter 150µl de chloroforme et 150µl de phénol, placer au vortex à haute vitesse pendant 5 minutes, puis centrifuger à 13.000 rpm (15,493 g) pendant 5 minutes. Collecter le surnageant et le placer dans un nouveau tube. Ajouter à nouveau 150µl de chloroforme et 150µl de phénol, placer au vortex à haute vitesse pendant 5 minutes, puis centrifuger à 13.000 rpm pendant 5 minutes. Collecter 400µl de surnageant et placer dans un nouveau tube de 1,5ml et ajouter 1ml d'éthanol absolu et placer à -20°C une nuit pour la précipitation. Centrifuger à froid pendant 10 minutes à 13.000 rpm puis éliminer le surnageant. Laver le peller 2 fois consécutives en ajoutant de l'éthanol à 75% et centrifugeant à 13.000 rpm pendant 5 minutes. Éliminer le surnageant. Laisser sécher le pellet à l'air libre. Re-suspendre dans 50µl de tampon tris-EDTA (TE). Cette méthode permet de concentrer l'échantillon de départ d'un volume de 100µl à un volume final d'ADN dans 50µl.

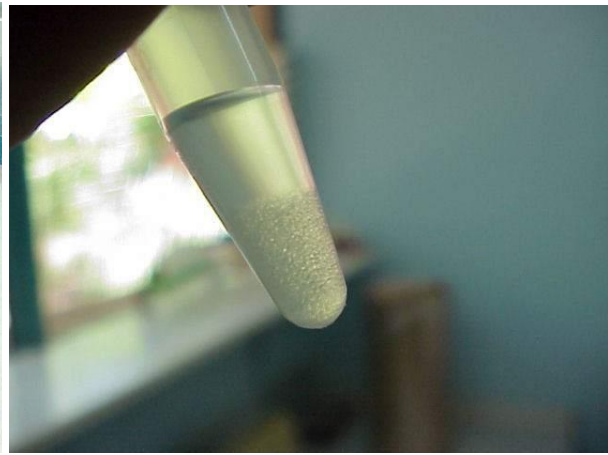
Préparation au Chelex : le sang ou les buffy-coats sont conservés congelés. L'échantillon, est dégelé ; on lui ajoute un volume équivalent de chelex 100 à 5% (suspension à 5% de Chelex 100 dans de l'eau distillée) puis il est placé 1 heure à 56°C, puis passé au vortex et placé 30 minutes à 95°C, puis passé au vortex et centrifugé pendant 2 minutes à 5000 rpm ; l'échantillon est ensuite pipeté en surface pour éviter que les débris sanguins et les billes de résine n'obturent le cône et/ou n'interfèrent dans la PCR.

Cette méthode peut également être appliquée au sang séché récolté sur papier filtre. Dans ce cas on découpe le papier filtre en petits morceaux (de l'ordre de 2-3mm²) dans un microtube, on ajoute un volume d'environ 2µl/mm² (soit 50µl de Chelex pour un confetti de 25mm², ou encore 150-200µl de Chelex pour un centimètre carré de papier filtre, puis on réalise la préparation classique au Chelex (1h à 56°C, puis 30min à 95°C, puis centrifugation)

De même, des buffy coat déposés sur papier filtre sous un volume de 10-20 μ l (provenant d'un tube capillaire) ou de 50-100 μ l (provenant d'un microtube de 0.5ml) peuvent être traités avec des volumes respectifs de 100 et 200 μ l de Chelex100 à 5%.



Préparation au Chelex



Billes de Chelex en suspension

3.2.2 PCR monospécifique

Outre l'importance de la méthode de préparation des échantillons biologiques évoquée ci-avant, la sensibilité des tests de PCR dépend aussi de l'affinité des amorces de la PCR pour leurs séquences cibles, mais aussi et surtout du caractère hautement répétitif ou non de ces séquences. Ainsi la détection des séquences d'ADN satellite est très sensible puisqu'elles sont répétées 10 à 20.000 fois dans le génome, alors que celle des ITS1 est moyenne (200 à 500 répétitions) et celle d'autres séquences, faible ou unique.

Les amplifications de l'ADN par PCR standard sont réalisées en utilisant un mélange renfermant du Tris/HCl, MgCl₂, KCl, les 4 désoxyribonucléotides triphosphates, les amorces, la matrice d'ADN et la Taq polymérase. Les échantillons sont incubés pour plusieurs cycles à des températures différentes. Les résultats de la PCR sont soumis à électrophorèse sur agarose. Les gels sont ensuite colorés au bromure d'éthidium ou à l'aide d'autres colorants permettant la visualisation de l'ADN sur les gels d'électrophorèse (type Gelstar ou SYBR green).

Avec des amorces monospécifiques, la PCR n'est positive que si le produit d'amplification a la taille exacte qui est attendue. Si d'autres produits sont visibles, ils sont considérés comme non spécifiques et le résultat négatif (voir échantillon cerclé de rouge sur la photo ci-après). Ainsi, il est fréquemment observé avec les amorces TCF et TCS des produits non spécifiques avec les ADN respectifs de *T. congolense* savane et *T. congolense* forêt.

Une composition classique de master mixed est la suivante : tampon Tris (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) + 200 µM dNTP + 1 µM de chaque amorce + 0,5 UI de Taq Pol par réaction. Une feuille excel pré-programmée permet de calculer tous les volumes de solution stock en fonction des volumes réactionnels et du nombre de réactions souhaité (voir fiches de laboratoire en annexe).



Préparation sous hotte;
d'électrophorèse sur gel



Thermocycleur



Micro-onde et appareil



Appareil de visualisation des gels (UV)



Gel d'électrophorèse avec 3 amorces différentes un produit non spécifique est visible sur le gel (cercle de rouge)

La procédure est extrêmement sensible mais des faux positifs peuvent être observés comme le résultat d'une contamination d'échantillons avec d'autres ADN. L'épreuve requiert un équipement spécialisé et du personnel hautement qualifié, aussi il n'est pas adapté pour de nombreux laboratoires. Les faux négatifs peuvent être observés quand la parasitémie est très faible (inférieure à 1 trypanosome/ml de sang), ce qui se produit fréquemment dans les infections chroniques, cela peut également se produire quand la spécificité des séquences amplifiées est trop élevée de sorte que tous les isolats d'une espèce particulière de trypanosome ne peuvent pas être reconnus (par exemple la séquence de la VSG RoTaT1.2 qui n'est pas présente chez les *T. evansi* de type B). Une plus grande sensibilité des tests

est obtenue en préparant l'ADN à partir d'un échantillon enrichi par centrifugation (buffy coat). La collecte des échantillons peut être simplifiée en adaptant l'épreuve à du sang ou le *buffy coat* récolté sur papier filtre. Un grand nombre d'échantillons peut être analysé en une fois, rendant ainsi la PCR adaptée à des suivis à plus grande échelle. Néanmoins, aujourd'hui, le coût de la PCR est encore très élevé pour une utilisation de cette épreuve en routine. Les diverses amorces et cycles thermiques utilisés pour les diagnostics spécifiques sont indiqués au tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques et séquences des principales amorces pour le diagnostic des trypanosomes par PCR mono-spécifiques

Spécificité	Nom et séquences des primers	Localisation	Taille des produits (bp)	T° hybrid	REF
<i>T. vivax</i>	TVW 1 : CTGAGTGCTCCATGTGCCAC	ADN	150	55	Masiga et al., 1992 Int J Parasitol
	TVW 2 : CCACCAGAACACCAACCTGA	satellite			
<i>T. brucei s.l.</i>	TBR1: 5' CGAATGAATATTAACAATGCGCAG 3'	ADN	173	55	Moser et al., 1989 Parasitology
	TBR2: 5' AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC 3'	satellite			
<i>T. congo savane</i>	TCS1: 5' CGAGCGAGAACGGGCAC 3'	ADN	321	55	modifiés de Moser et al 1989 Parasitology
	TCS2: 5' GGGACAAACAAATCCCGC 3'	satellite			
<i>T. congo forest</i>	TCF1: 5' GGACACGCCAGAAGGTACTT 3'	ADN	350	55	Masiga et al., 1992 Int. J. Parasitol.
	TCF2: 5' GTTCTCGCACCAATCCAAC 3'	satellite			
<i>T. congo 'Kilifi'</i>	TCK1 : 5' GTGCCAAATTTGAAGTGAT 3'	ADN	294	55	Masiga et al., 1992 Int. J. Parasitol.
	TCK2 : 5' ACTCAAATCGTGCACCTCG 3'	satellite			
<i>T. simiae</i>	TSM1: 5'CCGGTCAAAAACGCATT3'	ADN	437	55	Masiga et al., 1992 Int. J. Parasitol.
	TSM2: 5'AGTCGCCCGGAGTCGAT3'	satellite			
<i>T. (N.) Tsavo</i>	TST1: 5' GTCCTGCCACCGAGTATGC 3'	ADN	450	55-60	Majiwa et al., 1993 Parasitology (ILO892/3)
	TST2: 5' CGAGCATGCAGGATGGCCG 3'	satellite			
<i>T. congo godfreyi</i>	DGG1: 5' CTGAGGCTGAACAGCGACTC 3'	ADN	149	60	Masiga et al., 1996 Vet. Parasitol.
	DGG2: 5' GGCGTATTGGCATAGCGTAC 3'	satellite			
<i>T. evansi</i>	EVA1: 5' ACATATCAACAACGACAAG 3'	minicircles	139	58	These Masiga 1994 Njiru Vet Par 2004
	EVA2: 5' CCCTAGTATCTCCAATGAAT 3'				
	RoTat1.2F: 5' GCGGGGTGTTAAAGCAATA 3'	ADN	205	59	Claes et al., KBD 2004
	RoTat1.2R: 5' ATTAGTGCTGCGTGTGTTCG 3'	génomique (VSG)			
	TEPAN1: 5' AGTCACATGCATTGGTGGA 3'	séquence répétée	122	60	Panyim et al, 1993 Privot VetPar 2010
	TEPAN2: 5' GAGAAGGCGTTACCCAATCA 3'				
	ESAG6/7F: 5' ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG 3'	ADN génomique	237	55	Braem, 1999 these Holland Vet P 2001
ESAG6/7R: 5' CACGTGAATCCTCAATTTTGT 3'	(R Tsferrin)				
<i>T. brucei gambiense</i>	TRBPA1: 5' GCGCCGACGATACCAATGG 3'	Séquence microsat	149 - 203	60	Herder OCEAC 1997 Truc TRSTMH 2002
	TRBPA2: 5' AACGGATTCAGCGTTGAG 3'				
<i>T. brucei gambiense</i>	Tgs-GP F: 5' GCTGCTGTGTTGCGAGAGC 3'	Tbg specific glycoprotein	308bp	63	Radwanska et al 2002a
	TgsGP R: 5' GCCATCGTGCTTGCCGCTC 3'				
<i>T. brucei rhodesiense</i>	Tbr F: 5' ATAGTGACAAGATGCGTACTCAACGC 3'	SRA	284	68	Radwanska et al 2002b
	Tbr R: 5' AATGTGTTGAGTACTTCGGTCACGCT 3'				
<i>T. lewisi</i>	LEW1S: 5' ACCACCACAGCTCTCTTCT 3'	ITS1	220	64	Desquesnes et al. IGE, 2011
	LEW1R: 5' TGTATGTGCGTGCTTGTTC 3'				
<i>T. theileri</i>	TthCATL1: 5' CGTCTCGGCTCCGGTCAAAC 3'	CATL (Cathepsin L-like)	273bp	65	Rodrigues et al, 2010 Parasitol. Int.
	DTO15S: 5' TAAAGCTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3'				

Il faut noter que lorsque l'on utilise les primers amplifiant des séquences satellite, on obtient des "patterns" de produits; les produits de PCR contiennent: (1) le produit attendu, mais également (2) des produits de taille double, et (3) de taille triple etc.; ainsi et par exemple, avec *T. vivax* (TVW primers, produit attendu 150pb): produits obtenus: 150pb, 300pb, 450pb...

3.2.3 PCR multi-spécifique

Le développement de méthodes de diagnostic par PCR multi-spécifique a été rendu possible grâce à l'amplification de l'espaceur interne transcrit n°1 de l'ADN ribosomal des trypanosomes (ITS1 rDNA). En effet, l'ITS1 est hautement conservé à l'intérieur d'une espèce, toutefois sa séquence et le plus souvent sa longueur, sont différentes d'une espèce à l'autre, mais conservées au sein d'une même espèce. Ces caractéristiques de l'ITS1 en font d'ailleurs un excellent candidat pour le barcoding universel des espèces chez les protistes. En outre, l'ITS1 étant flanqué de part et d'autre par des séquences hautement conservées que sont les gènes 18S et 5.8S, il est aisé de définir des amorces dans ces parties qui permettent d'obtenir un produit de PCR dont la longueur est différente selon l'espèce. Ainsi il a été démontré que l'on pouvait distinguer et même détecter simultanément les ADN de (par longueur décroissante de l'ITS1) : *T. congolense* Forêt, Savane, Kilifi, *Trypanozoon* et *T. vivax*. Toutefois, lorsqu'un produit d'amplification a une taille un peu différente de celle attendue, il doit faire l'objet d'un séquençage pour identification, comme tout produit amplifié hors d'un contexte épidémiologique clair. En effet, les amorces TRYP1 par exemple, peuvent amplifier des trypanosomes, mais également des leishmanies et même des leptomonas voire des babésies ; l'interprétation des résultats n'est univoque que dans des contextes épizootologiques bien déterminés. Des PCR classiques ont ainsi été mises au point avec deux jeux d'amorces TRYP1R & S et TRYP4R & S, et une PCR-nested a également été développée. Les divers protocoles (avec éventuellement le DMSO ajouté) et résultats attendus sont détaillés dans les références indiquées. Les séquences des primers et la taille des produits attendus sont présentés au Tableau 3.

3.2.4 LAMP

Des méthodes de PCR à température constante (LAMP) ont été décrites, mais leur usage en médecine vétérinaire est encore trop coûteux et la supériorité de leurs performances reste à démontrer avec des échantillons de terrain, ou en compétition avec les « gold standards » qui restent à ce jour la PCR monospécifique par amplification de l'ADN satellite.

Le principal avantage théorique de la LAMP serait l'absence de besoin de laboratoire et la possibilité de faire une lecture visuelle directe des résultats de l'amplification, toutefois, cette dernière est souvent discutable et nécessite *in fine* une migration sur gel, ce qui retire tout avantage à la méthode, d'autant qu'elle présente, en outre et fréquemment, des résultats faussement positifs. Pour ces raisons, la LAMP n'a pas été généralement adoptée pour le diagnostic des trypanosomoses.

Tableau 3: Caractéristiques et séquences des principaux primers pour le diagnostic des trypanosomes par PCR multi-spécifiques

Spécificité	Nom et séquences des primers	Localisation	Taille des produits (bp)	T° hybrid	REF
T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah,et forest, T. lewisi	TRYP1S : CGTCCCTGCCATTTGTACACAC	ITS1	Tb 520, Tv 310,	55	Desquesnes et al KBD 2002
	TRYP1R : GGAAGCCAAGTCATCCATCG	ADNr	Tcs-Tcf 680-750, Tl. 623		
T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah, forest et kilifi	TRYP4S: 5' AAGTTCACCGATATTG 3'	ITS1	Tb 487, T.v 242, Tcs 697	45	Desquesnes + DEA B. DESCAMPS 2003
	TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr	, Tcf 727, Tck 627		
NESTED: T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah, forest et Kilifi	R1-TRYP18.2C: 5' GCAAATTGCCAATGTGCG 3'	ITS1		51	Desquesnes + DEA B.
	R1-TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr			
	R2-IRFCC: 5' CCTGCAGCTGGATCAT 3'	ITS1	Tb 392, Tv 147, Tcs 602,	47	DESCAMPS 2003
	R2-TRYP5RCG: 5' ATCGCGACACGTTGTG 3'	ADNr	Tcf 632) Tck 532		
NESTED: T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah, forest Kilifi, et T. theileri	TRYP18.2C: 5' GCAAATTGCCAATGTGCG 3'	ITS1		51	Desquesnes + DEA B.
	TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr			
	IRFCC: 5' CCTGCAGCTGGATCAT 3'	ITS1	Tth 310, Tb 426, Tv 181,	47	DESCAMPS 2003
	TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr	Tcs 636, Tcf 666, Tck 566		

4. Épreuves sérologiques

Plusieurs techniques de détection d'anticorps ont été développées pour le diagnostic des trypanosomoses animales, avec des sensibilités et spécificités variables. La méthode de choix pour un examen individuel est l'immunofluorescence indirecte (IFI). La méthode la mieux adaptée aux études de populations est l'ELISA, qui demeure le gold standard de ces techniques. L'identification des antigènes majeurs de trypanosomes et leur production comme molécules recombinantes ou peptides de synthèse pourraient conduire au développement et à la validation de nouvelles épreuves basées sur l'utilisation de ces molécules, qui permettraient d'atteindre un niveau de standardisation inaccessible aux techniques utilisant des extraits totaux de parasites. Toutefois, à ce jour, aucun antigène recombinant ne s'est avéré suffisamment performant pour entrer en compétition avec l'ELISA classique.

L'IFI et l'ELISA pour la détection d'anticorps ont été adaptés pour analyser des échantillons de sang collecté sur papier filtre. Le sang maintenu dans un microtube capillaire hépariné est versé sur un papier filtre (Whatman® n°4). Les échantillons sont séchés à l'air, à l'abri de la lumière, placés dans un sac en plastique avec un substrat dessiccateur. Le sac est scellé et doit être conservé au frais tant que les échantillons ne sont pas réfrigérés ou congelés.

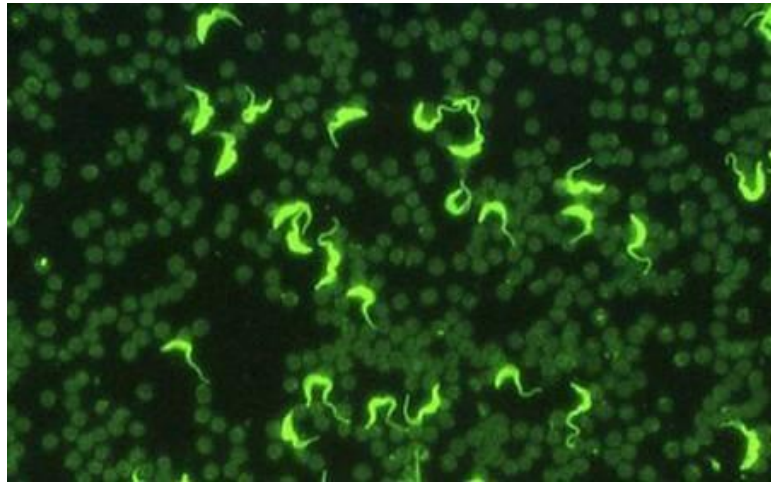
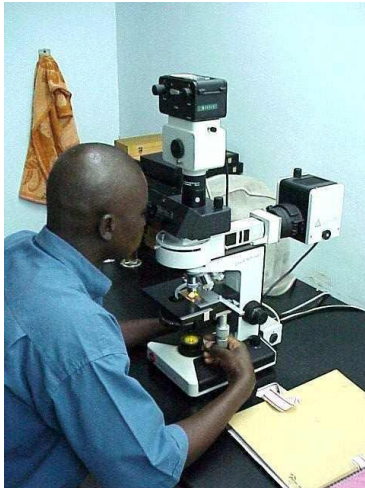
4.1 Épreuve d'immunofluorescence indirecte

Pour la préparation des lames, on met les parasites en culture sur des souris ou des rats, et au pic de parasitémie on collecte le sang. Originellement on préparait des frottis sanguins, mais quand la méthode de séparation des trypanosomes et des cellules sanguines sur colonne de DE52 a été disponible, l'étape de séparation des parasites a été ajoutée au protocole pour préparer des lames sur lesquelles on ne fixe que des parasites. Ces méthodes originelles ont été remplacées par une technique de préparation des antigènes de trypanosomes qui implique la fixation de trypanosomes vivants en utilisant un mélange d'acétone froide (80 %) et de formol à 0,25 % dans du sérum physiologique.

