

Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*

M. Desquesnes^{1*} L. Tresse¹

Mots-clés

Trypanosoma vivax - Centrifugation - Hématocrite - Ovin - Plasma sanguin - Guyane française.

Résumé

La technique de centrifugation hématocrite (HCT), ou test de Woo, est la plus employée pour le diagnostic des trypanosomoses animales, mais sa sensibilité est mal connue. Selon les auteurs, pour la détection de *Trypanosoma vivax*, elle est supérieure, égale, ou inférieure à l'observation du *buffy coat* entre lame et lamelle au microscope à fond noir (*dark ground*, *buffy coat method*, DG/BCM), ou technique de Murray. La plupart des travaux antérieurs visaient à comparer les techniques parasitologiques entre elles plutôt que de chiffrer la sensibilité des tests par rapport à une référence fixe ; la comparaison des tests entre eux est une évaluation relative, car toutes les techniques utilisées n'ont pas la même sensibilité entre des mains différentes. L'objet du présent travail a été de chiffrer la sensibilité de la technique de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax* de Guyane, en l'éprouvant sur des échantillons sanguins de parasitémie déterminée, allant de 1 à 1 767 trypanosomes/ml, préparés par dilution de sang infecté dans du sang non infecté. L'expérience a été réalisée avec du sang de mouton. Une technique simple est décrite, pour le dénombrement des parasites dans le sang. Le seuil moyen de positivité du test de Woo chez le mouton a été d'environ 200 ± 110 *T. vivax*/ml. Le test a présenté une sensibilité de 100 p. 100 quand la parasitémie était supérieure à 700 parasites/ml, environ 80 p. 100 entre 300 et 700, 50 p. 100 entre 60 et 300, puis sa sensibilité a été quasi nulle en-deçà de 60 parasites/ml. Des indices sont fournis, permettant de quantifier la parasitémie en fonction du nombre de parasites observés entre lame et lamelle (parasitémie > 2 000), ou dénombrés dans le tube à hématocrite (parasitémie < 2 000). Il est proposé d'évaluer la sensibilité des techniques visant à mettre en évidence une infection active, par rapport à des références fixes, en l'occurrence, des parasitémies connues, créées artificiellement, comme il l'a été décrit.

■ INTRODUCTION

La technique de centrifugation hématocrite (HCT, en anglais), ou test de Woo (17, 18), est la plus employée pour le diagnostic des trypanosomoses animales, mais sa sensibilité est mal connue.

Selon les auteurs, pour le diagnostic de *T. vivax*, la sensibilité du test de Woo est inférieure (12, 13), égale (2), ou supérieure (1, 3, 7, 11, 15) à celle de la technique de Murray et coll. (12) qui consiste à examiner à l'état frais, entre lame et lamelle, le *buffy coat* issu du tube capillaire, au microscope à fond noir (*dark ground technique*, DG, ou *buffy coat method*, BCM). La plupart des auteurs ont davantage comparé les techniques parasitologiques entre elles plutôt que chiffré la sensibilité des tests par rapport à

une référence fixe. La comparaison des tests présente un inconvénient car toutes les techniques utilisées n'ont pas la même sensibilité entre des mains différentes.

L'objet du présent travail a été de chiffrer le seuil moyen de positivité de la détection de *Trypanosoma vivax* par la technique de Woo, d'évaluer la sensibilité du test en fonction de la parasitémie, et de quantifier la parasitémie en fonction du nombre de parasites observés dans un tube capillaire. Un mode de comptage des parasites dans le sang est proposé. L'expérience a été menée au CIRAD-EMVT-Guyane, avec une souche guyanaise de *T. vivax* chez le mouton.

■ MATERIEL ET METHODES

Sang parasité

Deux moutons croisés Black belly x Créole, âgés de 12 mois, issus d'un troupeau indemne de trypanosomose, et eux-même négatifs

1. CIRAD-EMVT-Guyane, Institut Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne, Guyane française

* CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

aux tests de Woo et de recherche d'anticorps par ELISA (méthode voisine de celle de Ferenc et coll. (4)) ont été maintenus en bergerie étanche aux insectes.

L'un d'eux a été expérimentalement infecté avec la souche de *T. vivax* de Guyane française TVFG2, isolée en 1994 par Desquesnes et Demarty (non publié) ; il a été utilisé pour fournir du sang parasité.

