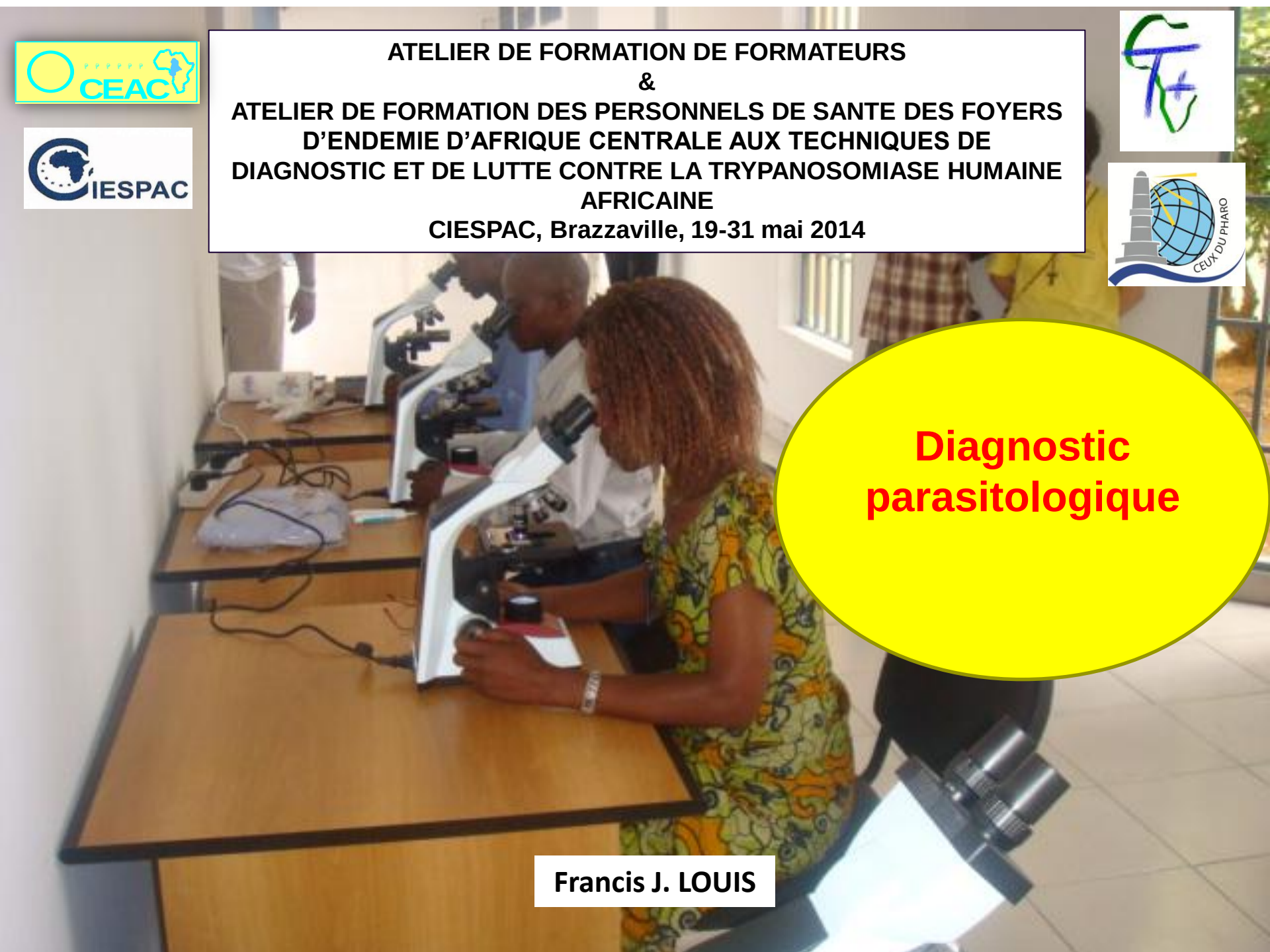
**ATELIER DE FORMATION DE FORMATEURS**
**&**
**ATELIER DE FORMATION DES PERSONNELS DE SANTE DES FOYERS D'ENDEMIE D'AFRIQUE CENTRALE AUX TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC ET DE LUTTE CONTRE LA TRYPANOSOMIASE HUMAINE AFRICAINE**
**CIESPAC, Brazzaville, 19-31 mai 2014**