Protocole

- i) Préparer un étalement mince à partir de sang à forte parasitémie ou, mieux, d'une suspension de trypanosomes. Sécher à l'air et fixer dans l'acétone pendant 5 min ;
- ii) Dessiner des cercles de 5 mm de diamètre sur les lames en utilisant du vernis à ongles ;

- iii) En utilisant une pipette, placer le sérum à tester dilué au 1/40 dans chaque cercle en s'assurant que la surface de chaque cercle est complètement recouverte ;
- iv) Incuber le mélange antigène/sérum à tester à 37°C pendant 30 min dans une étuve humide ;
- v) Laver la préparation 3 fois avec du PBS, 5 min à chaque fois à 4°C, en agitant légèrement. Sécher les lames à l'air ;
- vi) Appliquer le conjugué: IgG anti-bovin (pour tester un sérum de bovin) préparé sur chèvre ou lapin conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine ;
- vii) Incuber et laver comme ci-dessus. Rincer à l'eau distillée. Sécher à l'air les lames ;
- viii) Monter les lames dans le PBS ou le glycérol tamponné et examiner la fluorescence.



Lorsque la fluorescence est marquée le résultat ne laisse pas de doute, mais lorsqu'elle est modérée, l'interprétation varie selon l'observateur et le contexte, ce qui rend l'examen subjectif et donc peu fiable en limite de positivité.

4.2 Épreuve immuno-enzymatique de détection d'anticorps

La méthode ELISA a été développée pour un usage à grande échelle de surveillance des trypanosomoses bovines. Des plaques sensibilisées avec des antigènes solubles de diverses espèces de trypanosomes sont utilisées en examens de routine ; la méthode est également appliquée chez d'autres populations d'hôtes incluant buffles, chevaux, moutons, chèvres porcs, chiens, éléphants, etc. Des plaques utilisant des antigènes de *T. congolense* et *T. vivax* préfixés présentent l'avantage d'utiliser des antigènes dénaturés standardisés et qui peuvent être conservés pour de longues périodes à la température du laboratoire.

L'antigène standard pour l'épreuve de détection d'anticorps provient des trypanosomes présents dans le sang. Les antigènes sont préparés comme une fraction soluble de trypanosomes purifiés par chromatographie sur colonne DEAE d'échange d'anions de parasites provenant du sang de rats infectés, lysés par plusieurs cycles de congélation-décongélation et centrifugation permettant d'éliminer les éléments particuliers.

4.2.1 Protocole de préparation des antigènes solubles

a) Culture des parasites et récolte du sang

L'utilisation des rats est préférée à celle de souris pour obtenir des volumes de sang suffisants. Les parasites sont cultivés sur rats immunodéprimés par injection IP de 200mg/Kg de cyclophosphamide 2 à 3 jours avant l'injection des parasites, afin de générer des parasitemies très élevées. Au pic de parasitemie (dans la phase ascendante de la parasitemie, lorsqu'elle atteint 10 millions de parasites /ml) les animaux sont anesthésiés puis saignés soit par ponction directe du cœur, soit par ouverture de la cage thoracique et exérèse d'un poumon après avoir versé quelques gouttes de tampon citrate. Le sang est recueilli à la pipette et du citrate régulièrement versé pour empêcher la coagulation. Après collecte, le sang (plus de 10 ml sont généralement récoltés sur un rat adulte) est dilué 1:4 dans du PSG (1 volume de sang + 3 volumes de PSG), puis centrifugé à 5.000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour collecter le buffy coat qui sera placé sur la colonne de DE52 préparée au préalable. Avec 10 ml de sang collectés à partir d'un rat, le volume du buffy coat qui sera récolté et placé sur la colonne de DE52 sera approximativement de 4-6 ml. La quantité d'antigènes préparés à partir d'un rat permet en moyenne de réaliser 10.000 à 20.000 tests ELISA dans les conditions décrites ci-après.



Contention manuelle du rat



Injection intra-péritonéale

b) Préparation des tampons

Solution stock de phosphate salé : PS pH8

Na ₂ HPO ₄ (anhydre)	13,48g	NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0,78g
NaCl	4,25g	H ₂ O	qsp 1000ml

Les solutions de différentes forces ioniques sont constituées par dilutions du PS, pH 8, dans de l'eau distillée et addition de glucose. La solution de PSG doit être stérile (le PS doit être autoclavé avant l'addition de glucose car ce dernier ne peut être autoclavé, le sucre serait cuit).

- Pour le sang de souris, de rat, de ruminants et chien, on ajoute 4 parts de PS à 6 parts d'eau distillée et on ajuste la concentration finale de glucose à 1%, ce qui donne une force ionique de 0.145.
- Pour le sang de porc et de lapin, on ajoute 3 parts de PS à 7 parts d'eau distillée et on ajuste la concentration finale de glucose à 1,5%.
- Pour la séparation de *T. lewisi* il est préférable d'utiliser 6 parts de PS pour 4 parts d'eau afin d'accroître la force ionique (0,217), puis ajuster à 1% la concentration de glucose, mais dans cette espèce les résultats sont irréguliers.

Préparation du tampon phosphate salé glucosé (PSG pH8)

Solution tampon Volume PS Volume H2O % poids/vol glucose force ionique

PSG: 6:4	6	4	1%	0,217
PSG 5:5	5	5	1%	0,181
PSG 4 :6	4	6	1%	0,145
PSG 3 :7	3	7	1.5%	0,109
PSG 2 :8	2	8	2.5%	0,072
PSG 1 :9	1	9	5%	0,036

Pour préparer 500ml de PSG 4:6, on prépare 200ml de PS + 300 ml d'eau distillée, auxquels on ajoute 5 g de glucose.

En fonction de l'espèce hôte, la composition du tampon peut être ajustée comme indiqué au tableau suivant:

Espèces hôte	PS	H2O	Glucose	Force ionique
Rat/souris	6	4	1%	0,217
Chèvre	4	6	1%	
Mouton	4	6	1%	
Bovin	4	6	1%	
Cobaye	4	6	1%	
Porc	3	7	1,5%	
Lapin	3	7	1,5%	
Homme	5	5	1%	0,181

c) Préparation de la cellulose

Pour estimer le volume de DE52 requis on peut faire l'approximation qu'un gramme de DE52 sec donnera 1,5ml de suspension de cellulose. Ne jamais utiliser d'objets métalliques (agitateur, spatule, etc) pour agiter ou manipuler le DE52.

Pour estimer le volume de DE52 requis, on peut faire l'approximation qu'il faut 6 fois plus de DE52 que de sang ou buffy coat déposé sur la colonne. Pour un rat par exemple, si le buffy coat récolté est de 3ml, il convient de préparer en moyenne 18 ml de DE52 soit 12g de DE52 ; étant donné les pertes et volumes morts on préparera 15g de DE52.

On les place dans 100ml d'eau distillée pour un premier rinçage.

Ajouter une barre magnétique plastifiée (pas de métal au contact du DE52) pour une agitation douce (ne pas briser la cellulose) pendant 20 minutes, puis régler le pH à 8 avec de l'acide phosphorique.

Laisser décanter 30 minutes. Jeter le surnageant qui contient des bris de cellulose très petits qui risquent de colmater la colonne.

Recommencer lavage, réglage du pH et élimination du surnageant 2 fois supplémentaires.

Après la dernière décantation, retirer le surnageant puis ajouter un volume d'eau égal au volume de DE52 restant, puis conserver la cellulose au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

d) Préparation de la colonne et équilibration de la DEAE-cellulose

Fixer bien verticalement une seringue de 50 ml sur un rack de préférence à embout central, raccordée à un tuyau de caoutchouc qui peut être obturé à l'aide d'un clamp et être ainsi utilisé comme un robinet (lorsqu'un volume important de sang doit être séparé on peut utiliser un entonnoir de porcelaine à fond plat percé). Découper 2 disques de papier Whatmann n°41 à l'exacte dimension du cylindre intérieur de la seringue (ou de l'entonnoir). Placer un des disques au fond de la seringue (il doit pouvoir descendre et se placer seul à plat au fond de la seringue, sans être poussé sinon il serait déformé). Humidifier le papier filtre avec quelques gouttes de PSG puis ajouter un volume de tampon suffisant pour pouvoir laisser passer afin de remplir le tuyau de caoutchouc, puis refermer le clamp. S'assurer qu'il n'y a plus d'air dans le conduit. Agiter la DE52 et verser les 50 ml délicatement sans déranger le papier filtre. Laisser décanter 5 minutes avant de laisser passer le tampon. Placer le deuxième disque de papier filtre au sommet de la colonne. S'assurer qu'il reste toujours dans le tampon et ne pas laisser s'échapper trop de tampon. Le sommet de la colonne ne doit JAMAIS être sec. Laver la colonne en laissant passer 50 ml de PSG puis la refermer jusqu'au moment de déposer l'échantillon.

e) Séparation des parasites sur la colonne de DEAE-cellulose

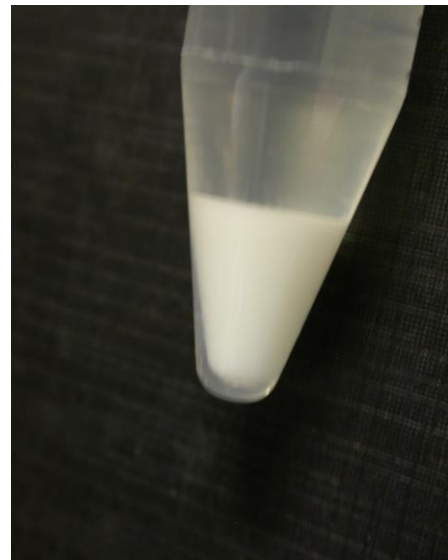
Placer délicatement les 3 ml de sang ou de buffy coat sur le papier filtre au sommet de la colonne et ouvrir la colonne et laisser pénétrer dans la cellulose. Dès que la totalité de l'échantillon a pénétré la cellulose, refermer la colonne pour en pas la laisser sécher et verser délicatement le PSG au sommet en s'assurant de ne pas altérer la colonne de cellulose (verser très doucement le tampon sur le papier filtre). Rouvrir la colonne. Ajouter progressivement 20 ml de PSG et commencer la collecte des fractions dès que les parasites font leur apparition au bas de la colonne. On vérifie l'arrivée des parasites en contrôlant régulièrement une goutte de l'éluat entre lame et lamelle au microscope à fond noir (grossissement X400 à X 500). Les fractions sont collectées sur glace dans des tubes Falcon. Lorsque les trypanosomes sont en cours de décrochage le liquide collecté en bas de la colonne devient opalescent (figure du centre ci-dessous). Lorsque le liquide redevient limpide on vérifie la fin de la collecte en observant une goutte au microscope. Centrifuger les récoltes à 1.000g (ou approximativement 5.000 rpm) pendant 10 minutes pour décanter les parasites qui se présentent alors sous forme de pellet (photo de droite); jeter le surnageant. Le lavage doit être fait 2 fois avec du PBS.



Entonnoir de verre



Seringue (tampon opalescent)



Pellet de parasites après centrifugation

Les parasites sont ensuite suspendus dans de l'eau distillée, le volume de tampon doit être 20 à 30 fois supérieur au volume du culot parasitaire. Ajouter un cocktail d'anti-protéases qui éviteront la lyse des protéines à la décongélation. On utilise le « Complete Protease inhibitor » (Roche, cat n° 11697498001 (20 comprimés) ou n°11836145001 (3 X 20 comprimés)) en plaçant 1 comprimé dans 2ml d'eau distillée, puis en ajoutant 40µl de ce cocktail par ml de lysat parasitaire. Congeler de préférence à -80°C ou en azote liquide.

e-bis) Séparation des trypanosomes par centrifugation différentielle

Une alternative à cette procédure est la centrifugation différentielle du sang ; elle permet de séparer des quantités modérées de parasites et fournit une purification limitée puisque des cellules ou des bris de cellules sanguines sont toujours présents ; toutefois cette méthode peut être utile pour des préparations expérimentales.

Au pic de parasitémie le sang est récolté de la même manière que précédemment, dilué au 1 : 6 dans du PSG 1% puis centrifugé à basse vitesse (200g soit environ 1200 rpm X 5 minutes) afin de provoquer la décantation des cellules sanguines sans provoquer celle des trypanosomes dont les paramètres de décantation sont un peu supérieurs. La méthode est efficace pour les trypanosomes de grande taille, un peu moins pour les trypanosomes de petite taille comme certains *T. congolense* qui ont tendance à présenter des paramètres de décantation assez voisins de ceux des globules blancs. Après une première centrifugation (1200 rpm 5 minutes), le plasma qui contient les parasites est récolté. Le pellet de cellules peut être re-suspendu dans du PSG pour effectuer une deuxième centrifugation à basse vitesse, afin de récolter à nouveau les parasites qui seront dans le surnageant. Les surnageants des 2 centrifugations à basse vitesse sont alors regroupés et centrifugés à plus haute vitesse (800g soit environ 6000 rpm X 10 minutes) pour décanter les parasites et éliminer le surnageant riche en plasma. Le pellet peut être re-suspendu délicatement dans du PSG pour effectuer un nouveau lavage, puis éliminer le surnageant. Cette étape doit être réalisée 2 fois consécutives pour bien laver les parasites. A ce stade, si l'objectif est de préparer des antigènes solubles, les parasites sont ensuite suspendus dans de l'eau distillée, dans un volume de tampon 20 à 30 fois supérieur au volume du culot parasitaire. On ajoute alors le cocktail d'anti-protéases avant la congélation et la rupture des parasites.

Un protocole voisin a été proposé (Davita Pillay) qui consiste à diluer initialement le sang au 1:8 dans un PSG à 0,5% de glucose, puis centrifuger à 200g X 5 minutes et récolter le surnageant qui est ensuite centrifugé à 300g X 5 minutes. Le second surnageant est récolté et centrifugé à 1800g pendant 10 minutes. Le troisième surnageant est éliminé et le pellet re-suspendu pour utilisation. Il se peut que cette méthode soit mieux adaptée à *T. congolense*.

f) Préparation des antigènes solubles

Le lysat parasitaire est dégelé au bain marie à 20°C. Bien surveiller la décongélation et dès que la glace a disparu replonger le tube dans l'azote liquide pour éviter de chauffer le lysat. Exécuter 5 cycles de congélation azote liquide / décongélation bain à 37°C (environ 6 X 5 min). Laisser en cryotube ou placer en flacon adapté au sonicateur (bien nettoyer la sonde)

et appliquer 3 cycles de sonication sur glace puissance 60 W pendant 1 minute (output power 7). Puis effectuer 1 cycle de congélation azote liquide / décongélation bain à 20°C. Dès la décongélation, centrifuger le lysat à 8.000tr/mn pendant 15 min à 4 °c et récupérer le surnageant qui constitue l'antigène soluble; éliminer le pellet qui contient les débris cellulaires et particules insolubles.



Bain marie & bain d'azote pour cycles congélation/décongélation



Sonicateur

f) Dosage des protéines

On peut utiliser un lecteur UV.

La densité optique du lysat étant normalement trop élevée pour une lecture directe on réalise des dilutions au 1 :5, 1 :10 et/ou 1:20 et on fait le blanc sur le tampon de dilution utilisé, du PBS ou de l'eau distillée.

On mesure la DO des antigènes solubles aux longueurs d'onde 260 et 280 nanomètres.

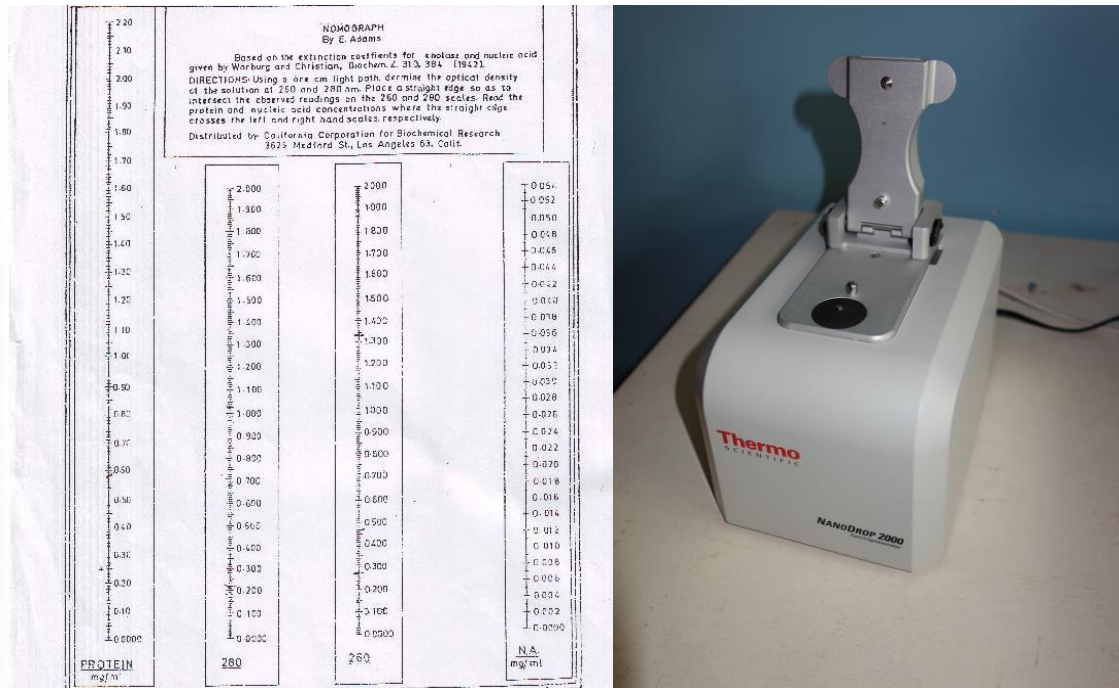
Pour déterminer la concentration protéique du mélange dosé on utilise l'abaque de lecture de la méthode de Warburg et Christian. Après correction (X10 ou X 20) selon la dilution mesurée, on établit la concentration protéique de l'antigène soluble qui doit généralement être située entre 1 et 10 mg/ml. On aliquote l'antigène dans des cryotubes en inscrivant Ag Sol espèce, date, concentration protéique en mg/ml. Stocker l'antigène aliquote (à environ 2-6 mg/ml) à -80°C, en aliquotes de 100µl.

Exemple de mesure concentration protéique des antigènes

OD	260nm	280nm	concentration protéique	final
Dilution 1 :10	1.953	1.387	0.71	7.1 mg/ml
Dilution 1 :50	0.387	0.259	0.13	6.5 mg/ml

On considérera donc que la concentration moyenne de cet antigène est de 6.8mg/ml.

Le dosage des protéines peut également être réalisé avec un spectrophotomètre dernière génération (**Nanodrop**) dont l'utilisation est simple, rapide et efficace à partir de micro-volumes d'échantillons (1 à 2 µl).



Abaque de mesure des concentrations ADN et protéines

Nanodrop

Technique de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance du bleu de Coomassie, lié à la complexification des liaisons du bleu de Coomassie avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés des protéines présentes dans le lysat de trypanosome. Un changement de couleur du colorant (du rouge marron vers le bleu) est obtenu lorsque des protéines sont présentes dans l'échantillon à tester. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. Le spectre d'absorption maximal est estimé à 595 nm. La méthode de Bradford est moins sensible aux interférences par divers agents présents dans les échantillons de protéine. Elle est toutefois affectée par les détergents, modifiée par le pH, et donne un résultat positif également aux polyphénols hydrosolubles de haut poids moléculaire (tanins).

Pour déterminer la concentration protéique du mélange dosé, on réalise une solution de

d'albumine sérique de bovin (*bovine serum albumine* / BSA) à 5mg/ml qui servira pour la réalisation de la gamme d'étalonnage avec des dilutions au 1:2. On introduit 10µl de chaque dilution ou d'échantillon avec 90µl de solution Bradford (Sigma) dans des puits de microplaque, puis après une incubation de 5 minutes à température ambiante, la lecture se fait à 595nm au spectrophotomètre. On réalise la courbe de la gamme ainsi que la droite de régression linéaire et son équation correspondantes. La valeur de la densité optique de l'échantillon doit être comprise dans les valeurs de densité optique de la droite de régression linéaire. Il suffit d'introduire la densité optique de l'échantillon dans l'équation de la droite de régression linéaire pour en obtenir la concentration de l'échantillon en protéines.