L'autre animal a fourni du sang non infecté et ne réagissant pas spécifiquement avec *T. vivax* (absence d'anticorps dirigés contre *T. vivax*).

Une série de 22 échantillons sanguins de parasitémies allant de 1 à 1 767 trypanosomes/ml a été constitué par dilution de sang parasité dans du sang d'animal non infecté.

Collecte et pré-dilution

Les échantillons sanguins ont été récoltés sur héparinate de lithium en tubes vacutainers siliconés de 5 ml, puis déposés sur glace ; 5 ml du sang de l'animal infecté ont été collectés lors du quatrième pic parasitémique ; 140 ml de sang de l'animal non infecté ont été prélevés pour permettre la préparation des dilutions du sang infecté.

Après une estimation de la parasitémie lors du pic chez l'animal expérimentalement infecté, une pré-dilution du sang parasité a été réalisée avec le sang de l'animal non infecté, afin de ramener la parasitémie aux alentours de 10^5 trypanosomes/ml.

Le mélange des sangs a été assuré en retournant 10 fois le tube, puis en plaçant l'échantillon pendant 3 min sur un agitateur à plateau tournant. Cette opération a permis d'homogénéiser la répartition des parasites dans le sang de mélange.

Après agitation, la pré-dilution a été replacée sur glace.

Comptage des parasites

Un volume de 10 μ l de sang (= 10 mm³) a été déposé à la micropipette, entre lame et lamelle (22 x 22 mm). Lorsque la lamelle a été déposée sur le sang, les auteurs se sont assurés que la répartition du sang était homogène sur l'ensemble de sa surface. La lecture a été effectuée au grossissement x 400 en contraste de phase. Les variations éventuelles de répartition du sang ou des parasites ont été atténuées par la lecture de 2 fois 25 champs, soit un total de 50 champs, lus en croix, d'une extrémité à l'autre de la lamelle.

Une série de 9 comptages a été effectuée par deux techniciens (5 comptages par un premier technicien et 4 par un second), afin d'établir le nombre moyen de trypanosomes/champ de la pré-dilution, et amortir les variations individuelles des préparations.

L'intervalle de confiance de la moyenne a été calculé au risque de 5 p. 100, selon la formule donnée par Schwartz (14) :

$$\mu = m_0 \pm \frac{t S}{\sqrt{n}}, \text{ avec } n = 9, \text{ ddl} = 8 \text{ et } t = 2,3.$$

Détermination de la parasitémie de la pré-dilution

La hauteur moyenne de la cellule constituée par la lame et la lamelle est égale à :

$h = \text{volume de sang/surface de la lamelle}$, $h = 10 \text{ mm}^3 / (22 \text{ mm})^2$, soit 0,0207 mm.

Au grossissement microscopique utilisé (x 400), le rayon R d'un champ microscopique était de 0,239 mm.

Le volume de sang exploré dans un champ microscopique a été calculé selon la formule :

$$V = \Pi \cdot R^2 \cdot h \text{ soit } 3,7077 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3.$$

Avec la technique de comptage utilisée, l'observation d'une moyenne d'un trypanosome par champ correspondait donc à une parasitémie de 269 711 trypanosomes/ml.

Dilutions

A partir de la parasitémie calculée sur la pré-dilution, par dilution dans du sang non infecté, une série de 22 échantillons de sang ont été préparés avec des parasitémies décroissantes, comme indiqué ci-dessous (en nombre de trypanosomes/ml) : 1 767, 1 325, 883, 707, 530, 442, 353, 265, 177, 88, 71, 57, 44, 35, 26, 18, 13, 9, 7, 4, 2 et 1.

Pour obtenir ces échantillons, le premier a été amené à 1 767 parasites/ml, à partir duquel un deuxième à 177 parasites/ml a été constitué. Par dilutions en séries du premier et du deuxième échantillon ont été préparées les dilutions allant respectivement de 1 767 à 265 parasites/ml et de 177 à 1 parasite/ml. L'homogénéisation des mélanges a été effectuée comme précédemment, puis les échantillons et leurs dilutions ont été placés sur glace afin de préserver la vitalité des parasites.

