2V0001133

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR
LES PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
(L.N.E.R.V.) DAKAR-HANN

**RAPPORT DE STAGE SUR
LES METHODES DE DIAGNOSTIC
DES TRYPANOSOMOSES ANIMALES**

IL.R.A.D., NAIROBI, KENYA: 16 MAI - 12 JUIN 1994

Par Mme Thiané Dièye NDIAYE*

RAPPORT N° *25*/PATHO. ANIM.
Septembre 1994

*: ISRA/DRPSA/LNERV. B.P 2057. Dakar. Sénégal.

RAPPORT DE STAGE SUR LES METHODES DE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMOSSES ANIMALES

-----o-----

ILRAD, NAIROBI, KENYA: 16 MAI - 12 JUIN 1994

Par Mme Thiané Dièye NDIAYE*

INTRODUCTION

Par le contrat AIEA/ISRA N° 7596/RB en date du 09 janvier 1994, l'Institut sénégalais de Recherches agricoles fait partie d'un réseau de recherche mis en place par l'Agence internationale pour l'Energie atomique de Vienne. L'objectif du réseau est de contribuer à assurer un meilleur suivi de la lutte contre les trypanosomoses animales et leurs vecteurs par l'usage de méthodes améliorées de diagnostic immunologique. Quatorze (14) pays africains sont membres du réseau ainsi que des instituts internationaux de recherche vétérinaire.

C'est dans le cadre des activités de ce réseau qu'un stage de perfectionnement à l'intention des techniciens représentant les instituts impliqués a été organisé par l'AIEA à l'ILRAD de Nairobi du 16 mai au 12 juin 1994. Ce stage visait les principaux objectifs suivants:

- initier les stagiaires aux techniques modernes d'analyse sérologique ainsi qu'au traitement informatique des données recueillies au laboratoire et sur le terrain;
- relever le niveau des connaissances de base sur les trypanosomes et leurs vecteurs;
- favoriser une approche standardisée à travers les différents pays membres par l'application de méthodes communes adoptées au cours du stage.

Désignée par les autorités de l'ISRA avec l'accord du gouvernement du Sénégal, j'ai pris part à ce stage en compagnie de collègues techniciens en provenance des instituts concernés.

Le présent rapport rend compte du déroulement de ce stage. Il comporte deux parties essentielles, consacrées respectivement aux enseignements théoriques reçus et aux travaux pratiques effectués. Enfin, les principales leçons à retenir du stage sont tirées en guise de conclusion.

1. ENSEIGNEMENTS THEORIQUES

1.1 - Diagnostic parasitologique des trypanosomoses.

Le principe commun aux techniques parasitologiques de diagnostic des trypanosomoses est qu'elles visent toutes à mettre en évidence le parasite lorsqu'il est présent dans le liquide organique examiné (sang, liquide céphalo-rachidien, suc ganglionnaire, etc.).

Certaines de ces techniques sont classiques (examen de sang entre lame et lamelle; examen de frottis et gouttes épaisses, etc.) tandis que d'autres, plus récentes, constituent des techniques modernes (examen de sang après centrifugation microhémato-crite; examen après filtration sur gel).

Chacune de ces techniques comporte des avantages et des limites. L'option la plus répandue est d'en associer deux ou plusieurs pour accroître les chances de détection des trypanosomes.

A l'heure actuelle, la technique hématocrite est très largement utilisée, en raison de ses remarquables performances, et aussi parce qu'elle permet en plus d'obtenir des renseignements hématologiques souvent très utiles.

Le principe de cette technique est de remplir un microtube à hématocrite avec du sang capillaire (pulpe de l'oreille) ou veineux (jugulaire) et de centrifuger le tube pendant 3 à 5 minutes.

*: Laboratoire de Parasitologie, LNERV, Dakar-Hann.