Technique acide bicinchoninique

Les protéines réduisent l'ion cuivrique $\text{Cu}^{(2+)}$ en $\text{Cu}^{(1+)}$ en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le $\text{Cu}^{(1+)}$, qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562nm (peut être lu entre 540 et 590nm). L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines. On réalise une gamme d'étalonnage avec des dilutions au 1 :2 avec une protéine de référence (par exemple : la *bovine serum albumine* (BSA)). On mélange 50 µl de la dilution ou de l'échantillon à doser et 150µl de solution sulfate de cuivre acide bicinchoninique. Après une incubation de 20 minutes à 37°C, la lecture se fait avec un spectrophotomètre dont la longueur d'onde est à 550nm. On réalise la courbe de la gamme ainsi que la droite de régression linéaire et son équation correspondantes. La valeur de la densité optique de l'échantillon doit être comprise dans les valeurs de densité optique de la droite de régression linéaire. Il suffit d'introduire la densité optique de l'échantillon dans l'équation de la droite de régression linéaire pour en obtenir la concentration de l'échantillon en protéines.

4.2.2 Réalisation de l'ELISA (détection d'IgG)

Bien que la détection des IgM soit théoriquement possible, les résultats étant incertains et variables (présence inconstante des IgM dans le sérum du fait de la formation d'immuns complexes et de la demi-vie brève des IgM), seule la détection des IgG est réalisée par ELISA en routine pour le dépistage ou le suivi des trypanosomoses.

Les antigènes solubles de 3 à 4 espèces de trypanosomes sont utilisés régulièrement en ELISA : *T. vivax*, *T. congolense* type savane et *T. brucei brucei* ou *T. evansi* (ces derniers donnant des résultats assez voisins). La production des parasites est faite comme indiqué ci-avant, sur rats de laboratoires. Les antigènes solubles sont conservés soit sous forme de stock à -80°C pour le long terme, soit sous forme d'aliquote de travail, à -20°C pour le moyen ou

court terme. Les étapes de l'ELISA sont classiques : sensibilisation (coating), blocage (blocking), incubation sérum, lavage (washing), incubation conjugué, lavage, incubation substrat-chromogène, lecture.

Les équipements nécessaires sont un jeu de pipettes mono et multicanaux, shaker-incubateur, laveur manuel ou laveur automatique, spectrophotomètre UV relié à un ordinateur (lecteur ELISA). Les densités optiques sont alors transférées et récupérées dans un fichier Excel qui réorganise automatiquement les données et fournit le résultat final.

Ce fichier Excel dispose d'une programmation particulière qui facilite la présentation et l'interprétation des données et permet de vérifier par quelques tests simples la recevabilité de la plaque.



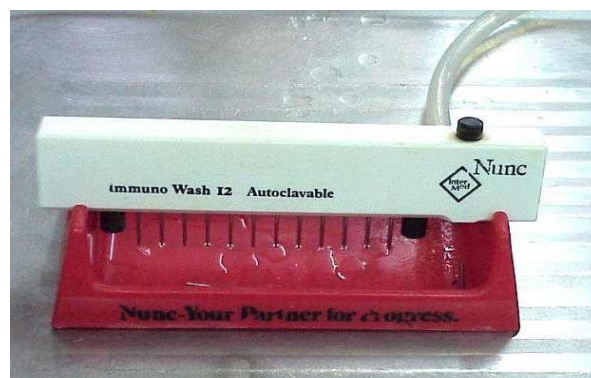
Préparation de la plaque ELISA



Agitateur-incubateur



Laveur automatique



Laveur manuel de plaques



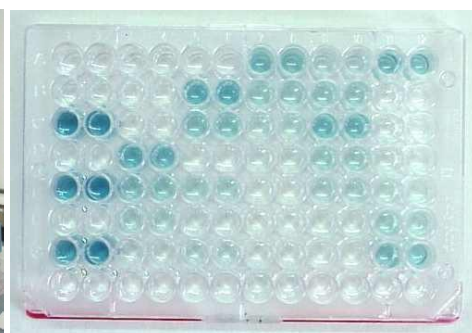
Utilisation du laveur manuel



Lecteur UV uniplaque ELISA



Lecteur UV multiplaques ELISA



Plaque avec révélateur

Préparation des tampons :

PBS X 1 : Na_2HPO_4 1,44g + KH_2PO_4 0,24g + NaCl 8g + KCl 0.2g + eau QSP 1 litre

Ou, avec les produits anhydres :

PBS X 1 : Na_2HPO_4 1,21g + KH_2PO_4 0.20g + NaCl 8g + KCl 0.2g + eau QSP 1 litre

Ph 7.4 à régler avec H_3PO_4 ou NaOH.

Tampon carbonate : Na_2CO_3 1,58g + NaHCO_3 2,93g + eau QSP 1 litre, régler à pH 9.6 avec HCl.

Washing Buffer (WB) : PBS + 0,1% Tween 20 (1ml / litre)

Blocking buffer (BB) : 100 ml de WB + 5 à 7g de lait en poudre (ou, 0.2g de caséine)

Tampon Substrat-Chromogène (pour ABTS) : acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 9,6g par litre d'eau ajuster Ph 4.

H_2O_2 1,875% : H_2O_2 30% 500 μl + 7,5ml d'eau, conserver abri de la lumière et au froid (4°C) ;

ABTS 20mg/ml : ABTS 135mg + 6,25 ml eau, conserver abri de la lumière et au froid (4°C).

Réalisation du protocole ELISA :

Sensibilisation : on utilise des plaques Nunc Immunosorp 96 puits à fond plat, un tampon de coating au carbonate. On dilue l'antigène soluble de trypanosome pour une concentration finale de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Placer 100 μl par puits, une nuit à 4°C ou 2 heures à 37°C sur un agitateur avec 300 rotations par minute.

Blocage : Vider les plaques par retournement et placer 150 μl de blocking buffer (BB) par puits ; placer sur agitateur à 300rpm pendant 30 minutes à 37°C;

Dilution des sérums : si l'on dispose de sérum ou de plasma on fait une première dilution au 1/10 dans une plaque en polypropylène à fond rond (U) ; cette opération peut se faire pendant le blocage, avec du BB (ou avec du WB + 0,2% de SAB).

Transfert : après le blocage, vider les plaques par retournement, rincer une fois au PBS puis ajouter 90 μl de BB. Transférer rapidement à l'aide d'une pipette à 8 canaux 10 μl de sérum dilué dans 2 puits mitoyens à l'horizontale (dilution finale 1/100) ; placer sur agitateur à 300rpm pendant 30 minutes à 37°C;

Lavage : Vider les plaques par retournement et remplir les puits avec du tampon de lavage (WB) ; vider et laver 4 fois ; vider et tamponner fortement les plaques sur du papier absorbant

Conjugué : placer 100 μl de conjugué dilué dans le BB (voir dilutions selon le conjugué dans les fiches en annexe); placer sur agitateur (300rpm) pendant 30 minutes à 37°C;

Lavage : Vider la plaque par retournement, remplir les puits avec du tampon de lavage (WB), vider et laver 4 fois ; vider et tamponner fortement les plaques sur du papier absorbant ;

Révélation par substrat-Chromogène : ajouter dans chaque puits 100 μl de substrat-chromogène : soit du Kblue, soit du TMB, soit encore un mélange acide citrique 25ml + 125 μl ABTS + 100 μl H_2O_2 . Placer à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à température du

laboratoire.

Lecture : à la longueur d'onde adaptée au chromogène Kblue et TMB 620nm, ABTS 405nm.

Utilisation de sérums déposés sur papier filtre.

Pour une conservation à température ambiante et surtout pour une expédition par poste, il est très pratique de déposer le sérum sur papier filtre ; on peut déposer 1 ou 2 spots de 100µl de sérum sur papier Whatman n°1, bien séparés, et cercler avec un crayon à papier les 2 zones qui ont été humidifiées (ce qui fait des cercles d'environ 2,5cm de diamètre en général), et inscrire la référence de l'échantillon. Quand le papier filtre est complet, il convient de bien le laisser sécher, puis de l'agrafer en sandwich entre 2 feuilles A4 pour empêcher tout glissement du papier filtre entre les papiers A4 afin d'éviter les contaminations entre échantillons. Lorsque les échantillons sont bien secs, ces « sandwichs » peuvent être placés dans une pochette plastique hermétique pour l'expédition. Attention, la dégradation des Ac sur papier filtre peut être rapide et le test doit avoir lieu dans le mois suivant le dépôt du sérum sur papier filtre. Concernant les camélidés, dont la structure des anticorps est particulière, l'usage de sérum congelé doit être privilégié.

A réception, le papier Whatmann N°1 est découpé aux ciseaux en petits morceaux (2-4mm²) et placé dans un microtube 1.5ml avec 500µl de PBS, trituré à la pipette, puis placé à 25°C sur agitateur rotatif (shaker-incubator) à 300 rotations/min. pendant 2 heures. On récolte ensuite un sérum dilué au 1/5 qui donne quasiment le même résultat en ELISA qu'un sérum frais.

4.2.3 Standardisation de l'ELISA

La lecture de chaque microplaque ELISA est référencée sur 3 sérums de référence positifs (fortement, moyennement et faiblement) et 3 sérums de référence négatifs (fort, moyen et faible), qui sont nécessaires pour définir les valeurs témoins dans le cadre de la démarche qualité. La valeur de chaque échantillon testé en ELISA est exprimée comme un pourcentage de la moyenne des références standard positives et des références standard négatives (PPR pourcentage de positivité relative), selon la relation suivante :

$$\text{PPR échantillon} = \frac{\text{DOm échantillon} - \text{DOm référence négatifs}}{\text{DOm références positifs} - \text{DOm références négatifs}}$$

Les résultats sont ainsi quantifiables. Un seuil de positivité est généralement déterminé sur la base des résultats obtenus dans une population d'animaux non infectés (moyenne plus 2 ou 3 écarts types), et sa vraisemblance est vérifiée avec des échantillons de statut connus ou

mieux obtenus en conditions expérimentales. L'idéal est que les échantillons de référence placés sur la plaque soient représentatifs des populations infectées, positifs, et non infectées, négatifs (leurs valeurs en PPR doivent être proches des valeurs moyennes de chaque population). Un protocole détaillé est présenté en annexe.

Cette épreuve a une haute sensibilité et spécificité de genre, toutefois la spécificité d'espèce est généralement faible. IFI et ELISA détectent une réponse immune aux infections actuelles et passées et ne peuvent fournir, par conséquent, qu'un diagnostic de présomption d'une infection. Toutefois, lorsque le prélèvement est réalisé plus de 4 mois après un traitement, une séropositivité suggère fortement une infection active.

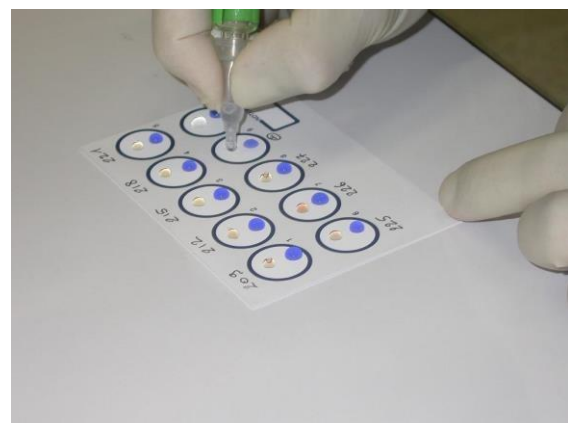
L'immunodiagnostic nécessite des équipements onéreux et sophistiqués et une expérience qui ne sont pas toujours disponibles. Il est réalisé dans des laboratoires spécialisés et il y a un délai substantiel entre la réalisation de l'échantillon et l'obtention des résultats. Néanmoins, l'ELISA se prête bien à un haut degré d'automatisation et de standardisation. La récolte d'échantillons et leur expédition par poste est rendue aisée par l'utilisation de papier filtre. Tous ces facteurs font que l'ELISA est une épreuve très utile pour une surveillance à grande échelle de la distribution des trypanosomoses transmises par tsé-tsé.

4.3 Détection d'anticorps IgM

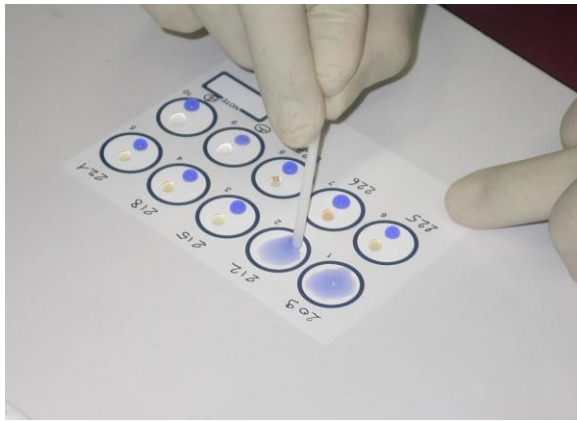
Le CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomes) / *T. evansi* est un test d'agglutination qui permet la détection des infections récentes par *T. evansi*. Il est réalisé en mettant en présence des parasites fixés et du sérum (ou du sang) contenant des immunoglobulines M (IgM). Les IgM qui sont pentavalentes peuvent fixer plusieurs parasites constituant un réseau d'agglutinats visible à l'œil nu après incubation et agitation rotative du mélange pendant quelques minutes.



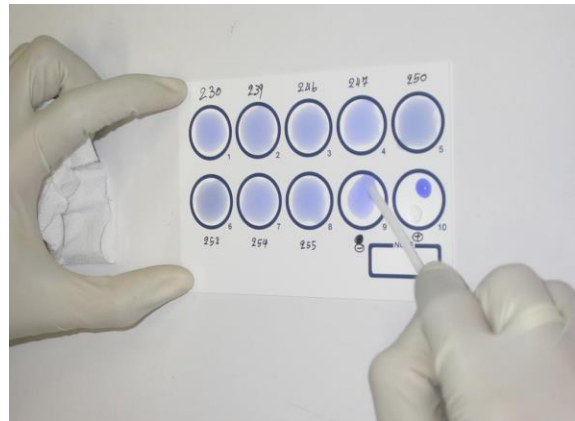
Réactifs : tampon, antigène et sérums de référence



Dépôt de l'antigène puis du sérum dilué



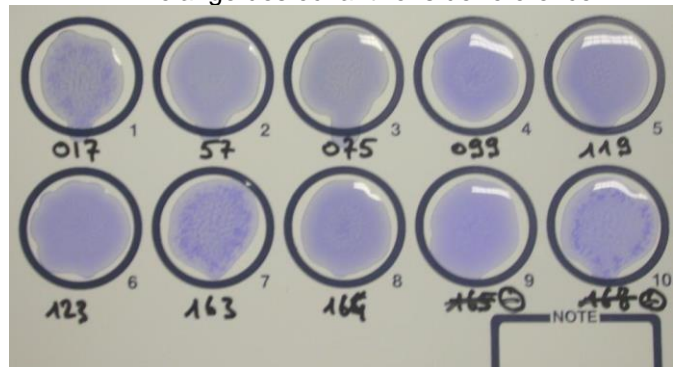
Mélange de l'antigène et du sérum



Mélange des échantillons de référence



Agitateur rotatif 70rpm



Lecture des résultats

Bien que le test ait été développé avec *T. evansi*, il peut croiser avec d'autres espèces de trypanosomes et détecte donc également les IgM dirigées contre *T. vivax* et dans une moindre mesure celles dirigées contre *T. congolense*. Comme les IgM sont consommées au cours des réactions immunes IgM / parasite, leur disponibilité dans le sang est fluctuante, ce qui fait que le test admet des réponses faussement négatives (quand les IgM ont été consommées en détruisant une population parasitaire importante). A l'inverse, les agglutinations non spécifiques sont parfois observées et fournissent régulièrement 2 à 5% de faux positifs ou plus. Cette proportion peut varier d'une population à l'autre et d'une espèce hôte à l'autre. Le test demeure assez utile dans la détection des animaux infectés dans des foyers récents où sa valeur prédictive positive est élevée. Sa sensibilité est bonne chez les espèces hôtes sensibles comme les chevaux et les dromadaires, mais elle est assez faible voire très faible chez les espèces hôtes peu sensibles à *T. evansi* comme les bovins et buffles notamment. S'agissant d'un test commercialisé, le protocole est fourni avec le kit de test. A titre d'information il est reproduit en annexe.

4.4 Test de trypanolyse

Le test de trypanolyse (TTL) permet de détecter des anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes variables de surfaces de trypanosomes vivants; il est fondé sur la capacité du

complément à se fixer sur les immuncomplexes (complexes antigène-anticorps) et provoquer la lyse des trypanosomes par clivage successif de ses composants. La réalisation du test nécessite de disposer de trypanosomes vivants et de complément de cobaye; sa mise en place est complexe, coûteuse, longue et nécessite le sacrifice de plusieurs animaux. Malgré ces inconvénients, le TTL présente un avantage majeur : il s'agit d'un test fonctionnel, qui montre la présence d'anticorps protecteurs, et permet donc de révéler des infections indétectables par la parasitologie. Développé pour l'utilisation chez l'homme avec *T. b. gambiense*, il utilise des trypanosomes vivants exprimant 3 types de variants antigéniques (LiTat 1.3, LiTat 1.5, et LiTat 1.6). Le test est positif lorsque le pourcentage de lyse des trypanosomes est supérieur à 50% pour au moins un des trois variants. Le TTL peut s'effectuer sur sérum, plasma ou sang sur papier filtre (25 µl de sang sur papier Whatmann 4). Un TTL développé avec *T. evansi* RoTat 1.2 est effectué au laboratoire de référence de l'OIE sur le surra, à l'IMT d'Anvers. La méthode n'est pas disponible pour les autres espèces de trypanosomes (*T. vivax*, *T. congolense* et *T. brucei*) car il conviendrait au préalable d'identifier des souches présentant des variants universels. Au vu de ses inconvénients, on ne recommande donc pas cette méthode pour le diagnostic de routine chez l'animal ; elle pourrait toutefois s'avérer utile pour le dépistage sensible d'animaux issus de zone infectée de surra, destinés à l'exportation vers des zones non infectées.

5. Recommandations sur l'usage des tests

Comme la majorité des tests biologiques, les tests et méthodes décrits dans le présent recueil ont des sensibilités et spécificités limitées. De plus, les performances et paramètres des tests varient grandement d'une espèce et d'un lieu géographique à l'autre. Ainsi, il n'existe aucun test parasitologique ou sérologique permettant de distinguer *T. evansi* des autres Trypanozoon (*T. brucei* ssp.), et à ce jour, même les tests moléculaires peinent à distinguer *T. evansi* des autres Trypanozoon (*T. brucei* ssp.), puisqu'il n'existe aucun test positif permettant de caractériser un *T. evansi* par une PCR unique. En conséquence, le diagnostic de « surra » résulte le plus souvent d'une synthèse des informations épizootiologiques et des résultats et observations de laboratoire. Pour ces raisons, dans le présent paragraphe, sont recommandées des associations de tests et de mesures adaptées à divers contextes et aux espèces hôtes les plus importantes. Ce sont des lignes directrices et des conseils qui pourront être utiles mais devront être adaptés à toute situation nouvelle, en vue d'apporter un diagnostic qui soit le plus sensible et le plus correct possible et adapté à l'objectif de l'enquête. Les situations d'importation en zone indemne d'animaux issus de zones infectées feront l'objet de contrôles particulièrement rapprochés et mettant en jeu les méthodes les plus sensibles.

5.1 Méthodes de diagnostic recommandées

5.1.1 Examen microscopique

L'observation microscopique (x400-x1000 avec huile d'immersion) d'un frottis coloré au Giemsa fait à partir du sang de l'hôte ou d'un rongeur de laboratoire ayant servi d'amplificateur, permet d'identifier les sous-genres Trypanozoon, Duttonella, Nannomonas, Herpetomonas, Schizotrypanum ou Megatrypanum, sur la base des critères morphologiques et morphométriques des parasites.

Quand des échantillons frais sont disponibles, la sensibilité peut être accrue en réalisant les tests HCT ou BCM ; en outre les critères de motilité peuvent être utiles à l'identification des parasites.

Quand une forte sensibilité est requise (par exemple animaux suspects en zone indemne ou animaux issus d'une zone infectée et destinés à l'exportation vers une zone indemne), la méthode HCT et l'inoculation de rongeurs de laboratoires sont recommandées.

5.1.2 PCR

L'ADN doit être préparé de préférence (plus sensible) à partir du buffy coat obtenu par centrifugation à 8.000g de 0.5ml de sang sur anti-coagulant ; à défaut, il peut être préparé avec du sang, de préférence par la méthode phénol chloroforme (plus sensible), ou encore avec un kit commercial (Chelex, Qiamp etc). Les examens de PCR sont effectués comme décrit ci-avant, et selon les cas avec divers jeux d'amorces, voire avec tous les jeux disponibles en cas d'inconnue sur la ou les espèces possiblement présente(s) dans l'échantillon. La PCR est très sensible mais connaît ses limites puisque lorsque la parasitémie est en deçà de 1-20 trypanosomes par ml, les examens par PCR demeurent le plus souvent négatifs. De plus, elle admet parfois des résultats faussement positifs dus à des contaminations. Les contrôles et les précautions doivent donc être très stricts.