# Diagnostic parasitologique

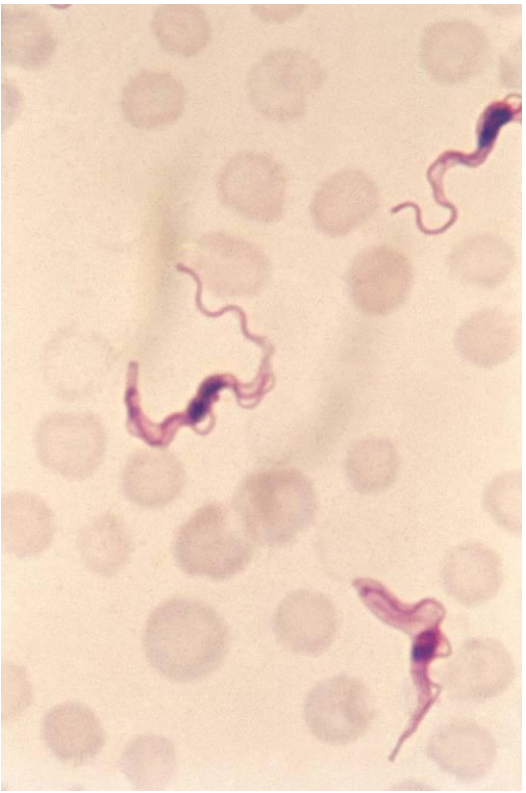
**Francis J. LOUIS**

# THA étapes diagnostiques

| | Etape | |
|---|---|---|
| Indirect: sélection | Sérologie | CATT/*T.b. gambiense,* Latex/*T.b. gambiense*<br>Immunofluorescence, ELISA |
| | positive | |
| Direct: confirmation | Parasitologie | Lymphe: suc ganglionnaire<br>Sang: goutte épaisse, centrifugation capillaire, QBC, mAECT |
| | positive | |
| | Détermination du stade | LCR: Comptage cellulaire<br>Présence de trypanosomes |
| | Traitement | Pentamidine, suramine<br>Melarsoprol, eflornithine, nifurtimox |
| | Suivi (2 ans):<br>Parasitologie et LCR | Normal: Traitement réussit<br>Anormal: Rechute et retraitement |

# La parasitologie

# Diagnostic parasitologique



- Détection microscopique du parasite dans
  - La lymphe
  - Le sang
  - Liquide céphalo-rachidien
- Peu sensible donc cas non-dépistés restent sans traitement
- Trypanosomes fragiles donc préparation et examen rapide sont essentiels sauf pour les préparations fixées
- Essentiel:
  - Bonne qualité des réactifs et du matériel
  - Entretien du microscope
- Grossissement
  - Objectifs: 10x, 40x, 100x
  - Oculaires: 10x, 15x

# Suc ganglionnaire (1)

- Utilisation
  - Détection précoce de trypanosomes (avant sang)
- Méthode
  - Palpation des ganglions cervicales
  - Si présent: ponction
  - Le suc est étalé sur lame
  - Appliquer une lamelle
  - Examinez pour présence de trypanosomes mobile

# Suc ganglionnaire (2)

- Performance
  - Sensibilité: 40 - 80 %
  - Limite de détection:
    théorique 50-100 trypanosomes/ml
- Avantages
  - Simple, bon marché, rapide
  - Utile sur CATT positifs
- Désavantages
  - Pas avantageux sur CATT négatifs
  - Pas pour suivi post-thérapeutique
  - Ganglions: rares dans infections *T.b. rhodesiense*

# Diagnostic parasitologique

- Sang
- Sensibilité ~ volume de sang
  - sang frais (5-10 µl)
  - goutte épaisse (25 µl)