Après lecture de la valeur **hématocrite**, l'interphase entre le **plasma** et les **cellules sanguines** est déversée sur une lame, **homogénéisée** avec une lamelle puis **examinée**, de **préférence** avec un équipement microscopique à fond noir. Les **différentes espèces** de trypanosomes pourront ainsi être distinguées selon leur taille et leurs mouvements

1.2 - Diagnostic immunologique

Sous ce chapitre sont regroupées les méthodes **permettant** la détection des traces **immunologiques** résultant de la présence actuelle ou passée des trypanosomes. Ces méthodes sont nombreuses et sont de rendement **inégal**. Nous citerons ici les plus couramment utilisées:

- méthodes de détection des anticorps;
- **méthodes** de capture des antigènes circulants;
- technique des sondes **A.D.N.**

1.2.1 - Détection des anticorps

Lorsqu'un animal **immunocompétent** est atteint de **trypanosomose**, son système immunitaire développe des anticorps pour lutter contre ces parasites. **Différentes** techniques ont été mises au point pour déceler la présence de ces anticorps, soit **dans le sérum**, soit dans d'autres liquides organiques tels que le lait, etc. Ces techniques utilisent **des artifices** biochimiques pour réaliser *in vitro* des réactions antigène-anticorps semblables à celles qui se produisent *in vivo* chez l'animal atteint. Elles sont nombreuses mais les plus **largement** utilisées pour le diagnostic des **trypanosomoses** sont l'**Immunofluorescent** indirecte (I.F.I.), l'**Immunopéroxydase** indirecte (I.P.I.), l'épreuve **micro-ELISA**, et le test d'**Agglutination** sur carte (C.A.T.). Une insistance particulière a été faite sur le test **ELISA** au cours du stage; nous en **donnons** ci-dessous la **description**.

- en première étape, sensibiliser les **cupules** d'une plaque de microtitrage avec une solution antigénique du parasite dont on veut faire le **diagnostic**;

- ajouter en **deuxième** étape le sérum à tester sensé renfermer des anticorps **spécifiques** de l'antigène de sensibilisation. L'incubation conduit à une réaction **antigène-anticorps** spécifique en cas de sérum **positif**;

- la troisième étape est l'adjonction d'un **antisérum** spécifique de l'espèce animale dont le **sérum** est testé. Cet antisérum est marqué par une enzyme et porte le nom de **Conjugué**. Le conjugué se fixera sur le complexe antigénique **obtenu** éventuellement à l'étape 2.

- Les réactions ci-dessus sont **révélées** par une **substance chromogène** de l'enzyme du **conjugué**. A la **fin** de la révélation, une coloration se développe dans les cupules à sérum positif tandis que les celles à sérum négatif restent **incolors**. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixée dans chaque **cupule**. Elle est appréciée à l'oeil nu ou, à l'aide d'un spectrophotomètre qui l'exprime en densité **optique** (D.O.). La D.O. représentant le seuil de **positivité** est établie à la suite d'essais avec des **sérums positifs** et négatifs connus.

Des lavages sont effectués entre ces étapes pour **éliminer** les protéines non **fixées**. En outre, les cupules sont **saturées** par une solution d'**Albumine** après l'étape 1. C'est le blocage.

Signalons pour mémoire que les épreuves **I.F.I.** et **I.P.I.** obéissent aux mêmes principes de base que l'**ELISA**, mais sont réalisées avec des antigènes **fixés** sur lames. Leurs **résultats** sont appréciés au microscope à éclairage **U.V.** pour l'**I.F.I.**, à ampoule ordinaire pour l'**I.P.I.**

Ces tests immunologiques de détection des anticorps peuvent donner des informations importantes en matière d'épidémiologie. Elles comportent cependant le double **inconvenient** de **déceler** assez tardivement les anticorps (deux semaines après **infestation** pour la **trypanosomose**) et de signaler des anticorps persistants longtemps après **traitement** et **guérison** du sujet atteint (plus de trois mois **chez** les bovins).

1.2.2 - Détection des antigènes

Au cours d'une agression trypanosomienne, des antigènes provenant de ces parasites (phagocytose, antigènes métaboliques) sont constamment libérés et passent en partie dans la circulation sanguine. L'épreuve micro-ELISA de détection des antigènes vise précisément à déceler ces antigènes, qui signent la présence des trypanosomes au moment du prélèvement. La compréhension et la maîtrise de cette épreuve représentent l'aspect le plus important de ce stage. En voici le détail:

- sensibiliser une plaque de microtitrage avec un anticorps monoclonal spécifique du parasite recherché:
 - ajouter le sérum suspect qui est sensé renfermer les antigènes spécifiques de l'anticorps de sensibilisation. Laisser incuber en vue d'une réaction antigène-anticorps éventuelle;
 - mettre à nouveau l'anticorps utilisé pour la sensibilisation mais marqué cette fois avec une enzyme, pour réaliser un parfait "sandwich" de l'antigène déjà capturé à la deuxième étape:
 - révéler les réactions avec un chromogène de l'enzyme. La suite est identique à l'ELISA-anticorps.