5.1.3 ELISA

Les méthodes ELISA sont peu spécifiques d'espèce et croisent de manière variable, parfois fortement, entre sous-genres ; plusieurs tests peuvent donc être appliqués selon le contexte, ELISA *T. congolense* savane, ELISA *T. vivax*, ELISA *T. brucei* (faible sensibilité chez les bovins), ELISA *T. evansi* etc. Les scores des divers tests peuvent même être comparés pour en déduire la ou les espèces présentes, mais ces méthodes sont délicates d'interprétation. Les échantillons de sérum ou de plasma sont testés avec les conjugués d'espèces, ce qui limite l'usage dans certaines espèces pour lesquelles des conjugués spécifiques ne sont pas disponibles commercialement (dromadaires, éléphants, cerfs etc). Dans ces cas on peut utiliser un conjugué à la protéine A (validé chez les dromadaires) ou à la protéine G (évalué chez les éléphants en Asie). Pour ces cas particuliers et/ou lorsqu'il n'existe pas d'échantillons de références positifs et négatifs, la seule densité optique sera considérée. Dans ces cas, seule une suspicion pourra être émise.

Les méthodes ELISA pour les trypanosomes ont été largement évaluées, utilisées et validées dans les secteurs géographiques infectés (Afrique, Amérique Latine et Asie). Dans les autres secteurs, à défaut de besoin, aucune évaluation préalable n'a été faite. Il convient de les utiliser avec prudence, car, par exemple, lorsque l'ELISA *T. evansi* a été utilisée pour la première fois en France, elle a révélé de forts taux de faux positifs chez les moutons (phénomène non observé chez les bovins ni les chevaux). L'ELISA VSG a également été appliquée dans ce lot de sérums et a révélé un taux semblable d'échantillons faussement positifs, mais pas obligatoirement sur les mêmes échantillons. L'origine des croisements sérologiques n'a pas été identifiée. Dans ces cas, le recours au test de trypanolyse pourrait

présenter des avantages qu'il conviendrait d'évaluer, mais son coût très élevé est le plus souvent un obstacle majeur

5.1.4 CATT/*T. evansi*

Les échantillons de sérum ou de plasma sont testés au 1:4 comme décrit par le fabricant. Les échantillons considérés positifs sont ceux qui présentent 1+ ou davantage, les échantillons douteux sont considérés négatifs. Le test n'est pas spécifique d'espèce, il a été démontré qu'il croise avec *T. vivax* notamment. Le test présente régulièrement une très bonne valeur prédictive positive chez les chevaux et dromadaires. Malheureusement, il présente manifestement des faux positifs notamment chez les chevaux, et des faux négatifs, en particulier chez les bovins (démonstration faite en conditions d'infections expérimentales en Thaïlande). Sa valeur diagnostique est donc limitée, et on ne peut déclarer « infecté » un animal seulement positif au CATT, d'autres tests doivent venir en appui à ces résultats.

5.2 Méthodes recommandées chez les équidés et camélidés pour le surra

Le commerce international et la circulation des animaux concernent en particulier les équidés (compétitions) et les camélidés, ce qui requiert en conséquence des contrôles stricts, en particulier pour le surra. On peut appliquer les principes suivants (des recommandations plus complètes fondées sur ces tests et statuts sont présentées au paragraphe 4.4) :

- Un équidé ou un dromadaire est négatif aux tests du surra si il est négatif aux tests suivants : ELISA-*T. evansi* (conjugué « anti-horse IgG whole molecule » chez les équidés et conjugué à la « protéine A » chez le dromadaire), CATT/*T. evansi*, PCR-TBR et observation microscopique du sang ou du buffy coat.
- Un équidé ou un dromadaire est considéré infecté par un Trypanozoon si il est positif à l'examen microscopique, ou à la culture sur rongeur, et il est considéré comme suspect si il est positif au test PCR-TBR (ou autres amorces permettant la détection de *T. evansi*) ; dans ce cas il doit être re-prélevé et re-testé 1 semaine plus tard ; s'il est à nouveau positif, son statut de suspect est confirmé.
- Un équidé ou un dromadaire est considéré séropositif au surra s'il est positif à l'ELISA-*T. evansi* et/ou au CATT/*T. evansi*. Pour les équidés, dans ce cas, l'animal doit subir l'examen par la technique de fixation du complément pour la dourine (CFT-dourine) ; s'il est positif au

CFT-dourine, il sera également considéré positif pour la dourine; s'il est négatif à ce test, il n'est considéré positif que pour le surra.

Il est à préciser que le rapport d'analyse indique que l'animal est « négatif aux tests du surra », et non pas que l'animal est « non infecté ou indemne », l'absence de preuve d'infection n'étant pas une preuve d'absence d'infection.

5.3 Méthodes recommandées dans les autres espèces pour toutes trypanosomoses

Un animal est négatif aux tests des trypanosomoses africaines s'il est négatif aux tests suivants :

- ELISA-*T. evansi*, ELISA *T. vivax*, ELISA *T. congolense* (savane) et ELISA *T. brucei* (pour les conjugués voir ci-dessous),
- CATT/*T. evansi*,
- PCR avec les amorces suivantes : TBR, TVW, TCS, TCF, TCK, et TRYP1 ou nested ITS1 ; en cas de positivité uniquement avec les 2 derniers jeux d'amorces (qui amplifient l'ITS1 de l'ADN ribosomal), toutes les autres amorces spécifiques devront être utilisées (détection de *T. simiae*, *T. godfreyi*, *T. theileri* etc voir paragraphe PCR).
- Examen microscopique du buffy coat de préférence, du sang à défaut.

Un animal est considéré infecté par un trypanosome africain s'il est positif à une des PCR ou à l'examen microscopique sans que l'identification à *T. theileri* ait pu être établie (bovins). Dans ces cas des essais d'isolement de parasites par inoculation intra-péritonéale de sang infecté à des songeurs doivent être entrepris.

Un animal est considéré séropositif aux trypanosomoses africaines s'il est positif à l'un au moins des tests sérologiques (ELISAs ou CATT).

Les conjugués doivent être utilisés selon les hôtes comme suit:

- Bovins, buffles asiatiques: anti-bovine IgG whole molecule;
- Porcs: conjugué anti-porc ;
- Porcs et cerfs (hog deer): conjugué à la Protéine G
- Moutons et chèvres : conjugués anti-caprins ou ovins ;
- Dromadaires, éléphant d'Asie: conjugué à la Protéine A;
- Rats: anti-rat IgG whole molecule.

- Chiens : conjugués anti-chien

Pour les autres espèces, des conjugués n'ont pas encore été définis.

Il est à préciser que le rapport d'analyse d'un test négatif est bien « test négatif », et non pas « animal non infecté ou animal indemne ».

5.4 Propositions de recommandations pour le commerce international des équidés ou camélidés

Les échanges particulièrement importants et le risque d'introduction d'un parasite transmis mécaniquement, donc potentiellement cosmopolite, impliquent de prendre des mesures particulières chez les équidés et camélidés exportés depuis une zone infectée vers une zone indemne.

Les propositions suivantes sont également faites auprès de la commission des normes biologiques de l'OIE, afin de compléter le chapitre sur le Surra du manuel sur les animaux terrestre de l'OIE :

Pour le commerce international des équidés et camélidés depuis une zone infectée vers une zone indemne :

Deux quarantaines de quatre semaines chacune devront être appliquées, la première dans la **ferme d'origine** et la seconde dans la **ferme de destination** pour le commerce international des équidés et camélidés **depuis une zone infectée vers une zone indemne**.

Pour être **autorisée à la commercialisation**, un animal doit être issu d'une « **ferme non-infectée** » située dans une « **zone non-suspecte** » et être « **négatif à tous les tests du surra** » 2 fois à 3-4 semaines d'intervalle dans chacune des quarantaines.

Une ferme est située dans une « **zone non-suspecte** » si dans un périmètre de 30Km autour de la ferme, il n'y a eu aucun cas de surra signalé dans les 3 dernières années.

Est considérée comme une « **ferme non-infectée** », une ferme située dans une « zone non-suspecte » qui n'a introduit dans les 3 dernières années que des animaux originaires de fermes non-infectées (donc situées dans des zones non-suspectes) ayant subi les 2 quarantaines et ayant présenté des résultats négatifs aux tests du surra.

Pour obtenir le statut de « **ferme non-infectée** », une ferme doit se situer dans une zone non-suspecte, et tous les mammifères de l'élevage doivent présenter des résultats négatifs aux tests 2 fois à 3 mois d'intervalle.

Pour conserver ce statut, tous les mammifères de l'élevage doivent présenter des résultats négatifs aux tests tous les 10-12 mois.

6. Cahiers de laboratoire

Pour assurer le suivi de la qualité dans les laboratoires, il est essentiel de pouvoir retracer toutes les opérations réalisées (traçabilité). Pour cela on assigne un cahier de laboratoire pour chaque technicien ou pour chaque poste (plus courant) ; il s'agira d'un cahier à feuilles non détachables pour éviter les ajouts ou retraits ; on utilise de l'encre (indélébile).

- 1) Dater tous les événements. Inscrire le nom du technicien s'il y a plusieurs utilisateurs.
- 2) Inscrire le protocole référencé qui est suivi (présent dans le recueil des protocoles agréés)
- 3) Inscrire avec précision toutes les opérations menées à côté ou en dehors des protocoles référencés.
- 4) Inscrire tout changement de réactif ou de stock et les références des produits en cours. Surtout inscrire avec précision tous les écarts qui ont été faits par rapport au protocole (durée d'incubation, concentration, produit nouveau, panne de courant, écarts de température, rupture de stock, etc). A ce stade, un lien avec un cahier de gestion des stocks peut faciliter leur suivi et la mise en commande pour éviter les ruptures.
- 5) Les observations inhabituelles, les faits marquants, les événements parallèles au protocole. Chiffrer tout ce qui peut l'être.
- 6) Indiquer de manière précise et pratique où les échantillons ou informations ont été stockés à la fin du protocole. Coller les photos s'il y a lieu (PCR) et signer la photo en débordant sur le cahier avec les commentaires et les conclusions même si elles ne sont que partielles ; cela permet de retracer les chaînes logiques qui amènent aux étapes suivantes.
- 7) Si besoin, et/ou pour un gain de temps, une « check-list » peut être établie, et les points effectués cochés au fur et à mesure du déroulement d'un protocole.
- 8) A la fin de l'exercice, la validation doit être donnée par le chef de laboratoire

7. Echantillons et souches de référence

Un laboratoire de référence des trypanosomes doit disposer d'un ensemble de matériel biologique de référence qui inclut les souches parasitaires, des ADN et des sérums de référence.

7.1 Les souches de référence

Des **souches de trypanosomes de mammifères** doivent être conservées vivantes au laboratoire de référence afin de disposer en permanence de matériel biologique standard, de partager ce matériel entre les laboratoires, de produire des parasites vivants à la demande, et de caractériser des souches d'intérêt particulier en les cultivant sur mammifères, bétail ou rongeurs.

Un pool des **souches parasitaires de référence**, conservées vivantes, sera défini au cours du programme de jumelage et comportera des souches standards internationales, des souches standard locales et des souches caractérisées par divers moyens pour diverses propriétés telle que la chimiorésistance, la pathogénicité, l'origine de l'hôte, l'origine géographique, etc.

Une **liste de souches de référence** sera établie et ces souches mises en culture sur rats afin de préparer puis distribuer dans les laboratoires de référence des cryostables de ces souches parasitaires de référence. Ce pool de souches de référence devra, a minima, comporter une à trois souches de chaque espèce : *T. vivax*, *T. congolense* savane, *T. congolense* forêt, *T. congolense* Kilifi, *T. brucei brucei*, *T. evansi*, *T. lewisi* (pour l'identification dans les colonies de rats) et si possible : *T. simiae*, *T. godfreyi*, *T. tsavo* voire *T. theileri* et *T. musculi* (pour identification dans les colonies de souris).

La **préparation des cryostables** : la conservation de trypanosomes vivants peut être faite de préférence en azote liquide, mais également, à plus court terme, dans un congélateur à - 80°C. Pour ce faire, le sang parasité, de préférence collecté dans la phase ascendante d'une parasitémie élevée, est mélangé avec un tampon cryostabilisant composé de PSG 1% (tampon obtenu par l'ajout d'1g de glucose par 100ml de PBS) additionné de 15% de glycérol (85 ml de PSG 1% + 15 ml de glycérol). Le sang doit être collecté avec un anti-coagulant (EDTA, héparine ou citrate) et placé aussi vite que possible sur glace, la parasitémie contrôlée, puis le cryostabilisant ajouté goutte à goutte est mélangé à parts égales avec le sang. Le sang stabilisé est réparti dans des cryotubes étiquetés comme indiqué dans les sections suivantes, puis placés dans une boîte de congélation. La boîte de congélation peut être achetée ou

fabriquée en plaçant environ 1 cm d'épaisseur de plasticine autour d'un récipient en verre ou plastic (volant thermique), le tout enroulé dans de l'élastoplaste pour en assurer la cohésion. La boîte de congélation doit être conservée à -20°C avant son utilisation. Au moment de la préparation des cryostables, on sort la boîte du congélateur à -20°C, on place les cryotubes dedans, puis on met la boîte dans un congélateur à -80°C pendant une nuit ; le lendemain on plonge les tubes dans l'azote liquide. A défaut de congélateur à -80°C, on peut suspendre les cryotubes dans la phase gazeuse de l'azote pendant une nuit, avant de les plonger dans l'azote liquide.

Au moment de l'utilisation des cryostables, on les extrait de l'azote et provoque une décongélation rapide à température ambiante ou dans le creux de la main; dès que le cryostable est à nouveau liquide, on le place sur glace pilée jusqu'à utilisation. Pour une mise en culture sur rongeurs, on recommande généralement de faire un passage sur souris (0,1 ml en intrapéritonéale) avant de transférer des rats pour une production plus massive.

La **Nomenclature pour le référencement des cryostables** : pour permettre d'identifier et distinguer un isolat, une souche (cultivée sur rongeur ou *in vitro*), voire un clone, le référencement des parasites est important. Si la ou les espèces ou sous espèce(s) n'est ou ne sont pas toujours parfaitement identifiée(s) dans un isolat de terrain, elles le sont après un ou plusieurs passages sur rongeurs. Il est donc généralement admis d'indiquer l'espèce unique de trypanosome après caractérisation et culture sur rongeurs. Dans les cas où l'on cryostabilise un matériel biologique qui n'a pas encore été pleinement caractérisé, il est prudent de n'indiquer que de manière optionnelle (entre parenthèses) l'espèce dans le nom de l'isolat. On distingue donc 3 types de cryostables :

- les **isolats de terrain** sont des échantillons de sang prélevés sur l'hôte d'origine et directement cryostabilisés ; on donne la référence de l'animal d'origine à ces isolats qui seront caractérisés par la suite (par PCR) et éventuellement cultivés sous forme de souches parasitaires uniques, ou parfois multiples en cas d'infections mixtes, mais cette dernière hypothèse est rare car des exclusions parasitaires sont fréquentes lors de passages sur rongeurs. On peut toutefois également avoir identifié un trypanosome dès sa détection, un nom d'espèce pourra alors être adjoint, mais il devra être confirmé par la suite. On référence ces isolats à l'aide de codes et de la manière suivante : (espèce putative) Espèce hôte d'origine, numéro de référence de l'hôte, lieu de l'isolement, jour de préparation du cryostable ; toutes ces informations doivent tenir sur une seule ligne (voir exemple ci-après).

- les **souches parasitaires** sont des isolats qui ont été cultivés une ou plusieurs fois sur rongeurs de laboratoire ; elles sont supposées avoir été identifiées précisément par PCR. On référence ces souches à l'aide de codes et de la manière suivante : sur une première ligne

sont indiqués : *Trypanosoma* species, espèce hôte d'origine, numéro de référence de l'hôte, lieu de l'isolement (ville ou province), année d'isolement, et sur une deuxième ligne on indique le nombre de passages sur souris (M#), le nombre de passage sur rat (R#), le jour de préparation du cryostable. Seule cette deuxième ligne pourra être variable, les informations de la première ligne demeureront tout au long des divers passages sur rongeurs.

- les **clones parasitaires** sont des souches obtenues par culture à partir d'un spécimen unique, cultivés une ou plusieurs fois sur rongeurs de laboratoire ; puisqu'il peut y avoir plusieurs clones issus de la même souche, il leur est adjoint un code de référence identitaire. Sur la première ligne on indique : référence du clone, *Trypanosoma* species, espèce hôte d'origine, numéro de référence de l'hôte, lieu de l'isolement (ville ou province), année d'isolement, et sur la deuxième ligne on indique le nombre de passages sur souris (S#), le nombre de passage sur rat (R#), le jour de préparation du cryostable.

Pour la codification abrégée on utilise les éléments suivants :

<i>Trypanosoma</i> species		Espèces hôtes	
<i>Trypanosoma vivax</i> :	TV	Bovin à viande/beef cattle	BC
<i>Trypanosoma congolense</i> savane :	TCS	Bovin laitier/dairy Cattle	DC
<i>Trypanosoma congolense</i> forêt:	TCF	Bos taurus	BT
<i>Trypanosoma congolense</i> Kilifi:	TCK	Bos indicus	Bi
<i>Trypanosoma simiae</i> :	TSM	Buffle d'eau (<i>Bubalus bubalis</i>)	BB (ou B)
<i>Trypanosoma brucei brucei</i> :	TBB	Mouton (ovin)	OV (ou S)
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> :	TBG	Chèvre (caprin)	CP (ou G)
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> :	TBR	Cheval (Horse)	HH (ou H)
<i>Trypanosoma evansi</i> :	TE	Ane (donkey) (mule DH)	DD (ou A)
<i>Trypanosoma equiperdum</i> :	TEQ	Porcs (<i>Sus scrofa</i>)	SS (ou P)
<i>Trypanosoma lewisi</i> :	TL	Chien	CN (ou D)
<i>Trypanosoma lewisi-like</i> :	TLL	Eléphant Asie	EM (ou E)
<i>Trypanosoma musculi</i> :	TM	<i>Rattus norvegicus</i>	RN (ou R)
<i>Trypanosoma Theileri</i> :	TT	<i>Mus musculi</i>	MM (ou M)
<i>Trypanosoma</i> species	Tsp	Autres : initiales du nom de l'espèce	

Il n'est pas fait mention des races, ces éléments doivent être portés dans les fiches d'accompagnement.

Exemples :

- le cryostable d'un isolat de terrain, collecté à Gaoua sur un baoulé nommé F32, le 25 novembre 2012, identifié comme *T. vivax* au microscope et placé directement dans l'azote liquide sera référencé:

(TV)BT-F32 Gaoua-25/11/12

- le cryostable d'une souche de *T. evansi*, trouvée à Nan, en Thaïlande, sur un bovin à viande nommé P12, le 10 octobre 2010, isolée initialement sur souris et cultivé deux fois sur rat et placé dans l'azote liquide le 16 avril 2012 sera référencé comme suit :

Ligne 1 (invariable): TE-BC-P12-Nan2010

Ligne 2 (variable): S1R2-16/04/12

- le cryostable d'un clone de *T. congolense* savane baptisé IL 1180, isolé sur un Lion du parc Serengeti en 1971, et passé 5 fois sur souris et 3 fois sur rat, placé en azote liquide le 20 décembre 2008 sera référencé:

Ligne 1 (invariable): IL1180-TCS

Ligne 2 (variable): S5R3-20/12/08

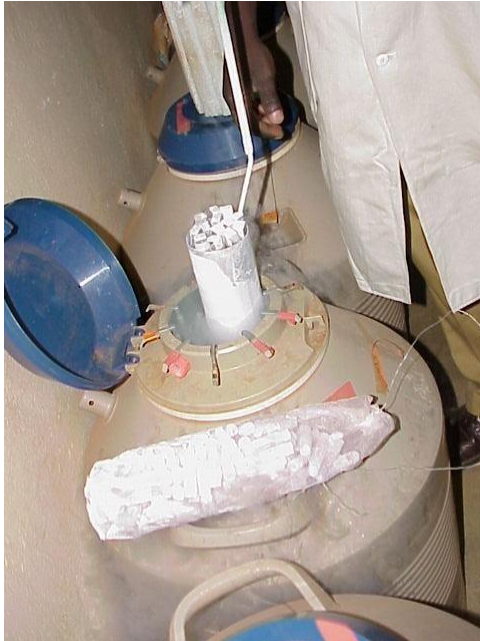
7.2 Les ADN de référence

Les **ADN de référence** seront préparés à partir de ces souches parasitaires de référence ; ils seront utilisés comme témoins positifs dans les tests de PCR, à l'aide de gamme de concentrations connues, et seront échangés à l'international pour permettre à des laboratoires de mettre en place des systèmes de diagnostic équivalents et référencés.