  } Techniques simples

  - centrifugation capillaire (50 µl)
  - Quantitative Buffy Coat (50 µl)
  - mAECT (300 µl)

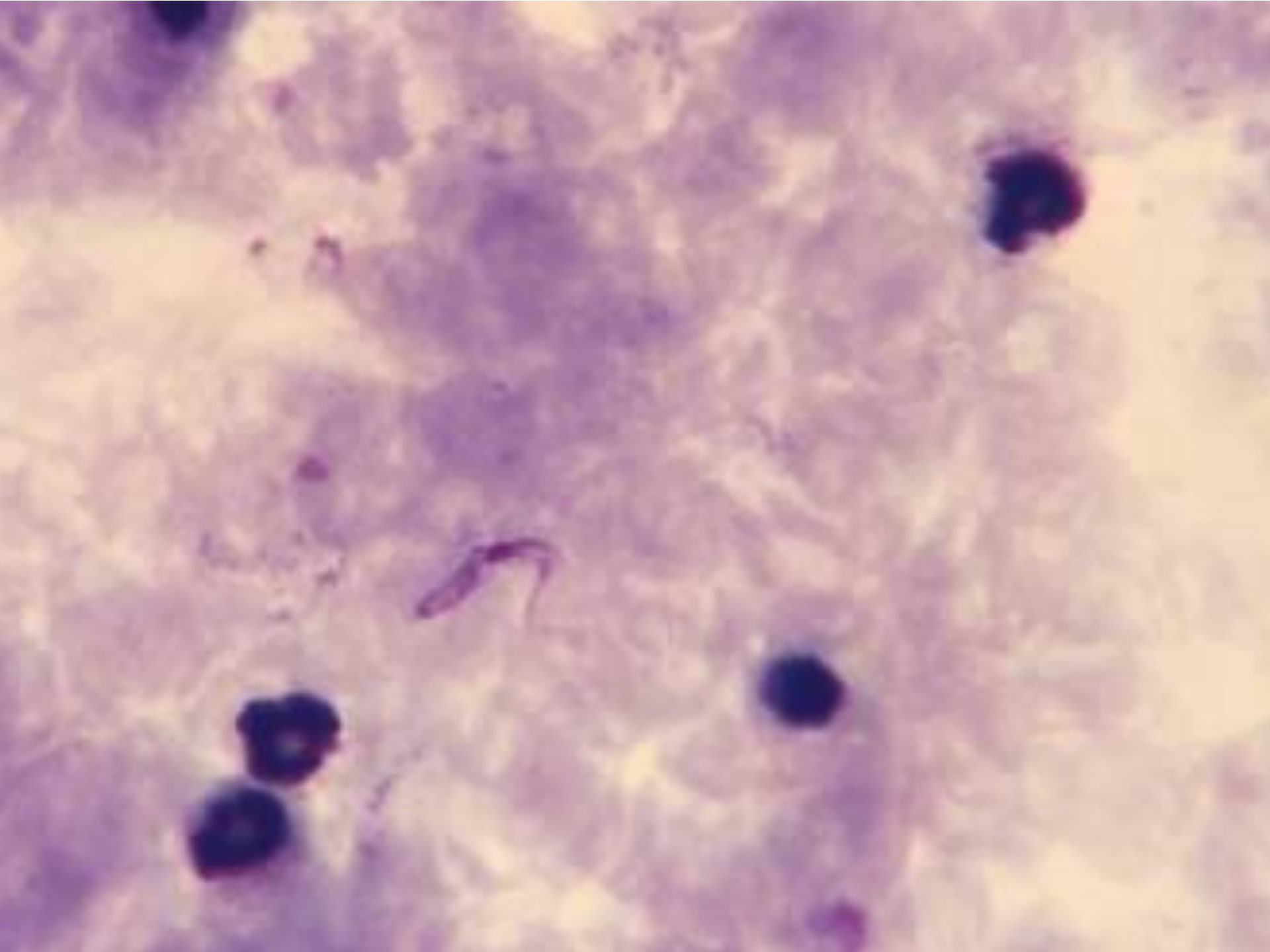
  } Techniques de concentration

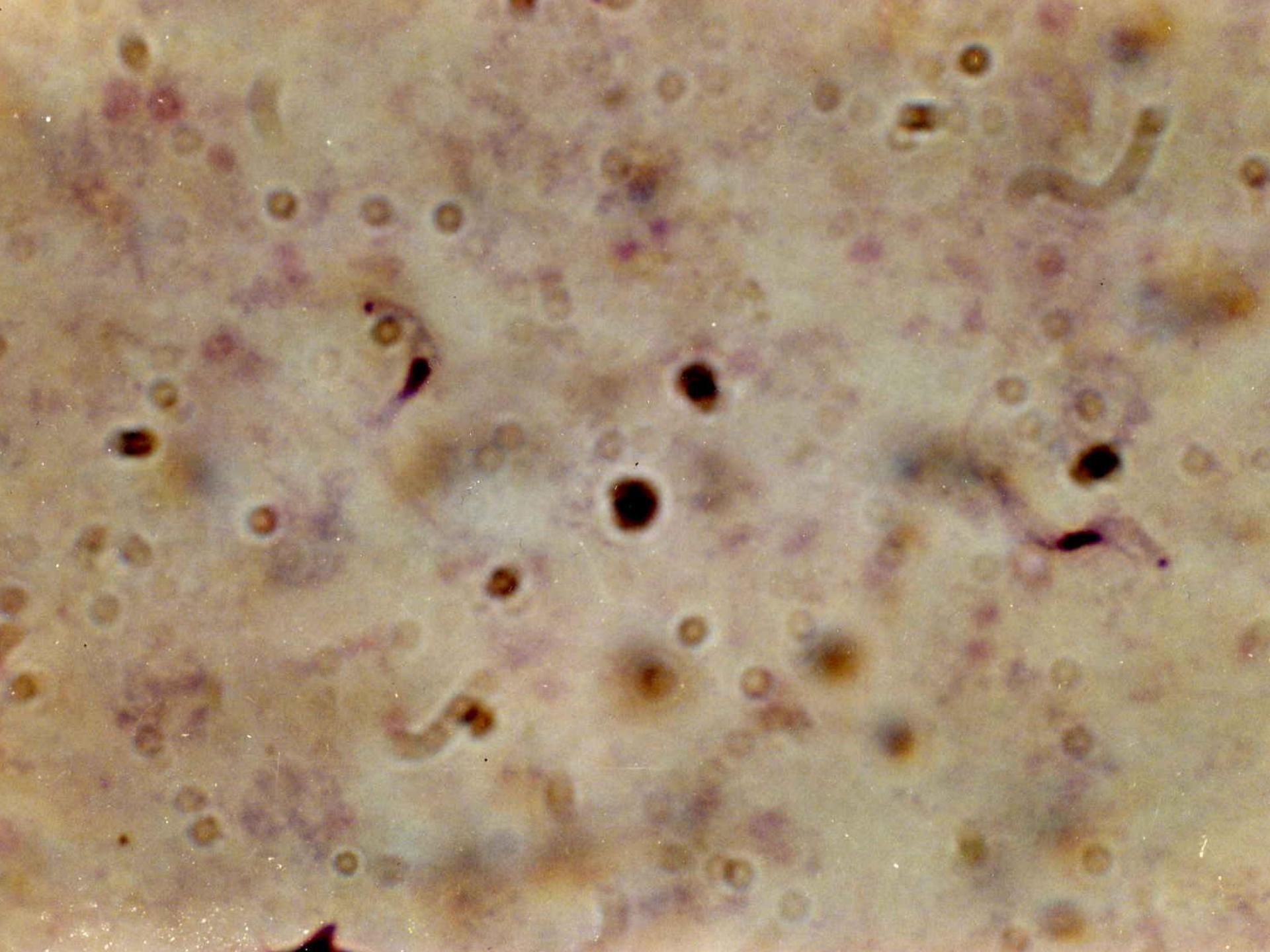
# Examen du sang frais

- Méthode
  - 5-10 µl de sang frais
  - Examen direct (40 x 10)
  - Trypanosomes mobiles parmi les globules rouges
  - Limite de détection bas
    - ✓ Théorie: 100 trypanosomes/ml
    - ✓ Pratique: 6000-10.000 trypanosomes/ml
  - Sensibilité diagnostic: 14%, 22%, 54%
- Avantages
  - Simple, bon marché
  - Résultat immédiat
- Désavantages
  - Pas utile pour *T.b. gambiense*