L'avantage majeur de cette technique est qu'elle permet de déceler des infestations actuelles. En effet, la présence des antigènes circulants est reconnue contemporaine de celle des parasites dans l'organisme, et leur persistance post-thérapeutique est de durée relativement limitée. En outre, cette technique permet une distinction spécifique des trypanosomes (*Trypanosoma vivax*, *T. brucei*, *T. congolense*, etc.) selon l'anticorps utilisé. Pour ce qui est de ses limites, il faut mentionner la complexité de la préparation des anticorps monoclonaux, ou leur cherté lorsqu'il faut les acheter.

1.2.3 - Sondes A.D.N.

Un exposé sommaire nous a été fait sur cette technique actuellement à l'état de mise au point en laboratoire, et qui semble vouée à un avenir certain. Il s'agit de déceler la présence de l'acide désoxyribonucléique (A.D.N.) libéré par les trypanosomes par l'usage de sondes spécifiques.

1.3 - Hématologie

L'une des causes de morbidité, et même de mortalité dans les trypanosomoses est l'anémie plus ou moins sévère qui se développe chez les animaux atteints. Il est donc important de pouvoir mesurer rapidement le degré de cette anémie. La technique la plus courante est aujourd'hui la mesure de l'hématocrite ou pourcentage volumétrique des cellules sanguines par rapport au sang entier. A cette fin, on prélève du sang dans des microtubes à hématocrite, qui sont ensuite centrifugés puis placés sur une échelle de lecture qui permet de lire ce pourcentage. Des normes établies pour différentes espèces animales permettent alors de se prononcer sur l'état anémique ou non de l'animal examiné. Pour les analyses de groupes, un traitement statistique des données peut fournir de précieuses informations.

1.4- Etude des glossines et autres vecteurs des hémoprotozooses

L'essentiel des cours d'entomologie a porté sur les glossines, principales vectrices des trypanosomoses. La systématique, la répartition géographique, la biologie, la physiologie, la reproduction ont fait l'objet d'études approfondies. Ainsi que les techniques de lutte par utilisation d'insecticides, par le déboisement, par lâcher de mâles stériles, etc. En outre un survol a été fait sur les vecteurs des autres hémoprotozooses, en particulier les tiques qui transmettent la Theileriose, la Babesiose, la Cowdriose, etc.

1.5 - Chimiothérapie et chimioprophylaxie des trypanosomoses

Les recherches menées depuis plusieurs décennies en vue de mettre au point un vaccin contre les trypanosomoses n'ont pas encore donné de résultat probant. En cas de trypanosomose confirmée, la seule action possible demeure l'administration d'un médicament trypanocide; c'est la chimiothérapie. Cependant, des formulations améliorées ont donné des composés permettant une protection plus ou moins longue des animaux: on parle alors de chimioprévention ou de chimioprophylaxie. En résumé, on retiendra que le Bérénil (acéturate de Diminazène) est le trypanocide chimiothérapeutique le plus largement utilisé en médecine vétérinaire; tandis que les dérivés de la phénanthridine (Trypanidium, Ethidium) sont reconnus performants pour la chimioprévention. A signaler également que d'autres trypanocides, employés plus rarement aujourd'hui, demeurent néanmoins utiles, notamment pour combattre les souches résistantes. On peut citer l'Antrycide, la Quinapyramine, etc.

1.6 - Epidémiologie

Un survol général a été fait sur l'Epidémiologie, avec les définitions précises des différentes composantes qui s'y rattachent: prévalence; incidence; fréquence, etc.

Concernant les trypanosomoses animales, des schémas d'étude épidémiologique nous ont été enseignés, qui doivent être adaptés au type d'information recherché, au nombre d'animaux concernés, à la prévalence escomptée, aux techniques d'investigation employées, etc.

1.7 - Initiation à l'Informatique

Des cours d'initiation au maniement des ordinateurs et à la compréhension des logiciels ont été donnés. A ce sujet, les logiciels EPI et EDI conçus pour la saisie et l'interprétation rapides des résultats des épreuves ELISA ont fait l'objet d'explications approfondies.

Voilà brièvement énumérés les chapitres qui ont fait l'objet d'enseignements théoriques donnés par différents spécialistes de provenances diverses.