Pour permettre d'évaluer la sensibilité de la réaction de PCR, il conviendra d'utiliser un témoin positif dans lequel la concentration en ADN ne soit pas trop forte, afin d'appréhender une éventuelle perte de sensibilité de la réaction. On exploitera ainsi dans le suivi de qualité le caractère semi-quantitatif de la PCR. Si besoin, on peut utiliser 2 échantillons de référence positifs pour la PCR, l'un sous forme d'ADN purifié dilué et l'autre sous forme d'échantillon de terrain (sang d'un animal) naturellement positif préparé au Chelex par exemple. Toutefois ce double témoin a un coût qui s'ajoute aux 2 témoins positif et négatif. Le fait d'utiliser 2 types de témoins positifs, dont l'un est fort et l'autre faible, rend plus facile la détection d'une perte de sensibilité, même si le fonctionnement global de la PCR est préservé.

Au cours de ce programme de jumelage, le CIRDES est chargé de reconstituer la banque de cryostables de référence et de produire, en quantité suffisante pour le stockage dans les laboratoires de référence et la diffusion auprès des laboratoires partenaires, des aliquotes d'ADN des espèces suivantes (une à trois souches par espèce) : *T. vivax*, *T. congolense* savane, *T. congolense* forêt, *T. congolense* Kilifi, *T. brucei brucei*, *T. evansi*, *T. lewisi* (pour

l'identification dans les colonies de rats) et si possible : *T. simiae*, *T. godfreyi*, *T. tsavo* voire *T. theileri* et *T. musculi* (pour identification dans les colonies de souris).



Conservation de souches en azote



Conservation des sérums de référence stock à -80°C

7.3 Les sérums ou plasma de référence

Des **sérums de référence positifs** générés en quantité suffisante (20-40ml) et de préférence au cours **d'infections expérimentales** menées avec des souches parasitaires de référence sont utilisés comme témoins dans les tests ELISA et échangés à l'international pour permettre à des laboratoires de mettre en place des systèmes de diagnostic équivalents. Dans le cas des trypanosomoses il peut s'agir de **nombreuses espèces** (bovins, moutons, chèvres, chevaux, ânes, chiens, porcs, etc) puisqu'ils disposent potentiellement de très nombreuses espèces hôtes.

De même, des **sérums de référence négatifs**, générés en quantité suffisante (20-40ml) et de préférence sur les mêmes animaux que précédemment, juste avant leur infection expérimentale seront préparés, stockés et utilisés avec les sérums de référence positifs.

Ces sérums ou plasma de référence positifs et négatifs doivent être issus d'au moins 3 individus différents, être aliquotés et conservés dans des conditions optimales, soit au congélateur à -20°C pour les aliquotes en cours de consommation, et en congélateur à basse température (-80°C) pour le stock au long terme. Lorsqu'ils sont en quantité suffisante pour être distribués aux trois laboratoires, ces échantillons seront expédiés sous froid pour servir de référence commune. Dans le cas contraire on procédera à l'envoi d'une quantité

restreinte de ces échantillons qui sera utilisée à l'étalonnage des tests dans les 2 autres laboratoires. Mieux, si la technologie est disponible, ces échantillons seront lyophilisés pour être conservé et distribués plus aisément et sans risque d'altération rapide.

Lorsque des infections expérimentales en nombre suffisant ne sont pas possibles pour la genèse des sérums de référence, il est possible d'utiliser des **échantillons de terrain** si ils ont été dûment caractérisés (les échantillons de référence positifs doivent être positifs à plusieurs tests et les échantillons de référence négatifs doivent être négatifs à tous les tests).

Dans ce cas on étudie la distribution des réponses des individus dans la population, on établit leur moyenne, et on sélectionne 3 échantillons de référence positifs et 3 échantillons de référence négatifs qui sont représentatifs de la population cible, c'est-à-dire présentant une réactivité en ELISA (1) égale à la moyenne, (2) inférieure de 10% à la moyenne et (3) supérieure de 10% à la moyenne. Ces trois échantillons placés en double (donc dans 6 puits différents) doivent répondre de manière attendue au moins pour 5 d'entre eux; à défaut la plaque ELISA doit être rejetée. Seul le chef de laboratoire peut valider des plaques, au vu des résultats des témoins.

8. Contrôles de qualité interne et biosécurité

Les contrôles de qualité internes sont des paramètres fondamentaux qui interviennent dans l'évaluation de la répétabilité et de la reproductivité des tests de laboratoire notamment sérologiques. Dans le contexte actuel de la globalisation des échanges et de l'émergence ou ré-émergence des maladies animales et surtout zoonotiques, celle-ci fait appel aux normes ISO à travers deux approches :

1. La certification qui consiste à évaluer la conformité aux exigences du système de management, et
2. L'accréditation qui consiste à évaluer la conformité aux exigences du système mais surtout la compétence technique et managériale du laboratoire.

Au CIRAD à Montpellier, les procédures appliquées sont décrites dans un document intitulé « Procédure pour le traitement de la demande et des échantillons pour le diagnostic de la trypanosomose animale dans le cadre du laboratoire de référence de l'OIE sur les trypanosomoses animales d'origine africaine », et le détail des méthodes de diagnostic appliquées est décrit extensivement dans le présent document. La gestion de la qualité s'appuie notamment sur l'accréditation du CIRAD pour la sérologie (/unité ASTRE), selon la norme NF en ISO/CEI 17025 et les règles d'application du Cofrac sous le numéro 1-2207, l'application générale des mêmes règles de fonctionnement, l'utilisation de laboratoires P2 et P3, et le partage des équipements contrôlés dans le cadre de l'accréditation (calibrage, métrologie etc).

Au CIRDES, le laboratoire est accrédité ISO 17025 pour l'activité de génotypage de *Glossina Palpalis*. Pour obtenir ce statut, la méthode de génotypage a été soumise à une étape de validation suivie d'une évaluation à blanc. Puis, un système de management de la qualité à portée flexible a été mis en place avec, un manuel, ou politique qualité, des procédures et des modes opératoires, des audits internes, des plans de formation et de contrôle de la métrologie et un système de gestion documentaire. L'évaluation finale est intervenue sous le contrôle d'un organisme accréditeur agréé par l'ISO.

Des actions sont actuellement en cours pour certifier la méthode de diagnostic des trypanosomoses par la sérologie et la PCR.

Sur la base des acquis obtenus à travers l'accréditation du laboratoire de génotypage du CIRDES, le système de management à portée flexible mis en place sera élargi en y intégrant le volet portant sur la certification de l'activité de diagnostic sérologique et moléculaire des trypanosomoses. L'équipe de diagnostic du laboratoire du CIRDES est très impliquée dans le

système de management de la qualité et capitalisera son expérience pour l'atteinte rapide de l'objectif visé.

La biosécurité représente l'ensemble des mesures visant à prévenir et à contrer les dangers qui sont liés à la manipulation et à l'utilisation de matériel biologique (microorganismes, organismes génétiquement modifiés), dans les laboratoires de recherche, les hôpitaux et les industries. Pour ce faire nous devons calculer le niveau de risque, pour ensuite être en mesure d'appliquer les bonnes règles de sécurité. Les niveaux de risque imposent une classification correspondante pour les laboratoires qui travaillent avec ces organismes à risque. Avec cette classification des groupes de risque, les laboratoires sont en mesure de définir leur niveau de confinement.

Quatre groupes de risques sont définis :

□ **Groupe de risque 1**

Les agents biologiques du groupe de risque 1 sont peu susceptibles d'infecter une personne saine ou un animal sain. Donc ils représentent un risque faible pour la personne et un risque faible pour la collectivité. Il s'agit de *Trypanosoma theileri* par exemple, fréquemment observé dans le sang des bovins.

□ **Groupe de risque 2**

Les organismes pathogènes susceptibles de provoquer une maladie humaine ou animale, ils constituent rarement un danger grave pour le personnel de laboratoire, pour la collectivité ou pour l'environnement. L'exposition à ces agents pathogènes provoque rarement une infection grave. Toutefois, il existe des mesures préventives et thérapeutiques efficaces en pareil cas, et le risque de propagation est limité. En résumé, le risque est modéré pour la personne qui travaille avec l'organisme et le risque est faible pour la collectivité. Il s'agit par exemple de *Trypanosoma brucei brucei* et *T. brucei gambiense* ; par extension on traite de la même manière les

autres espèces animales telles *T. congolense*, *T. vivax* et *T. lewisi*.

□ **Groupe de risque 3**

Ces agents pathogènes provoquent généralement une maladie humaine grave mais qui se transmet rarement par simple contact de personne à personne. Ils causent rarement des maladies ne pouvant pas être traitées. Il existe habituellement des mesures préventives et thérapeutiques efficaces. Le risque est donc élevé pour la personne et faible pour la

collectivité. Il s'agit de *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *T. cruzi*.

□ **Groupe de risque 4**

Organismes pathogènes causant généralement une maladie humaine très grave, souvent impossible à traiter et facilement transmissible d'un individu à l'autre par contact direct ou indirect. Ils représentent un risque élevé pour la personne et un risque élevé pour la collectivité (type Ebola).

Les règles de biosécurité appliquées au diagnostic des trypanosomoses dans le laboratoire du CIRDES sont relatives principalement à la prévention des contaminations par les produits connus ou suspectés d'être cancérigènes utilisés lors des tests de PCR. Pour cela, il est exigé le port de blouses blanches à longues manches et de gants pour tout le personnel. En outre, la prévention des troubles respiratoires dus à l'utilisation d'aérosols ou à l'exposition de produits chimiques au laboratoire est assurée par l'aspiration quotidienne de l'air ambiant dès l'ouverture par un aspirateur industriel.

Dans le cadre des programmes d'assurance qualité et de contrôles de compétences, le CIRDES et le CIRAD suivent les critères généraux de compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essai, et procèdent à des analyses d'échantillons en aveugle définies ci-après comme la standardisation inter-laboratoire.

9. Standardisation inter-laboratoires

Un laboratoire de référence est par définition habilité à établir le statut d'un échantillon au regard des différents tests pour lesquels il est qualifié. Il diffuse auprès des autres laboratoires les méthodes de diagnostic, avec des protocoles et éventuellement des échantillons de référence. Dans un réseau de laboratoires de référence, le statut des échantillons établi dans un laboratoire doit être le même dans le ou les autres laboratoires, à quelques exceptions près qui peuvent résulter de l'altération des échantillons par le transport ou du fait que le statut d'un échantillon est en limite de positivité. Sur la base d'une série d'échantillons de contrôle, des comparaisons statistiques doivent être réalisées ; elles permettent de garantir la concordance entre les laboratoires (reproductibilité).

Pour vérifier qu'un réseau de laboratoire de référence est correct, il convient de distribuer dans ce réseau des lots d'échantillons de statut connu et établi dans chacun des laboratoires afin de les tester, et de comparer les résultats obtenus dans les divers sites. Ces échanges de matériel biologique sont réalisés en aveugle entre les laboratoires et programmés régulièrement pour assurer une fiabilité constante des résultats.

Comme indiqué dans le manuel de l'OIE (Chapter 1.1.6, *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases*), une série d'échantillons de contrôle doit être testée de manière répétée, par plusieurs opérateurs, dans des séries d'essais multiples réalisés à des jours différents. Le nombre de résultats obtenu doit être suffisant pour s'assurer que le matériel à tester est bien fiable, y compris en termes d'homogénéité.

Rappel sur le matériel biologique exempté pour l'expédition de matériel biologique : Est considéré comme échantillon animal exempté et non soumis aux contraintes du matériel frais, le matériel biologique ne contenant pas de matières infectieuses (par exemple matériel de type ADN ou ARN purifié), ou contenant des matières inactivées (ex après traitement à 65° pendant 3h), ou correspondant à du sérum ou du sang séché sur un matériel absorbant.

Dans le cas des tests de diagnostic des trypanosomoses, les méthodes appliquées sur échantillons frais ne peuvent faire l'objet d'une comparaison inter-laboratoires ; seuls les méthodes appliquées aux échantillons conservés sous froid ou desséchés peuvent être évaluées de manière comparative au sein du réseau de laboratoires. Pour effectuer ces comparaisons, on favorisera le choix d'échantillons de contrôle sous forme de matériel biologique sec afin de simplifier les expéditions. Seront échangés entre les laboratoires (i) des lames de frottis colorés, (ii) des sérums sur papier filtre, (iii) des ADN purifiés en microtubes et/ou sur papier filtre, et (iv) des sangs sur papier filtre (v) des sérums lyophilisés.

Des comparaisons qualitatives seront réalisées pour les lectures de frottis et les PCR ; des comparaisons quantitatives seront réalisées pour les ELISA et les CATT.

Vingt **frottis sanguins** dont au moins 10 et au plus 15, sur lesquels seront présentes au moins 2 espèces de trypanosomes seront préparés dans les 3 laboratoires et diffusés en aveugle pour lecture et résultats exprimés qualitativement (espèce(s) observée(s)) et quantitativement (fréquence d'observation des parasites sur le frottis). Un écart de 10% sera toléré dans la quantification des parasites.

Des séries de 30 échantillons de contrôle, comportant entre 10 et 20 positifs, seront constituées dans chacun des 3 laboratoires pour chaque espèce de trypanosomes disponibles sur place. Au CIRDES et au CIRAD seront constituées 3 séries d'échantillons de contrôle pour *T. vivax*, *T. brucei brucei* et *T. congolense* savane. En Thaïlande seront préparées 1 série de 30 échantillons de contrôle pour *T. evansi*. Des volumes de 100µl de sérum, de sang ou d'ADN seront déposés sur papier filtre Whatman 4 et diffusés au sein du réseau des laboratoires pour être testés par PCR (sang et ADN) et ELISA et CATT (sérum et sang).

L'analyse statistique tolérera des écarts de 10% d'un laboratoire à l'autre pour les résultats qualitatifs (PCR, CATT et ELISA positif/négatif) et exigera une concordance >90% pour les tests semi-quantitatifs (CATT & ELISA).

10. Conditionnement et expédition des échantillons

Tous les échantillons doivent être expédiés par la méthode la plus rapide et la plus directe possible. Toutes les expéditions doivent respecter les réglementations de l'IATA relatives à l'envoi de matériels biologiques, l'importation doit satisfaire à la réglementation nationale ou supranationale (i.e. européenne pour la France) du pays d'importation, l'exportation doit satisfaire à la réglementation nationale ou supranationale du pays d'exportation. La veille réglementaire doit être réalisée.

Dans tous les cas, l'utilisation de sérums, plasma, sang, buffy-coat, ADN ou antigènes lyophilisés sera privilégiée sur tout autre forme de conservation étant donnés les avantages de la lyophilisation (transport sans froid et absence de dangerosité).

10.1 Type d'échantillons et informations requises

Type d'analyse	Type de prélèvements	Volume à envoyer
Parasitologique	Sang sur anticoagulant (EDTA ou héparine)	200µl
Sérologique : plasma sérum	Sang sur EDTA ou héparine, centrifugation 2500 rpm 5-10mn pour récupérer le plasma Sang tube sec, attendre la rétraction du caillot à température ambiante ou centrifuger après plusieurs heures pour récupérer le sérum Sérum/plasma sur papier wathman	100µl (si plasma ou sérums) 500µl si sang total
PCR : sang ou buffy coat ADN	Sang sur anticoagulant (EDTA ou héparine), sang total ou buffy coat Sang sur papier FTA ou wathman ADN déjà extrait	200µl 20µl à 50ng/µl

Informations nécessaires, qui doivent être inscrites sur un document accompagnant les échantillons :

- Identifiant de l'animal :
 - nom ou numéro de boucle ou numéro de puce de l'animal,
 - espèce hôte, sexe, âge, race si disponible,
 - propriétaire, élevage, localisation géographique (GPS si enquête)
- Commémoratifs en cas de signes cliniques, passé de l'animal (présence en zone d'endémie de trypanosomes ? contact avec un animal infecté ?), données de l'examen clinique
- Contact de l'expéditeur : nom, prénom, fonction (vétérinaire, propriétaire...), adresses postale, mail et téléphone
- Type d'échantillons, volume et analyse demandée
- Bien annoter le tube (identification de l'animal, type de prélèvement, date de prélèvement)

10.2 Règles relatives à la sécurité sanitaire

Le règlement international pour le transport des marchandises infectieuses, quel que soit le moyen de transport, repose sur les Recommandations du Comité d'experts en matière de transport des marchandises dangereuses (UNCETDG), un comité du Conseil économique et social de l'Organisation des Nations Unies.

Pour le transport par différentes voies (aérienne, ferroviaire, maritime, routière, poste), des règlements spécifiques existent. Par exemple, l'emballage et le transport de l'échantillon par voie aérienne sont soumis à la réglementation IATA (International Air Transport Association). L'emballage et le transport dépendent de la **classification des échantillons, considérés comme des substances dangereuses**.

Rappel sur la classification des substances dangereuses :

Le matériel peut être classé en trois catégories : A (=ONU 2900), B (=ONU 3373) ou exemptés

- **classe A** ou No ONU 2814 (MATIÈRE INFECTIEUSE POUR L'HOMME) ou **ONU 2900** (MATIÈRE INFECTIEUSE POUR LES ANIMAUX uniquement) : Matière infectieuse qui, de la manière dont elle est transportée, peut, lorsqu'une exposition se produit, provoquer une invalidité permanente ou une maladie mortelle ou potentiellement mortelle chez, l'homme ou l'animal, jusque-là en bonne santé ; exemple : matériel contenant le virus de la fièvre aphteuse ou celui de la peste porcine africaine ;
- **classe B** ou No N° **ONU 3373** : matière infectieuse qui ne correspond pas à la classe

A, on peut mettre dans cette classe **les échantillons de sang ou de sérum issus d'animaux suspects ou infectés de trypanosomoses, ainsi que les souches de trypanosomes vivants ;**

- **exceptions** : matériel ne contenant pas de matières infectieuses (ex l'**ADN**, des sérums chauffés au moins 3h à 65°C) ou ayant un « risque minimal » d'en contenir (exemple : sérum en vue de réaliser un CATT test sur un chien ayant vécu en France afin de pouvoir entrer en Afrique du Sud) et qui doit alors porter la mention « échantillon animal exempté », gouttes de sang séché sur papier absorbant.

Le conditionnement du matériel, les quantités maximales transportées et les documents associés dépendent de la catégorie.

- Si classe A : il faut un triple emballage agréé, une quantité maximale de 50g ou 50ml pour un avion de passagers, 4kg ou 4l pour un cargo, des étiquettes spécifiques sur l'emballage tertiaire et des documents d'importation spécifiques.
- Si classe B : il faut un triple emballage agréé, une quantité maximale de 4kg ou 4l, des étiquettes spécifiques sur l'emballage tertiaire et des documents d'importation spécifiques.
- Exemptés : triple emballage mais non soumis à une norme.

Principe du triple emballage : 1) tube étanche renfermant l'échantillon, 2) deuxième contenant étanche avec un absorbant, 3) emballage externe.

Il est interdit de transporter les échantillons de catégorie A et B en bagages à main ou en soute, y compris dans une valise diplomatique, ces échantillons doivent être transportés par une société spécialisée (selon les pays : DHL, SDV, Air France Cargo, World Courier...). Le pays d'importation peut réaliser le contrôle des documents et de l'emballage externe, par exemple via les services vétérinaires du **Poste d'Inspection Frontalier (PIF)** en France.

Les échantillons animaux exemptés peuvent être transportés en bagages, mais doivent satisfaire au triple emballage.

Les détails sur les emballages, les étiquettes et les documents sont disponibles sur les sites de l'OMS et de l'institut Pasteur, selon les liens suivants :

<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/envoi-de-materiel-biologique/cadre-reglementaire>

http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ihr_2015.2/fr/

<http://www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2017.8/en/#>

Attention, les documents sont régulièrement mis à jour : ceux-ci doivent être consultés par le chef de laboratoire. La version anglaise du document de l'OMS est mise en ligne avant la version française.