# Goutte épaisse (1)

- Utilisation
  - Pour *T.b. rhodesiense & T.b. gambiense*
- Méthode
  - 15-25 µl de sang sur lame
  - Défibrination et séchage
  - Coloration au Giemsa
  - Examen à 100 x 10
  - Cherchez:
    - ✓ kinétoplaste + noyau + flagelle + corps + taille
    - ➢ critères présents = trypanosome





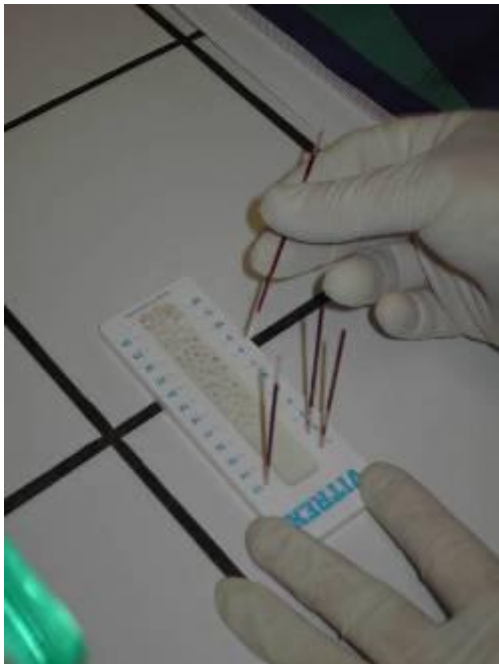
# Goutte épaisse (2)

- Performance
  - Limite de détection: bas
    - ✓ Théorie: 40 trypanosomes/ml
    - ✓ Pratique: 600-5.000 trypanosomes/ml

- Avantages
  - Simple, bon marché
  - Détecte microfilaires, plasmodium
  - Meilleur test par manque d'une centrifugeuse