2. TRAVAUX PRATIQUES

Ce volet du stage a consisté en l'application pratique des enseignements reçus. Il s'est agi:

- des principales méthodes de diagnostic (direct et indirect) des trypanosomoses animales: avec une insistance particulière sur l'ELISA-Antigène. Les modifications apportées à la technique de base décrite plus haut (1.2.2) ont été passées en revue, ainsi que les principes qui guident l'interprétation des résultats. On notera à ce sujet qu'un nouveau substrat remplace désormais l'ABTS pour la révélation et qu'une étape de blocage est introduite avant l'incubation des sérums. En outre, les incubations se font maintenant sous agitation permanente et à une température donnée. Enfin, les témoins font l'objet d'un examen rigoureux, qui conduit au rejet d'une plaque de travail, ou à son acceptation si les résultats de ces témoins sont conformes aux exigences prédéfinies.

- de l'isolement et de la conservation des trypanosomes: des animaux de laboratoire (souris, rats, chèvres, etc) sont inoculés par voie intrapéritonéale (I.P.) avec une petite quantité de sang provenant d'un animal positif. Un examen parasitologique quotidien permet d'apprécier à chaque fois le degré de parasitémie post-inoculation. Pour les besoins des recherches en laboratoire, les souches ainsi isolées peuvent être conservées à basses températures. En pratique courante, cette conservation est faite à -196°C , dans l'azote liquide. Le sang parasitémique est dilué dans un milieu glyciné. Après répartition dans des cryotubes, il est passé à des paliers thermiques successifs: $+4^{\circ}\text{C}$, ensuite -70°C 24 à 48 heures. Au bout de ce temps prolonger lentement dans l'azote liquide. Les trypanosomes ainsi conservés gardent indéfiniment toutes leurs propriétés biologiques.

- de travaux **d'hématologie** allant de la collecte du sang en tubes **hématocrite** jusqu'à la lecture des valeurs, en passant par le **scellage** des tubes et la **centrifugation**.

- de séances de dissection pour étudier les **différentes** localisations des trypanosomes chez les glossines infestées.

- de manipulations **informatiques** pour se familiariser avec le travail au DOS et avec l'utilisation de l'EPI et de l'EDI.

CONCLUSION

Il faut **tout** de suite mentionner l'**importance** croissante des techniques immunologiques dans la **recherche** en matière de trypanosomose. Ces techniques, **comme indiqué** ci-dessus requièrent des conditions particulières de travail (propreté des locaux et de la verrerie, bonne **hygiène** dans les animaleries, eau distillée de qualité, produits **chimiques** nombreux et également de qualité irréprochable, enfin un personnel compétent). Aucun de ces **domaines** n'a été perdu de **vue** au **cours de ce** stage (préparation des **différents** tampons de **lavage** et de dilution: avec mesure rigoureuse du **pH**, **prélèvement** correct et distribution **précise** des quantités requises de réactifs! respect des temps d'incubation, etc.)

On peut donc dire que le stage a **débouché** sur **d'importantes** acquisitions scientifiques et sur une meilleure maîtrise des méthodes et techniques de **lutte contre** les trypanosomoses et **leurs vecteurs**. Il a en outre permis d'établir des relations de **travail plus étroites** entre les techniciens **impliqués** dans le réseau. Tout cela devrait améliorer **considérablement** le rendement des uns et des autres, et déboucher sur une **meilleure qualité** du travail **au sein du réseau**. Il reste à souhaiter que de telles initiatives soient encouragées en vue d'une **production scientifique** plus pointue dans les instituts de recherches vétérinaires pour leur permettre **d'apporter une contribution plus substantielle** à la solution des problèmes de pathologie animale.

REMERCIEMENTS

- M. le Ministre de la **Modernisation** de l'Etat et de la **Technologie** a bien voulu presenter notre candidature à ce stage, à la demande des autorités **compétentes de l'ISRA**;
- L'**Agence** internationale pour l'**Energie** atomique (**AIEA**) a accepté cette candidature et a assuré la prise en charge entière du stage;
- Les autorités de **L'ILRAD** de Nairobi ont aimablement accepté d'abriter le stage et ont accordé toutes sortes de **facilités** aux stagiaires;
- **D'éminentes** personnalités scientifiques nous ont **donné** des enseignements **d'un** haut niveau:
- Le personnel de **L'ILRAD** a fait, preuve d'une hospitalité constante tout au long du stage;
- Les uns et les autres voudront bien trouver ici nos **très** sincères remerciements.