Transport réfrigéré

En général, les échantillons doivent voyager à froid : autour de 4°C pour du sang avant analyse parasitologique, préparation du sérum ou plasma ou extraction d'ADN.

Pour un transport international long de plasmas ou de sérums : prévoir plutôt un envoi en carboglace garantissant la congélation. La carboglace est considérée comme dangereuse (notamment risque d'asphyxie à cause du dégagement de CO₂) et doit faire l'objet d'un transport particulier par la société de transport spécialisée (selon les pays : DHL, SDV, Air France Cargo, World Courier...). Il faut demander l'accord à l'avance à la société (exemple DHL ne transporte pas d'échantillons en carboglace depuis le Burkina Faso pour la France).

Importation dans l'union européenne, cas du CIRAD

Tout prélèvement de sang ou de sérum animal, en provenance d'un pays hors Union Européenne continentale, est ouvert et traité en laboratoire de niveau de confinement 3, P3, au CIRAD.

L'envoi d'échantillons s'organise à l'avance pour faire faire des devis, préparer les documents et s'assurer des dates d'envoi et de réception avec le transporteur.

Pour l'importation d'échantillons au laboratoire du Cirad Montpellier, les documents à joindre sont :

- L'autorisation d'importation fournie par la Direction Départementale de Protection des Populations (qui récapitule le type de prélèvements, la quantité, le conditionnement, l'expéditeur et le destinataire) et un Document Sanitaire d'Accompagnement en cas de culture d'agents pathogènes;
- Le numéro de LTA (Lettre de transport aérien) donné par le transporteur, ainsi que de la date d'arrivée, et du numéro de vol ;
- Une attestation pour la douane «sans valeur commerciale » et valeur pour douane de 25 € ;
- Etiquette particulière sur le colis, portant la mention "Exclusivement destinés à usage technique ou pharmaceutique et produits non destinés à l'alimentation humaine ou animale" et autres étiquettes spécifiques de la classe B, voire de la carboglace si nécessaire ;
- Adresse de livraison : Cirad-Bios UMR17 TA A-17/G c/o CLASQUIN ROISSY, Fret 6, Bâtiment 3210, 20 Rue du Pavé, BP 15339, Tremblay en France, 95705 Roissy Charles de Gaulle cedex, France

10.3 Règles relatives à l'Accès et au Partage des Avantages

Les échantillons qui sont exclusivement destinés au diagnostic de maladies ne font pas l'objet d'une réglementation spécifique concernant l'**Accès et la Partage des Avantages (APA)**.

En revanche, si les échantillons **sont destinés à la recherche** (développement d'un nouveau test diagnostique, diversité génétique du parasite, réponse immunitaire de l'hôte...), ils représentent une ressource biologique, qu'il s'agisse de souches de trypanosomoses vivants, d'ADN, d'ARN ou de sérums : les parties (expéditeur et destinataire) doivent signer des documents **qui satisfassent au protocole international de Nagoya, signé en 2010, entré en vigueur le 12 octobre 2014, c'est-à-dire** a minima un **MTA (Material Transfert Agreement)** qui précise le cadre de l'**APA**. Les informations sont disponibles sur le site de la **Convention sur la Diversité Biologique** <https://www.cbd.int/> et <https://absch.cbd.int/search/national-records/NFP> qui précise la situation de chaque état et fournit les coordonnées du point focal national.

En effet, selon la convention de Rio 1992 (mise à jour à Nagoya, 2010), les ressources génétiques (animales, végétales, microbiennes) constituent un patrimoine mondiale de l'humanité mais sont sous la souveraineté des états qui les abritent. Ces états ont donc le droit de légiférer sur l'accès à ces ressources, sur leur utilisation et sur les partages des bénéfices qui pourraient découler de leurs usages.

⇒ **L'expéditeur et le destinataire des échantillons doivent donc vérifier la réglementation en application dans leurs pays, préparer et signer les documents nécessaires, qui permettent de tracer le matériel biologique, de préciser les clauses sur la propriété intellectuelle et les modalités d'accès et de partage des avantages en cas de publications, de dépôt de brevet ou de transfert du matériel à un tiers....**

11. Bibliographie

1. Anonyme; ISO/IEC International Standard 17025 (2005). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organisation for Standardisation (ISO)/International Electrotechnical Commission (ISO/IEC), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembe, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
2. Anonyme; International Organisation for Standardisation (ISO) (1997). Proficiency testing by interlaboratory comparisons. Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies. ISO/International Electrotechnical Commission (ISO/IEC), Guide 43. ISO/IEC, Geneva, 19 pp.
3. Anonyme; ISO International Standards 9000:2005, 9001:2000; 9004:2000 (2000–2005). Quality management and quality assurance. International Organization for Standardization (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembe, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
4. Bajyana Songa, E., Hamers, R., 1988. A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*. Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale 68, 233-240.
5. Bengaly, Z., Sidibé, I., Boly, H., Sawadogo, L., Desquesnes, M., 2002a. Comparative pathogenicity of three genetically distinct *Trypanosoma congolense* - types in inbred Balb/c mice. Veterinary Parasitology 105, 111-118.
6. Bengaly, Z., Sidibe, I., Ganaba, R., Desquesnes, M., Boly, H., Sawadogo, L., 2002b. Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. Vet Par 108, 1-19.
7. Delafosse, A., Bengaly, Z., Duvallet, G., 1995. [Absence of interaction between *Trypanosoma theileri* infections with the diagnosis of animal trypanosomiasis by detection of circulating antigens]. Rev Elev Med Vet Pays Trop 48, 18-20.
8. Desquesnes, M., 1996. Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes, with an isolate of *T. vivax* from French Guyana. Annals of the New York Academy of Sciences 791, 172-184.
9. Desquesnes, M., 1997a. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA). ACTA Tropica 65, 139-148.

10. Desquesnes, M., 1997b. Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques: méthode, intérêts et limites. Rev Sci Tech Off Int Epiz 16, 809-823.
11. Desquesnes, M., 2004a. Les trypanosomoses des ruminants: Diagnostic différentiel des trypanosomoses des ruminants. Fiche technique, Santé animale, CIRDES, BP454 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso 4, 1-8.
12. Desquesnes, M., 2004b. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. CIRAD-EMVT publication, OIE, Paris, ISBN 92-9044-634-X, 174 pages. <http://www.oie.int/doc/ged/D9818.PDF>
13. Desquesnes, M., Bengaly, Z., Dia, M.L., 2003. Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des bovins naturellement infectés. Rev Elev Med Vet Pays Trop 56, 141-144.
14. Desquesnes, M., Bengaly, Z., Millogo, L., Meme, Y., Sakande, H., 2001. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. Ann. Trop. Med. Parasitol. 95, 141-155.
15. Desquesnes, M., Bossard, G., Thevenon, S., Patrel, D., Ravel, S., Pavlovic, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E., Hollzmuller, P., Berthier, D., Jacquet, P., Cuny, G., 2009. Development and application of an antibody-ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. Vet Parasitol 162, 214-220.
16. Desquesnes, M., Bosseno, M.F., Breniere, S.F., 2007a. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. Infection Genetic and Evolution 7, 457-462.
17. Desquesnes, M., Dávila, A.M.R., 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes; a review and perspectives. Vet par 109, 213-231.
18. Desquesnes, M., Itard, J., Cuny, G., Solano, P., Authie, E., 2010. Trypanosomoses: diagnosis, In: Lefèvre, P.-C., Blancou, J., Chermette, R., Uilenberg, G. (Eds.) Infectious and parasitic diseases of livestock. Lavoisier, Paris, France, pp. 1911-1926.
19. Desquesnes, M., Kamyngkird, K., Kengradomkij, C., Pruvot, M., Sarataphan, N., Jittapalpong, S., 2008. Standardisation of an ELISA for *Trypanosoma evansi* and its application to dairy cattle in Thailand. Proceedings of the 15th Congress of the Federation of Asia Veterinary Association (FAVA), OIE joint symposium on emerging diseases; 27-30 October 2008, Bangkok, Thailand, 269-270.
20. Desquesnes, M., Kamyngkird, K., Yangtara, S., Milocco, C., Ravel, S., Wang, M.-H., Lun, Z.-R., Morand, S., Jittapalpong, S., 2011. Specific primers for PCR amplification of the ITS1 (ribosomal DNA) of *Trypanosoma lewisi*. Infect Genet Evol 11, 1361-1367.

21. Desquesnes, M., Michel, J.F., De La Rocque, S., Solano, P., Millogo, L., Bengaly, Z., Sidibe, I., 1999. Enquête parasitologique et sérologique (ELISA-indirecte) sur les trypanosomoses des bovins dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Revue Elev Med Vet Pays Trop* 52, 3-4.
22. Desquesnes, M., Patout, O., Brugidou, R., Faye, B., Cuny, G., 2007b. Un foyer de trypanosomose observé pour la première fois en France. *Bulletin des GTV* 39, 8-10.
23. Desquesnes, M., Ravel, S., Cuny, G., 2002. PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. *Kinetoplastid Biol Dis* 1, 2.
24. Desquesnes, M., Ravel, S., Deschamps, J.-Y., Polack, B., Roux, F., 2012. Atypical hyperpachymorph *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* forest-type in a dog returning from Senegal. *Parasite* 19, 239-247.
25. Desquesnes, M., Tresse, L., 1996. Evaluation de la sensibilité du test de WOO pour la détection de *Trypanosoma vivax*. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 49, 315-321.
26. Greiner, M., Shivarama, B.T.P., R.J., Kakaire, D., Shares, G., Bohning, D., Zessin, K., Mehlitz, D., 1997. Impact of biological factors on the interpretation of bovine trypanosomosis serology. *Prev Vet Med* 30, 61-73.
27. Gutierrez, C., Corbera, J.A., Morales, M., Buscher, P., 2004. Performance of serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally inoculated goats. *Ann N Y Acad Sci* 1026, 152-153.
28. Gutierrez, C., Desquesnes, M., Touratier, L., Buscher, P., 2010. *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. *Vet Parasitol* 174, 26-29.
29. Herbert, W.J., Lumsden, W.H., 1976. *Trypanosoma brucei*: a rapid "matching" method for estimating the host's parasitemia. *Exp Parasitol* 40, 427-431.
30. Hirumi, H., Hirumi, K., Peregrine, S., 1993. Axenic culture of *Trypanosoma congolense*: Application to the detection of sensitivity levels of bloodstream trypomastigotes to diminazene aceturate, homidium chloride, isometamidium chloride and quinapyramine sulphate. *J Protozool Res* 3, 52-63.
31. Hopkins, J.S., Chitambo, H., Machila, N., Luckins, A.G., Rae, P.F., van de Bossche, P., Eisler, M., 1998. Adaptation and validation of antibody-ELISA using dried blood spots on filter paper for epidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomosis in cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 37, 91-99.
32. Howie, S., Guy, M., Fleming, L., Bailey, W., Noyes, H., Faye, J.A., Pepin, J., Greenwood, B., Whittle, H., Molyneux, D., Corrah, T., 2006. A Gambian infant with fever and an unexpected blood film. *PLoS Med* 3, e355.
33. Ilboudo, H., Jamonneau, V., Camara, M., Camara, O., Dama, E., Leno, M., Ouendeno, F., Courtin, F., Sakande, H., Sanon, R., Kabore, J., Coulibaly, B., N'Dri, L., Diarra, A., N'Goran, E., Bucheton, B., 2011. Diversity of response to *Trypanosoma brucei*

- gambiense* infections in the Forecariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes Infect* 13, 943-952.
34. Jamonneau, V., Bucheton, B., Kabore, J., Ilboudo, H., Camara, O., Courtin, F., Solano, P., Kaba, D., Kambire, R., Lingue, K., Camara, M., Baelmans, R., Lejon, V., Buscher, P., 2010. Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e917.
35. Jittapalapong, S., Inpankaew, T., Sarataphan, N., Herbreteau, V., Hugot, J.P., Morand, S., Stich, R.W., 2008. Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents of Thailand. *Infect Genet Evol* 8, 445-449.
36. Katakura, K., Lubinga, C., Chitambo, H., Tada, Y., 1997. Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on filter paper. *Parasitol Res* 83, 241-245.
37. Katende, J.M., Musokoe, A.J., Nantulya, V.M., Gooderis, B.M., 1987. A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens or use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovins trypanosomiasis. *Trop Med Parasitol* 38, 41-44.
38. Komoin-Oka, C., Truc, P., Bengaly, Z., Formenty, P., Duvallet, G., Lauginie, F., Raath, J.P., N'Depo, A.E., Leforban, Y., 1994. [Prevalence of *Trypanosoma* infections in different species of wild animals in the Comoe national park on the Ivory Coast: preliminary results of the comparison of 3 diagnostic methods]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 47, 189-194.
39. Kratzer, R.D., Ondiek, F.O., 1989. The buffy coat double centrifugation technique, an improved method for the diagnosis of African trypanosomiasis. in: 20th meeting of the International Scientific Committee for Trypanosomosis Research and Control (ISTCRC), Mombasa, Kenya, 10-14 April 1989.
40. Lefrançois, T., Solano, P., Bauer, B., Kaboré, I., Touré, S.M., Cuny, G., Duvallet, G., 1999. Polymerase chain reaction characterization of trypanosomes in *Glossina morsitans submorsitans* and *G. tachninoïdes* collected on the game ranch of Nazinga, Burkina Faso. *Acta Tropica* 72, 65-77.
41. Luckins, A.G., 1977. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Hlth Prod* 9, 53-62.
42. Lumdsen, W., Kimber, C., Dukes, P., Haller, L., Stanghellini, A., Duvallet, G., 1981. Field diagnosis of sleeping sickness in Ivory Coast 1. Comparison of the miniature anion-exchange centrifugation technique with other protozoological methods. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 75, 242-250.

43. Masiga, D.K., Smyth, A.J., Hayes, P., Bromidge, T.J., Gibson, W.C., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal of Parasitology* 22, 909-918.
44. Murray, M., Murray, P.K., McIntyre, W.I.M., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 71, 325-326.
45. Nantulya, V.M., Bajyana Songa, E., Hamers, R., 1989. Detection of circulating trypanosomal antigens in *Trypanosoma evansi*-infected animals using a *T. brucei* group-specific monoclonal antibody. *Trop Med Parasitol* 40, 263-266.
46. Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Guya, S., Crowther, J., Kiragu, J.M., Thompson, R.C., Davila, A.M., 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res* 95, 186-192.
47. Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Masiga, D.K., Reid, S.A., Thompson, R.C. and Gibson, W.C., 2006. Characterization of *Trypanosoma evansi* type B. *Infect Genet Evol* 6(4): 292-300. DOI: 10.1016/j.meegid.2005.08.002.
48. Osorio, A.L., Madruga, C.R., Desquesnes, M., Soares, C.O., Ribeiro, L.R., Costa, S.C., 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 1-13.
49. Paris, J., Murray, M., McOdimba, F., 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop* 39, 307-316.
50. Rae, P.F., Luckins, A.G., 1984. Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. *Ann Trop Med Parasitol* 78, 587-596.
51. Radwanska M., Claes F., Magez S., Magnus E., Perez-Morga D., Pays E. & Buscher P. 2002a. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67**, 289–295.
52. Radwanska, M., Chamekh, M., Vanhamme, L., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., de Baetselier, P., Buscher, P. and Pays, E. 2002b The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am J Trop Med Hyg* **67**(6), 684-690.
53. Rebeski, D.E., Winger, E.M., Rogovic, B., Robinson, M.M., Crowther, J.R., Dwinger, R.H., 1999. Improved methods for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2, 249-253.
54. Toure, S., Kebe, B., Seye, M., Sa, N., 1976. Biométrie, morphologie et virulence de *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* à travers 640 passages sur souris en 10 ans. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 29 (1): 17-22. 29, 17-22.

55. Truc, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Diallo, P.B., Cuny, G., 1998. *Trypanosoma brucei* ssp. and *T. congolense*: mixed human infection in Cote d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92, 537-538.
56. Tuntasuvan, D., Chompoochan, T., Vongpakorn, M., Mohkaew, K., 1996. Detection of *Trypanosoma evansi* antibodies in pigs using an enzyme linked immunosorbent assay. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 47, 45-53.
57. Tuntasuvan, D., Luckins, A., 1998. Status of Surra in livestock in Thailand. *Journal of Protozoological Research* 8, 162-170.
58. Tuntasuvan, D., Mimapan, S., Sarataphan, N., Trongwongsa, L., Intraraksa, R., Chanprasert, B., 1998. Cerebral trypanosomosis in hog deer (*Cervus porcinus*) Proceedings of the 24th Annual Conference of the Thai Veterinary Medical Association (TVMA) and the 4th Conference of the Veterinary Practitioner Association of Thailand, 5-9 August 1998, Bangkok (Thailand), 56-64.
59. Van Meirvenne, N., Magnus, E., Buscher, P., 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop* 60, 189-199.
60. Woo, P.T.K., 1970. The heamatocrit centrifuge technique for diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica* 27, 384-386.
61. Wright, P.F., Nilsson, E., Van, R., E.M.A., Lelenta, M., Jeggo, M.H., 1993. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 12, 435-450.
62. Wuyts, N., Chokesajjawatee, N., Panyim, S., 1994. A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by DNA amplification. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25, 266-271.
63. Zwegarth, E., Sabwa, C., Rottcher, D., 1986. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Trypanosoma (T.) brucei evansi* in camels (*Camelus dromedarius*) using peroxidase-conjugated protein A. *Trop Med Parasitol* 37, 105-106.

12. Annexes: Fiches de protocole des tests

12.1 Identification des glossines

L'identification des espèces de glossines ne fait pas à proprement parler partie du diagnostic des trypanosomoses, mais elle en est une préalable impératif.

Morphologie générale

Mouches allongées : 6-16mm ; couleur : brun-noirâtre jamais métallique ; ailes croisées au repos sur le dos, appareil buccal piqueur porté à l'horizontal

Morphologie de la tête

Yeux composés : une paire ; trois (3) ocelles disposés en triangle entre les yeux composés
Antennes : trois articles : le 3ème allongé, garni d'une frange antennaire : l'arista à la base du 3ème article, porte des soies plumeuses sur sa face dorsale.



Suture ptilinale entoure les premiers articles antennaires.

Pièces buccales :

- palpes maxillaires aussi longs que la trompe, engainants, se relèvent au moment de la piqûre.
- proboscis = trompe : labium = lèvre inférieure, rigide
- hypopharynx = écoulement salivaire
- labre = lèvre supérieure



Glossina morsitans



Glossina plapalis
(M Desquesnes)



Glossina tachinoides

Morphologie du thorax

- Trois (3) segments portant des soies.
- Une (1) paire d'ailes croisées au repos au-dessus de l'abdomen
 - *cellule discale en hachette : caractéristique du genre *Glossina*.



- Haltères : balanciers vestiges de la 2^{ème} paire d'ailes.
- Trois (3) paires de pattes : coxa=hanche (soudée au thorax), trochanter, fémur, tibia, tarse (5 segments, le dernier portant une paire de griffes et une paire pulvilles. Couleur→systématique).
- Deux (2) paires de stigmates respiratoires sur les côtés.

Morphologie de l'abdomen

- Huit (8) segments dont sept (7) visibles dorsalement
- Chaque segment comprend :
 - tergite dorsal rigide
 - sternite ventral souple
 - une (1) paire de stigmates respiratoires
- Coloration « Patterns abdominaux » →systématique



G. morsitans

G. palpalis

G. tachinoides

(M Desquesnes)



Extrémité des tarsi noire (*Gm*) ; Tarsi entièrement noirs (*Gp* et *Gt*)
(M Desquesnes)

- 8^{ème} segment : Genitalia= appareil reproducteur externe, dont la forme et la dimension sont caractéristique des espèces et des sous-espèces.

**Genitalia* mâle :

- Hypopyge : callosité convexe dont la pièce basale (=épandrium) est la seule visible au repos ; articulé avec le 7^{ème} tergite et bascule d'environ 180° au moment de l'accouplement.
- Hectors : milieu du 5^{ème} sternite ; servent à fixer la femelle pendant l'accouplement.
- Forcípules supérieures = cerques, à l'extrémité de l'épandrium
reliés ou non par une membrane connective]

]

→→→systématique

terminés par une dent plus ou moins acérée]

- Appareil phallique à la face interne de l'épandrium ; anatomie très complexe :
phallothèques
paramères = forcípules inférieures → systématique groupe *palpalis*
pénis : systématique basée sur l'édéage distal (harpes).