- Désavantages
  - Sensibilité limitée
  - Longue durée de préparation et de lecture
  - Reconnaissance difficile: pléomorphisme & artefacts

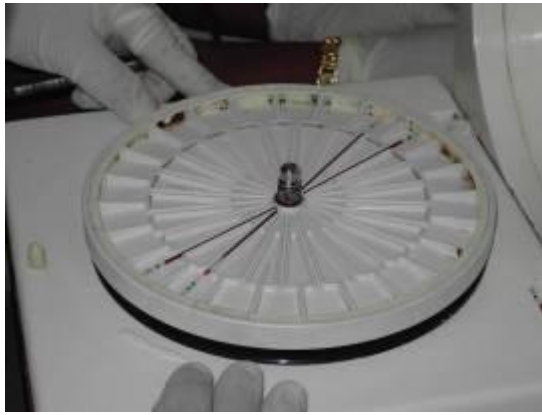
# Microcentrifugation en tubes capillaires (1)

- Synonymes: mHCT, Woo-test
- Utilisation:
  - Technique de concentration sur sang
- Méthode
  - 50-60 µl de sang dans un tube capillaire hépariné
  - Mélanger
  - Boucher à la plasticine du côté sec
  - Centrifugation (5 min, 12.000 rpm)
  - Tube dans une chambre de lecture et couvrir avec lamelle
  - Examen (10x10)
  - Trypanosomes dans le buffy coat (jonction de deux couches (plasma et GR)