**Genitalia* femelle : pas d'organe saillant

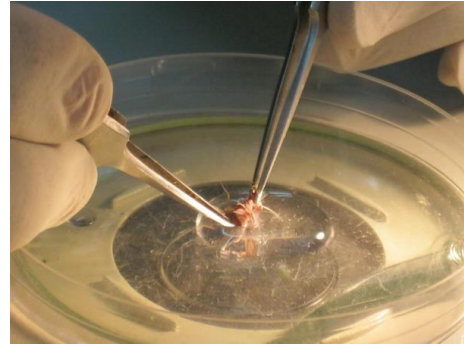
- 2 plaques dorsales triangulaires
- 1 plaque médio-dorsale petite
- 2 plaques anales, convexes, pointues du côté interne
- 1 plaque sternale en forme de mamelon
- 6 plaques pileuses autour de la vulve et de l'anus

(nombre, forme, pilosité utilisés en systématique)

12.2 Détection de l'infection des glossines par les trypanosomes

I- Dissection de glossines et récolte des organes entre lame et lamelles

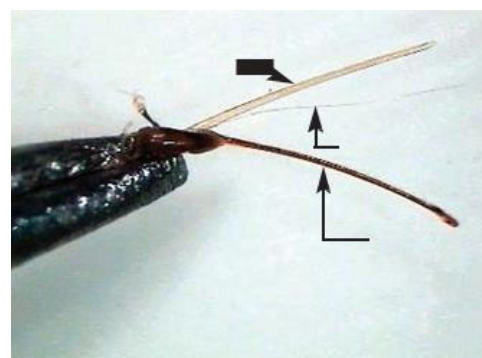
La dissection se fait toujours sous loupe binoculaire (grossissement x 60), l'insecte étant placé dans la boîte de pétri, dans une grosse goutte de solution physiologique, ce qui permet de maintenir les organes de la mouche dans un milieu hydraté et isotonique.



Une légère pression sur le thorax permet de sortir le ptilinum, organe en forme de sac gonflant chez la mouche ténérale. La dissection n'est donc pas nécessaire pour celle-ci car elle n'a encore pas pris son premier repas sanguin.

L'ordre de la dissection doit progresser des organes buccaux (proboscis) aux glandes salivaires pour se terminer par l'intestin moyen afin de limiter les contaminations des organes par des trypanosomes parfois très abondants dans ce dernier. N'empêche, entre chaque organe et chaque mouche, les instruments utilisés pour la dissection doivent être stérilisés dans une solution diluée d'eau de javel.

I-1 Le proboscis est d'abord saisi fermement au niveau du bulbe de la théca et ôté ; le labre, l'hypopharynx et le labium sont séparés à l'aide d'une aiguille montée ou directement avec le bout de la pince et placés entre lame et lamelle dans une goutte de solution physiologique.

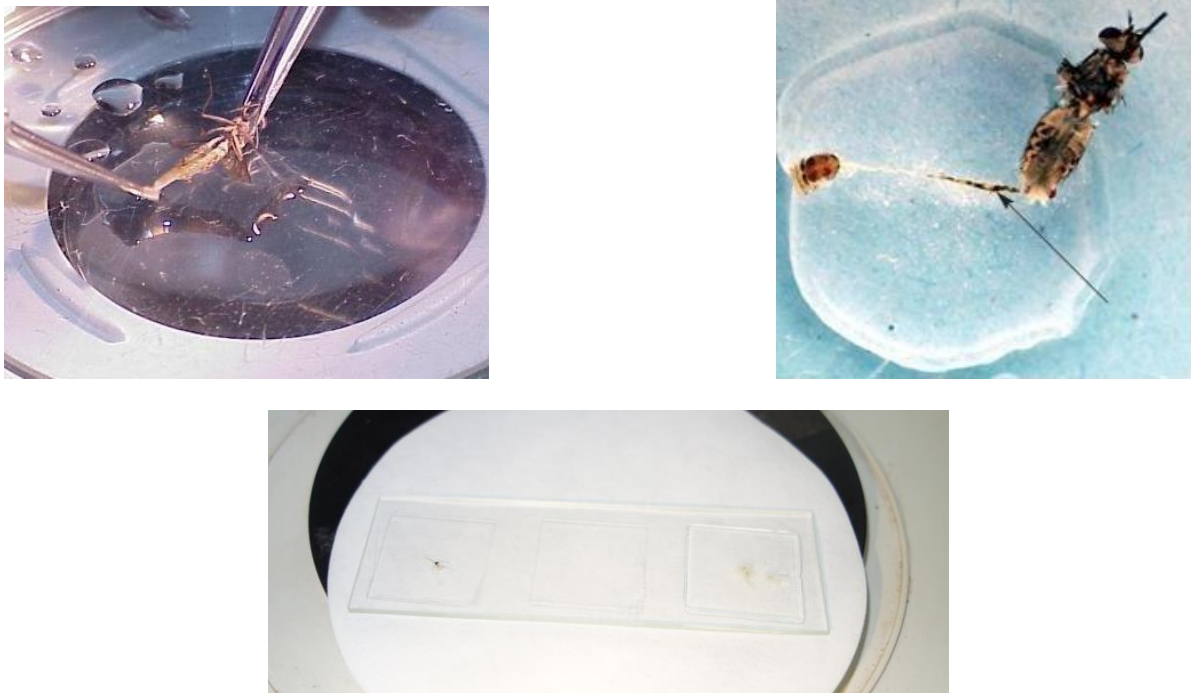


I-2 Les glandes salivaires sont récupérées dans les parties antérieures latérales de l'abdomen, elles se présentent comme deux tubes minces et longs d'aspect translucides, et sont placées entre lame et lamelle dans une goutte de solution physiologique.



(W Yoni)

I-3 L'intestin moyen est ensuite extrait de l'abdomen et débarrassé des tubes de Malpighi et des îlots graisseux qui s'y attachent ; l'intestin est alors disposé en 'U' entre lame et lamelle dans une goutte de solution physiologique.



(W Yoni)

II- Observation au microscope (grossissement x 400) pour la recherche des trypanosomes

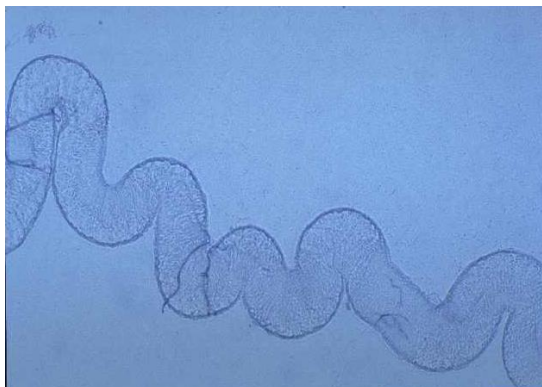
La spécificité de l'examen microscopique est faible car l'infection d'un organe peut passer inaperçue ou être temporaire. En conséquence, ce diagnostic est indicatif, à maturité :

* *Trypanosoma vivax* se retrouve uniquement dans les pièces buccales ;

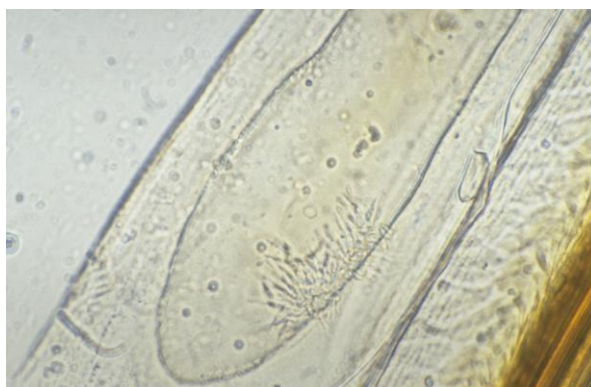
* *Trypanosoma congolense* se retrouve que dans l'intestin et les pièces buccales ;

* *Trypanosoma brucei* au cycle plus complexe qu'on les trouve dans l'intestin, les glandes salivaires et les pièces buccales.

Une confirmation des espèces de trypanosomes est recommandée par un examen de laboratoire par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide d'amorces spécifiques des trypanosomes.



Trypanosomes dans les glandes salivaires

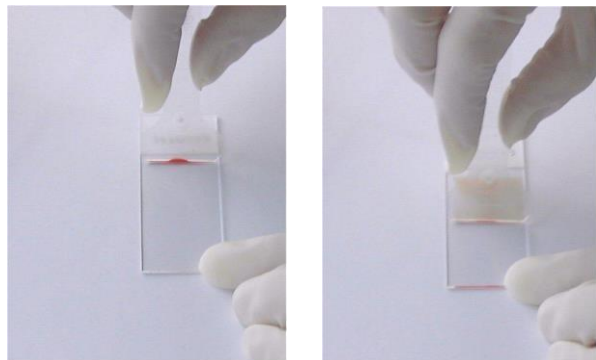
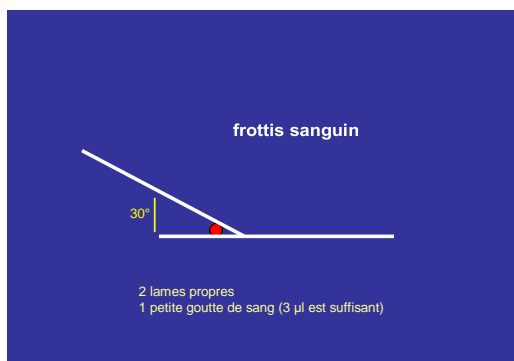


Trypanosomes en rosette dans le proboscis

(D. Cuisance)

12.3 Préparation des frottis sanguins colorés au Giemsa

1. Etaler une petite goutte de sang (3-4 μ l qui peuvent être déposés à l'aide d'un tube capillaire, du bouchon d'un tube EDTA ou du cône d'une pipette) sur une lame de verre, en couche fine par traction de la goutte par capillarité avec une autre lame inclinée à environ 30°. La propreté de la lame est déterminante pour le succès de cet examen (bien dégraisser les lames à l'éthanol et faire sécher avant de réaliser le frottis). Nettoyer aussitôt la lame ayant servi à l'étalement, sans laisser au sang le temps de sécher, à défaut le frottis suivant sera strié et illisible.



Traction du sang par capillarité à l'aide d'une lame de traction. La quantité de sang plus importante au centre de la lame donne la forme en ogive du frottis. Il arrive que le sang soit trop fluide (état anémique aigu), on observe alors une situation comme indiqué ci-dessous en (c) ; il faut refaire le frottis avec une quantité de sang amoindrie (1-2 μ l seulement). Si la lame de support est mal dégraisée on observe des « vacuolisation » du frottis (a); il faut le refaire sur une lame bien dégraisée à l'éthanol. Si l'on place trop de sang, les cellules seront superposées et la lecture difficile voire impossible (d).



a



b



c



d

(a) Lame grasse, « vacuolisation » du frottis ; (b) correct (c) excès de sang ou sang trop fluide et absence de « tête » de frottis ; (d) excès de sang et étalement insuffisant, superposition des cellules.

2. Une fois le frottis réalisé et séché, fixer le frottis en le plongeant dans le méthanol pendant 30 secondes (pour une préparation individuelle on peut déposer le méthanol sur la lame plutôt que plonger la lame dans un flacon de méthanol).
3. Les solutions stock de tampons sont comme suit :
Solution A: KH_2PO_4 (Merck Art. 4873) 9,08 g/l (= 1/15 molaire)
Solution B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck Art. 6580) 11,87 g/l (= 1/15 molaire)
4. Mélanger 8,75ml de solution A avec 41,25ml de solution B. Agiter et laisser reposer 10 minutes puis contrôler le pH 7.2 - 7,4. Ajuster si nécessaire (HCl / NaOH). La solution tampon ainsi préparée ne se conserve qu'un jour.
5. Filtrer la solution de Giemsa et ajouter 5 ml de Giemsa à 45 ml de la solution tampon (dilution au 1/10). Mélanger et laisser reposer 10 minutes
6. Plonger les lames dans le colorant ou déposer le colorant sur la lame microscopique et laisser reposer 30 min
7. Laver abondamment à l'eau du robinet puis égoutter et laisser sécher complètement avant observation (si la lame n'est pas parfaitement sèche le mélange huile d'immersion-eau rendra la lame illisible). Si la coloration est trop forte, réduire le temps d'incubation du colorant ou accroître sa dilution jusqu'à 1/20.

Le frottis coloré est ensuite bien séché avant d'être examiné au grossissement de x 500 ou x 1000 en huile d'immersion et en éclairage direct (utilisation du condenseur de lumière en position haute).

Il est important de bien sécher la lame, à défaut, l'eau et l'huile d'immersion constituent un mélange rendant la lame illisible du fait des interférences lumineuses créées par l'eau et l'air emprisonnés sous l'huile. Un frottis bien réalisé laisse apparaître un liseré clair autour de la tête de frottis ; cette zone est particulièrement riche en cellules blanches (et en éventuels trypanosomes), du fait de forces capillaires élevées liées à leur grande taille. Ce phénomène de « concentration » est voisin de celui exploité par la méthode de centrifugation hématocrite.

Approximativement, 50 à 100 champs de l'étalement coloré doivent être examinés au grossissement X500, puis X1000 avec l'huile à immersion avant de considérer l'échantillon comme négatif. Même après l'observation d'un trypanosome, environ 20 champs supplémentaires doivent être examinés pour déterminer l'éventuelle présence d'espèces différentes. La zone du frottis qui doit être préférentiellement explorée est celle de la tête, où sont concentrés les cellules blanches, les trypanosomes et d'éventuels globules rouges parasités (du fait de l'augmentation de leur taille et donc de leur adhérence à la lame de traction).

La technique peut être également être utilisée sur des prélèvements de lymphes obtenus par ponction de nœuds lymphatiques. Habituellement, la goutte épaisse et l'étalement sur lame sont faits à partir du même échantillon. La goutte épaisse concentre plus de sang que l'étalement et par conséquent a une sensibilité diagnostique supérieure. D'un autre côté, l'étalement mince autorise une diagnose d'espèces.

12.4 Préparation de l'ADN pour la PCR

Echantillons sanguins :

- Echantillons de sang sur anti-coagulant : il est recommandé d'enrichir les échantillons sanguins par centrifugation différentielle à haute vitesse (> 8000 rpm) et récolte du buffy coat, comme il a été décrit pour les méthodes d'enrichissement préalables à l'examen microscopique. Les buffy coats peuvent être récoltés soit à partir de tubes capillaires (environ 10-15µl d'échantillons de buffy coat déposés sur 30µl d'eau distillée) soit à partir de microtubes (environ 100µl de buffy coat pur) qui peuvent être ensuite préparés selon diverses méthodes pour optimiser la sensibilité des tests de PCR.

- Sang déposé sur papier filtre : le sang déposé sur papier filtre (par exemple un confetti) peut être élué comme suit :

1- Ajouter 1 ml de chelex 100 5% sur un disque (2cm²) de Whatman sur lequel a été spotté du sang en tubes 1,5ml

2- Incuber les tubes 1h à 56°C et 30 min. à 95°C dans la machine à PCR.

3- Centrifuger les tubes 5 min. à 14000rpm pour sédimenter le chelex et utiliser le surnageant pour la PCR.

4- Conserver ces échantillons chelexés à -20°C

Une solution de chelex 100 à 5% dans H₂O est préparée « stérilement » puis conservée à +4°C.

Le Chelex 100 (Chelating Ion Exchange Resin, Biorad ref 143-2832, 100g) est une résine chélatante de forte affinité pour les ions métalliques polyvalents. Il empêche la dégradation de l'ADN en chélatant les ions métalliques qui peuvent agir comme catalyseurs de cette dégradation.

REF : Biotechniques, vol.10, n=4, P.506, 1991

Des études de sensibilité ont été réalisées pour comparer diverses méthodes de préparation des échantillons de sang infecté avec des séries de dilutions de parasites. Des études récentes menées avec un parasite du sous-genre Trypanozoon ont révélé que la méthode classique phénol-chloroforme demeure la meilleure méthode tant pour la sensibilité des tests obtenus que pour la qualité, l'intégrité et la durée de conservation de l'ADN récolté (Pruvot et

al 2012). Toutefois, compte tenu du caractère chronophage de la méthode et de la menace que représente la manipulation de produits toxiques (phénol et chloroforme), d'autres méthodes, plus rapides et parfois économiques ont fait leurs preuves, comme celle de l'utilisation du Chelex (Walsh et al., 1991; Penchenier et al., 1996). D'autre part, il existe de nombreux kits commerciaux permettant de préparer ou récolter l'ADN, mais le coût est généralement prohibitif, surtout pour un diagnostic de routine dans des lots importants d'échantillons. En outre, leur supériorité diagnostique est rarement démontrée.

Préparation au Phénol-chloroforme : Placer 500µl de solution dénaturante (thiocyanate de guanidine) dans un microtube de 1,5ml et ajouter 100µl de buffy coat (ou de sang à défaut), agiter au vortex à haute vitesse pendant 5 minutes. Ajouter 150µl de chloroforme et 150µl de phénol, placer au vortex à haute vitesse pendant 5 minutes, puis centrifuger à 13.000 rpm (15,493 g) pendant 5 minutes. Collecter le surnageant et le placer dans un nouveau tube. Ajouter à nouveau 150µl de chloroforme et 150µl de phénol, placer au vortex à haute vitesse pendant 5 minutes, puis centrifuger à 13.000 rpm pendant 5 minutes. Collecter 400µl de surnageant et placer dans un nouveau tube de 1,5ml et ajouter 1ml d'éthanol absolu et placer à -20°C une nuit pour la précipitation. Centrifuger à froid pendant 10 minutes à 13.000 rpm puis éliminer le surnageant. Laver le peller 2 fois consécutives en ajoutant de l'éthanol à 75% et centrifugeant à 13.000 rpm pendant 5 minutes. Éliminer le surnageant. Laisser sécher le pellet à l'air libre. Re-suspendre dans 50µl de tampon tris-EDTA (TE). Cette méthode permet de concentrer l'échantillon de départ d'un volume de 100µl à un volume final d'ADN dans 50µl.

Préparation au Chelex : le sang ou les buffy-coats sont conservés congelés. L'échantillon, est dégelé ; on lui ajoute un volume équivalent de chelex 5% (suspension à 5% de Chelex dans de l'eau distillée) puis il est placé 1 heure à 56°C, puis passé au vortex et placé 30 minutes à 95°C, puis passé au vortex et centrifugé pendant 2 minutes à 5000 rpm ; l'échantillon est ensuite pipeté en surface pur éviter que les débris sanguins et les billes de résine n'obturent le cône et/ou n'interfèrent dans la PCR.

Extraction d'ADN à partir de PBS-SAPONINE : Prendre 2 à 4 confettis, les mettre dans un tube Eppendorff de 1,5ml, ajouter 1 ml de PBS-Saponine à 0.5%, agiter, incuber 4H à 4°C ou toute une nuit. Centrifuger 1 min à 15000g, jeter le surnageant, ajouter 1 ml de PBS ; agiter, puis incuber 1H30 à 4°C. Centrifuger 1 min à 15000g, jeter le surnageant, ajouter 100µl de chelex 10% puis incuber 10 min à 95° en mélangeant constamment. Centrifuger 5 min à 15000g puis récolter le surnageant sans billes de chelex dans un tube propre de 1,5ml. Conserver à -20°C – prêt pour la PCR.

Extraction d'ADN génomique au DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen ref. 69504 et 69506) à partir de culot de trypanosomes

- 1- Laisser décongeler le culot (2x10⁸ parasites en moyenne) puis resuspendre les parasites dans 200µl de PBS (non fourni dans le kit),
Dans le cas où le culot n'est pas sec : centrifuger à 1800rpm 5' puis ôter le surnageant avant de resuspendre les parasites dans 200µl de PBS.
- 2- Ajouter 20µl de protéinase K puis Ajouter 200µl de buffer AL, mélanger vigoureusement en vortexant et incuber 10 min. à 56°C. Il est essentiel que l'échantillon et le buffer AL soient bien mélangés et immédiatement afin d'obtenir une solution homogène,
- 3- Ajouter 200µl d'éthanol (96-100%) (non fourni) et mélanger vigoureusement en vortexant afin d'obtenir une solution homogène,
- 4- Transférer la totalité du contenu du tube dans une colonne DNeasy placée au préalable sur un tube de 2ml fourni. Centrifuger 1 min. à 8000 rpm, à température ambiante. Eliminer l'éluat et le tube de 2ml.
- 5- Placer la colonne DNeasy sur un nouveau tube de 2ml fourni, ajouter 500µl de buffer AW1 et centrifuger 1 min. à 8000 rpm. Eliminer l'éluat et le tube de 2ml.
- 6- Placer la colonne DNeasy sur un nouveau tube de 2ml, ajouter 500 µl de buffer AW2 et centrifuger 3 min. à vitesse maxi (14000rpm) pour sécher la membrane. Eliminer l'éluat et le tube de 2ml.
- 7- Placer la colonne DNeasy sur un nouveau tube de 2ml et centrifuger 1 min. à vitesse maxi (14000rpm) pour éliminer toute trace d'éthanol résiduel,
- 8- Placer la colonne DNeasy sur un tube de 1,5 ml et ajouter 200 µl de buffer AE directement sur la membrane. Incuber 1 min. à température ambiante puis centrifuger 1 min. à 8000 rpm pour éluer.

Il est également possible de réaliser l'élution avec 100 µl de buffer AE, ce qui augmente la concentration en ADN mais réduit le rendement.

- 9- Répéter l'élution en transférant la colonne DNeasy sur un nouveau tube de 1,5 ml et ajouter 200 µl de buffer AE directement sur la membrane. Incuber 1 min. à température ambiante puis centrifuger 1 min. à 8000 rpm pour éluer.

Attention : ne pas éluer plus de 200 µl dans un tube 1,5 ml pour éviter que la colonne soit en contact avec l'éluat

Les vitesses de centrifugation indiquées s'entendent pour une centrifugeuse pour tubes 1,5-2ml à rotor fixe.

Echantillons d'organes de glossines

Matériel : Tubes Eppendorf de 0,5ml stérilisés, Eau distillée, Pipette de 100ul, Embouts jaunes, Portoir

Conditionnement

Proboscis et Glandes salivaires: récolter dans 30ul d'eau distillée ; Intestin moyen : placer dans 50ul d'eau distillée

Etiquetage des tubes ; Conservation sous froid dans une glacière (terrain) jusqu'à la congélation (laboratoire)

NB : Le strict respect des volumes d'eau distillée est nécessaire pour assurer la sensibilité des examens portant sur l'ADN des parasites.

Au laboratoire, les proboscis sont triturés à l'aide d'une pipette munie d'une pointe jaune. Pour les glandes salivaires et les intestins moyens, l'homogénéisation est faite en pipetant et en rejetant dans le tube plusieurs fois avant d'ajouter 30µl de chelex 5% pour les glandes salivaires, ou 50µl de chelex 5% pour les intestins moyens.

Après quoi on ajoute le même volume (30µl) de chelex 5% et on applique le programme chelex, soit 1H à 56° puis 30min à 95°.

Passer les échantillons au vortex et centrifuger 2min. Pipeter le surnageant pour la PCR afin de ne pas prendre des impuretés qui risqueraient d'inhiber la PCR.

12.5 Séparation des trypanosomes sur colonne de DE52

Matériel

DE 52 cellulose whatman (VWR 0904201)		Na ₂ HPO ₄ anhydre	
NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O	NaCl	H ₃ PO ₄	Glucose
Seringue 50 ml	Papier filtre	Tubes Falcon 50ml	

Préparation des solutions

PBS (2 litres)

Na₂HPO₄ anhydre----- 26.96g

NaH₂PO₄, 2 H₂O----- 1.56g

NaCl----- 8.5 g

Dissoudre dans de l'eau stérile.

Ajuster le pH 8 avec acide phosphorique à 5% (H₃PO₄).

QSP à 2 litres.

Filtrer à 0.22µm, autoclaver et réajuster le pH si nécessaire.

Conserver à 4°C.

Cellulose

Pour un rat préparer deux colonnes de 40ml de cellulose. Peser 60g pour deux colonnes.

Ajouter 200ml de PBS pH8 et agiter environ 10min avec un barreau aimanté.

Laisser décanter puis éliminer le surnageant

Ajouter 200ml de PBS pH8 et agiter environ 10min avec un barreau aimanté.

Laisser décanter puis éliminer une grande partie du surnageant

Autoclaver

PSG 6/4 rapport préconisé pour *T. congolense* sur rat.

Pour 1 litre

600ml de PBS pH8

400ml H₂O stérile

10g de glucose (1% final)

Il faut 1 litre de PSG 6/4 pour 2 colonnes.

Conserver à 4°C

Préparation des colonnes

Matériel : papiers filtres dont le diamètre est celui de la seringue, seringues de 50ml, tubes falcon 50ml, dispositif pour contrôler le débit du liquide (clamp)

Passer les disques de papier filtre découpés aux UV.

Pour la cellulose autoclavée, reprendre le pH (celui-ci doit être à 8).

Positionner un disque de papier filtre dans le fond de la seringue, bien vérifier que celui-ci adhère correctement.

Mettre la cellulose dans la seringue jusqu'à atteindre un volume de 50 ml de résine.

Rincer la colonne avec 100 ml de PBS pH 8 et contrôler le pH. **Le pH doit atteindre 8.**

Positionner le deuxième disque de papier filtre sur le dessus de la résine (évite les mouvements de liquides quand on verse le tampon d'élution).

ATTENTION

Equilibrer la colonne avec 150 ml de PSG froid

Charger le sang du rat fraîchement prélevé (soit 5 ml par colonne), récolter dans des tubes de 50 ml positionnés dans la glace.

L'élution se fait avec le PSG.

Laisser passer environ 15 ml puis commencer à contrôler l'éluât contenant les trypanosomes (examen d'une goutte entre lame et lamelle)

Stopper l'écoulement de la colonne lorsqu'il n'y a plus de trypanosomes visibles au microscope.

Collecte du culot

Les tubes de collectes sont centrifugés à 4°C pendant 10min à 3000 rpm. Un culot doit être visible dans le fond du tube.

Le surnageant est éliminé à la pipette.

Conservation du culot

Mettre le culot de trypanosome à -80°C.

12.6 Préparation des antigènes solubles pour l'ELISA

L'éluât obtenu lors de la séparation des trypanosomes sur colonne DEAE cellulose, est centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 minutes et le culot de trypanosomes est soumis à 3 lavages avec du PBS. Puis, 7 cycles de congélation (-20 ou -80°C, ou encore par immersion en azote liquide) - décongélation (lente à 4°C ou à 37°C si ajout des anti-enzymes) sont effectués afin d'obtenir un lysat total. Une phase de sonication est recommandée (si possible) pour favoriser la rupture des membranes et la désagrégation des structures internes des parasites. Puis, une centrifugation à haute vitesse est ensuite effectuée, selon disponibilité, en ultracentrifugeuse sous protection du froid (20 à 40.000 tr/min pendant 20min) ou simplement en centrifugeuse de type hématocrite avec rotor Eppendorf (12 à 14.000 tr/minute) afin d'éliminer les particules insolubles. Le surnageant contenant les protéines solubles du parasite est recueilli.

La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre par :

- mesure de la densité optique (d.o) à 260 nm et à 280 nm (il peut être nécessaire de diluer l'échantillon de départ si sa concentration protéique est trop élevée) ;

- déduction de la concentration en utilisant l'échelle dite Nomograph de E. ADAMS.

Les antigènes obtenus doivent ensuite être répartis en petits volumes (aliquotés) dans des cryotubes et congelés à -80°C ou en azote liquide, jusqu'à l'utilisation dans les tests sérologiques. Une aliquote régulièrement utilisée peut être stockée à -20°C mais pour une meilleure conservation il est recommandé de conserver le stock d'antigènes à de plus basses températures.

Ces antigènes peuvent être utilisés en ELISA-indirecte.

12.7 Protocoles ELISA

Protocole ELISA indirect Trypanosoma species

1. Solutions

Coating buffer

	quantité	fournisseur	référence
Na ₂ CO ₃	1.58g	Sigma	S2127
NaHCO ₃	2.93g	sigma	S6014

H₂O qsp à 1litre ajuster à pH 9.6

PBS

	quantité	fournisseur	référence
Na ₂ HPO ₄	1.21g	sigma	71643
KH ₂ PO ₄	0.2g	sigma	P8281
NaCl	8g	sigma	S7653
KCl	0.2g	sigma	P9541

H₂O qsp à 1litre ajuster à pH 7.4

Wash buffer (WB): PBS à 0.1% Tween 20

PBS + 1ml Tween 20 (sigma ref P7949) par litre de tampon

Blocking buffer (BB)

5g de lait écrémé en poudre pour 100ml de WB

Révélateur

Kblue substrate, Neogen, référence 03-014)

2. Matériels

Plaque polysorb NUNC à fond plat (référence 055137, Dutscher) Incubateur à 37°C avec agitation pouvant aller à 300rpm Pipette multicanaux P200, pipettes monocanal P10, P200, P1000.

Lecteur de plaque ELISA avec un filtre à 620nm.

3. Méthode

Coating buffer avec les dilutions suivantes :

Sous espèce	concentration finale	Volume antigène	Concentration antigène après lyse	Volume pour une plaque 96 puits
<i>T. evansi</i>	5µg/ml	100µl	0.5mg/ml	10ml
<i>T. vivax</i>	5µg/ml	50µl	1mg/ml	10ml
<i>T. brucei</i>	5µg/ml	40µl	1.3mg/ml	10ml
<i>T. congolense</i>	5µg/ml	50µl	1mg/ml	10ml

Dans une plaque NUNC à 96 puits, introduire 100µl/puits de la solution à 5µg/ml d'antigène de trypanosome.

Incubation 2 heures à 37°C agitation à 300rpm ou une nuit à 4°C – Vider la plaque par retournement

Blocking

Introduire 150µl de blocking buffer (BB) dans chaque puits

Incubation 30 minutes à 37°C agitation à 300rpm.

Vider la plaque par retournement – remplir les puits avec du tampon de lavage (WB)- vider

Dilutions des échantillons : (1/100 au final)

- Première dilution (1/50) à faire pendant l'étape de blocking : dans une plaque Greiner (U), placer 3µl de serum à tester dans 147µl de BB.
- Transfert des échantillons (dilution au ½) : introduire 50µl de BB dans les puits de la plaque ELISA, puis 50µl des serums dilués au 1/50 (voir ci-dessus).

Attention A1-H1, B2-H2, les deux premières colonnes sont réservées aux témoins.

Incubation 30 minutes à 37°C agitation à 300rpm.

Lavage

vider la plaque par retournement – remplir les puits avec du tampon de lavage (WB)- vider.

Répéter 4 fois.

Anticorps secondaire

Introduire 100µl de l'anticorps secondaire (correspondant à l'espèce animal testé) dilué dans du BB.

Espèce	Fournisseur	Référence	Dilution
Anti cheval HRP	sigma	A6917	1/20 000
Anti bovin HRP	sigma	A5295	1/10 000
Anti mouton HRP	sigma	A9452	1/ 4000
Anti dog HRP	sigma	A9042	1/10 000

dilution proteine G HRP (sigma ref P8170) 1:2000 dans du BB

dilution proteine A HRP (sigma ref P8651) 1:10 000 dans du BB

Incubation 30 minutes à 37°C agitation à 300rpm.

Lavage

vider la plaque par retournement – remplir les puits avec du tampon de lavage (WB)- vider.

Répéter 4 fois.

Révélateur

Introduire 100µl de KBlue substrate par puits.

Incubation 30 minutes à l'obscurité.

Lecture de la plaque à 620nm

Plan de plaque à compléter avant chaque réaction :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	vide	vide										
B	blanc	blanc										
C	T1+	T1+										
D	T1-	T1-										
E	T2+	T2+										
F	T2-	T2-										
G	T3+	T3+										
H	T3-	T3-										

12.8 Protocoles de PCR

Séquences des primers, cibles, taille des produits attendus, températures d'hybridation à appliquer et références publiées

Tableau 1 : PCR mono-spécifiques

Nom et séquences des primers	Localisation	Taille des produits (bp)	T° hybrid	REF
TVW 1 : CTGAGTGCTCCATGTGCCAC	ADN	150	55	Masiga et al., 1992 Int J Parasitol
TVW 2 : CCACCAGAACACCAACTGA	satellite			
TBR1: 5' CGAATGAATATTAACAATGCGCAG 3'	ADN	173	55	Moser et al., 1989 Parasitology
TBR2: 5' AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC 3'	satellite			
TCS1: 5' CGAGCGAGAACGGGCAC 3'	ADN	321	55	modifiés de Moser et al 1989 Parasitology
TCS2: 5' GGGACAAACAAATCCCGC 3'	satellite			
TCF1: 5' GGACACGCCAGAAGGTACTION 3'	ADN	350	55	Masiga et al., 1992 Int. J. Parasitol.
TCF2: 5' GTTCTCGACCAAATCCAAC 3'	satellite			
TCK1 : 5' GTGCCAAATTTGAAGTGAT 3'	ADN	294	55	Masiga et al., 1992 Int. J. Parasitol.
TCK2 : 5' ACTCAAATCGTGCACTCG 3'	satellite			
TSM1: 5'CCGGTCAAAAACGCATT3'	ADN	437	55	Masiga et al., 1992 Int. J. Parasitol.
TSM2: 5'AGTCGCCGGAGTCGAT3'	satellite			
TST1: 5' GTCCTGCCACCGAGTATGC 3'	ADN	450	55-60	Majiwa et al., 1993 Parasitology (ILO892/3)
TST2: 5' CGAGCATGCAGGATGGCCG 3'	satellite			
DGG1: 5' CTGAGGCTGAACAGCGACTC 3'	ADN	149	60	Masiga et al., 1996 Vet. Parasitol.
DGG2: 5' GCGGTATTGGCATAGCGTAC 3'	satellite			
EVA1: 5' ACATATCAACAACGACAAAG 3'	minicercles	139	58	These Masiga 1994 Njiru Vet Par 2004
EVA2: 5' CCCTAGTATCTCCAATGAAT 3'				
RoTat1.2F: 5' GCGGGGTGTTTAAAGCAATA 3'	ADN	205	59	Claes et al., KBD 2004
RoTat1.2R: 5' ATTAGTGCTGCGTGTGTTCCG 3'	génomique (VSG)			
TEPAN1: 5' AGTCACATGCATTGGTGGA 3'	séquence répétée	122	60	Panyim et al, 1993 Pruvot VetPar 2010
TEPAN2: 5' GAGAAGGCGTTACCCAATCA 3'				
ESAG6/7F: 5' ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG 3'	ADN génomique (R Tsferin)	237	55	Braem, 1999 these Holland Vet P 2001
ESAG6/7R: 5' CACGTGAATCCTCAATTTGT 3'				
TRBPA1: 5' GCGCCGACGATACCAATGG 3'	séquence	149 - 203	60	Herder OCEAC 1997 Truc TRSTMH 2002
TRBPA2: 5' AACGGATTCAGCGTTGCAG 3'				
Tbr F: 5' ATAGTGACAAGATGCGTACTCAACGC 3'	SRA	284	68	Radwanska et al 2002b
Tbr R: 5' AATGTGTTCCAGTACTTCGATCACGCT 3'				
LEW1S: 5' ACCACCACACGCTCTTCT 3'	ITS1	220	64	Desquesnes et al. IGE, 2011
LEW1R: 5' TGTATGTGCGTGCTTGTTCA 3'				
TthCATL1: 5' CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC 3'	CATL (Cathepsin L-like)	273bp	65	Rodrigues et al, 2010 Parasitol. Int.
DT0155: 5' TTAAAGCTTCCACGAGTCTTGATGATCCAGTA 3'				

Tableau 2 : PCR multi-spécifiques

Spécificité	Nom et séquences des primers	Localisation	Taille des produits (bp)	T° hybrid	REF
T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah, et forest, T. lewisi	TRYP1S : CGTCCCTGCCATTTGTACACAC	ITS1	Tb 520, Tv 310,	55	Desquesnes et al KBD 2002
	TRYP1R : GGAAGCCAAGTCATCCATCG	ADNr	Tcs-Tcf 680-750, T. 623		
T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah, forest et kilifi	TRYP4S: 5' AAGTTCACCGATATTG 3'	ITS1	Tb 487, T.v 242, Tcs 697	45	Desquesnes + DEA B. DESCAMPS 2003
	TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr	, Tcf 727, Tck 627		
NESTED: T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah, forest et Kilifi	R1-TRYP18.2C: 5' GCAAATTGCCCAATGTGCG 3'	ITS1		51	Desquesnes + DEA B.
	R1-TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr			
	R2-IRFCC: 5' CCTGCAGCTGGATCAT 3'	ITS1	Tb 392, Tv 147, Tcs 602,	47	DESCAMPS 2003
	R2-TRYP5RCG: 5' ATCGCGACACGTTGTG 3'	ADNr	Tcf 632) Tck 532		
NESTED: T.brucei, T. vivax, T. congolense savannah, forest Kilifi, et T. theileri	TRYP18.2C: 5' GCAAATTGCCCAATGTGCG 3'	ITS1		51	Desquesnes + DEA B.
	TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr			
	IRFCC: 5' CCTGCAGCTGGATCAT 3'	ITS1	Tth 310, Tb 426, Tv 181,	47	DESCAMPS 2003
	TRYP4R: 5' GCTGCGTTCTTCAACGAA 3'	ADNr	Tcs 636, Tcf 666, Tck 566		

Feuille de laboratoire à compléter lors de la réalisation d'une PCR

(en bleu, les données variables à ajuster en fonction du protocole utilisé)

nom de l'opérateur:		date :		nom des amorces	
				nombre de	
volumes d'échantillon (µl)		1	8	réaction à faire	
volume du master-mix / tube (µl)		9	préparer l'équivalent pour		
volumes finaux (µl)		10	9	réactions	
CONCENTRATIONS FINALES					
	vol indiv	working sol	volumes		
1 X 10mM Tris; 0 mM MgCl ₂ ; 50mMKCl	1,00	10 X	9,00	tampon 10X	
200 µM dNTP with stock sol dNTP at	0,80	2500 µMole	7,20	dNTP	
1,5 mM MgCl ₂ avec du MgCl ₂ à mM	0,30	50 mM	2,70	MgCl ₂	
1 µM Primer 1	0,50	20 µM	4,50	primer 1	
1 µM Primer 2	0,50	20 µM	4,50	primer 2	
0,5 unit TaqPol per 11 µl of MM	0,10	5 U/µl	0,90	TaqPol	
0 % DMSO final	0,00	net	0,00	DMSO	
l eau distillée	5,80		52,20	eau distillée	
Vérification du volume final		9,00	MASTER MIX	81	
nombre de cycles: 30		t°C	temps		
dénaturation initiale		94	60	volume échantillons	1
dénaturation		94	30	volume master mix	9
hybridation		60	60	nécessaire	72
extension		72	30	volume total dispo	81
extension finale		72	120	reste (extra)	9
gel d'agarose à 2%		120 volts	1 H		
BAS			HAUT		
1			1		
2			2		
3			3		
4			4		
5			5		
6			6		
7			7		
8			8		
9			9		
10			10		
11			11		
12			12		
13			13		
14			14		
15			15		
16			16		
17			17		
18			18		
19			19		
20			20		
21			21		
22			22		
23			23		
24			24		
25			25		
26			26		
commentaires :					



Le présent recueil est constitué pour servir de référence pour les méthodes de diagnostic des trypanosomoses effectuées dans le laboratoire de référence de l'OIE sur les trypanosomoses animales d'origine africaine, CIRAD Montpellier, et le laboratoire partenaire qu'est le CIRDES, Bobo- Dioulasso, Burkina Faso, mais également dans les laboratoires partenaires nationaux et régionaux. Il a été réalisé dans le cadre du programme de jumelage CIRAD-CIRDES du laboratoire de référence de l'OIE sur les Trypanosomoses animales d'origine africaine (2012-2017).

Il décrit les méthodes parasitologiques, sérologiques et de biologie moléculaire qui sont d'usage et font référence pour l'OIE dans le diagnostic des trypanosomoses africaines, conformément au chapitre 2.4.17 « TRYPANOSOMOSES (transmissibles par les tsé-tsés) » du manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE. Il en donne les principales caractéristiques, permettant aux utilisateurs d'interpréter justement les résultats de leurs études. Il décrit en détail l'ensemble des protocoles permettant à d'autres laboratoires régionaux ou nationaux d'adopter ces méthodes pour effectuer les tests indépendamment des laboratoires de référence de l'OIE, même s'il reste recommandé de conserver des liens constants avec ces laboratoires de référence pour assurer les contrôles de qualité. Il décrit les méthodes de contrôle de qualité qui sont nécessaires à la pérennisation de la valeur des tests effectués.