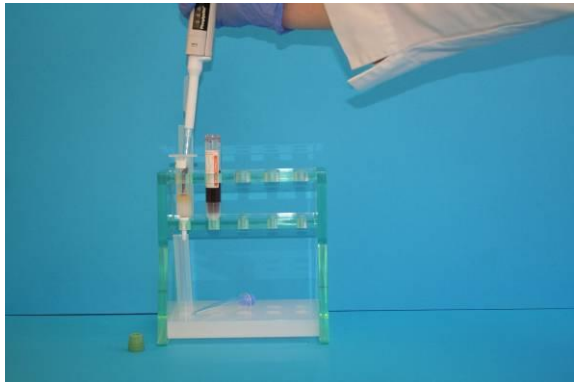
# Microcentrifugation en tubes capillaires (2)

- Performance
  - Limite de détection:
    - ✓ Théorie: 15 trypanosomes/ml
    - ✓ Pratique: 500-600 trypanosomes/ml
  - Sensibilité diagnostique:
    - ✓ Augmente avec nombre de tubes (au moins 2)
- Avantages
  - Relativement rapide
  - Technique de concentration relativement simple
  - Hématocrite
- Désavantages
  - Interférence de microfilaires
  - Besoin d'une centrifugeuse
  - Besoin d'expérience dans la lecture



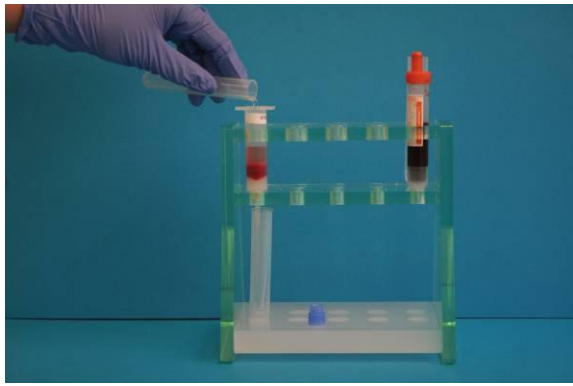
# mAECT: mini Anion Exchange Centrifugation Technique (1)

- Utilisation
  - Technique de concentration sur sang
  - Surtout *T.b. gambiense*
- Méthode
  - Trypanosomes neutres sont séparés des globules rouges négatives à l'aide du gel DEAE cellulose
  - 350 µl de sang veineux sur héparine
  - appliquer le sang sur le gel et éluer avec glucose tamponné
  - éluat dans pipette pasteur scellée ou tube collecteur
  - centrifugation (10 min, 3000 tpm)
  - examen microscopique du bout
    - ✓ de la pipette dans une chambre de lecture
    - ✓ Du tube collecteur dans un portoir



# mAECT

- Performance
  - Limite de détection:
    - ✓ Théorie: 5 trypanosomes/ml
    - ✓ Pratique: 15-100 trypanosomes/ml
  - Sensibilité diagnostique:
    - ✓ 43%, 80%, 85%, 88%, 93%, 100%,100%
- Avantages
  - Meilleur sensibilité
  - Relativement plus vite que goutte épaisse
- Désavantages
  - Besoin d'une centrifugeuse
  - Coûteux (3-4 USD)
  - Relativement compliqué
  - Relativement lent (30-40 min.)
  - Dépendance des colonnes



# Disponibilité des tests

- Parasitological tests
  - mAECT: INRB Kinshasa DRC

# Autres approches diagnostiques

- Détection d'antigène
- Culture in vitro
- Inoculation d'animaux
- Diagnostic moléculaire

# Diagnostic parasitologique

- Détection microscopique du parasite dans
  - La lymphe:
    - ✓ Suc ganglionnaire
  - Le sang:
    - ✓ (Examen sang frais)
    - ✓ Goutte épaisse
    - ✓ Microcentrifugation en tubes capillaires
    - ✓ mAECT
  - Liquide céphalo-rachidien:
    voir détermination stade