Test de Woo

Pour chacune de ces dilutions, six tubes capillaires à microhémocrite (volume 70 μ l) ont été préparés (132 au total) et centrifugés à 15 000 tours/min pendant 5 min. La lecture de ces tubes a été faite par observation directe de l'interface plasma/globules blancs (*buffy coat*) selon la technique décrite par Woo (17). Les tubes ont été lus en aveugle ; 3 séries par le premier technicien, les 3 autres par le second. Les tubes capillaires ont été remplis, centrifugés puis déposés verticalement sur glace par séries de 11, de telle sorte que l'intervalle de temps entre centrifugation et lecture n'a pas excédé 20 min.

La lecture a été effectuée au grossissement x 100 (microscope Leitz Biomed Laboratoire®), avec un objectif normal, mais en utilisant une source de lumière oblique afin d'augmenter le contraste de phase, ce qui a facilité la visualisation des parasites (condenseur Universel UKL 513558, Leitz Wetzlar Germany®, position n°3). Une rotation complète du tube capillaire sur son portoir a été réalisée par quarts de tour ; quatre points de vue du tube ont donc été explorés. En moyenne, l'examen a été réalisé en 2 min. Le nombre total de parasites observés dans chaque tube a été enregistré puis rapporté à sa dilution au terme des lectures en aveugle.

Interprétation des résultats

Le test de Woo est un examen fournissant à la fois une réponse qualitative (positif/négatif) et quantitative (nombre de trypanosomes observés dans la préparation).

- Interprétation de la réponse qualitative :

La sensibilité d'un test est la proportion d'examen positifs parmi des échantillons infectés.

Pour chaque dilution, la probabilité pour que le test de Woo soit positif est calculée en faisant le rapport du nombre de tubes positifs/nombre de tubes examinés ; cette probabilité représente la sensibilité du test de Woo ; elle est exprimée en fonction de la parasitémie.

- Interprétation de la réponse quantitative :

Afin de donner une estimation de la correspondance entre la parasitémie et le nombre de trypanosomes observés dans un tube à hé-

matocrite, les tubes capillaires pour lesquels un nombre «n» de trypanosomes a été observé sont regroupés, et la parasitémie moyenne correspondante, ou parasitémie pondérée, est calculée.

Pour cela, compte tenu de l'imprécision du dénombrement des parasites dans le tube capillaire, au-delà de 4 trypanosomes/tube, les résultats ont été regroupés de 5 à 9 et de 10 à 20 parasites/tube.

Un tableau de correspondances permet d'établir le seuil moyen de positivité du test, c'est-à-dire la parasitémie moyenne correspondant à l'observation d'un unique parasite.

■ RESULTATS

Comptage des parasites

Le jour de l'expérience, la parasitémie a été évaluée à 2.10^6 trypanosomes/ml. Une pré-dilution au vingtième a ramené la parasitémie aux environs de 10^5 trypanosomes/ml, puis les comptages ont été réalisés.

Le nombre de *T. vivax* observés dans les 50 champs est indiqué, pour les 9 lectures, au tableau I. La moyenne (m_0), l'écart type (S), et l'intervalle de confiance de la moyenne (μ), au risque de 5 p. 100 ont été établis.

Tableau I

Résultats des comptages et estimation de la parasitémie de la pré-dilution

Numéro du comptage	Nbre de t. observés /50 champs	Nbre moyen de t. par champ	Parasitémie en t./ml
1	17	0,34	91 702
2	16	0,32	86 308
3	17	0,34	91 702
4	25	0,50	134 856
5	25	0,50	134 856
6	23	0,46	124 067
7	17	0,34	917 02
8	19	0,38	102 490
9	20	0,40	107 884
Moyenne	19,89	0,40	$m_0 = 107\ 285$
Ecart type	3,38	0,07	$S = 18\ 238$
Intervalle de confiance du nombre moyen de parasites/ml dans la pré-dilution			$\mu = 107\ 000 \pm 14\ 000$

t. = trypanosomes

Les résultats indiquent que la parasitémie de la pré-dilution était de $107\ 000 \pm 14\ 000$ (soit 13 p. 100.) parasites/ml.

Les 22 dilutions ont été réalisées, comme indiqué précédemment, de 1 767 à 1 trypanosome/ml. L'incertitude portant sur ces dilutions a été considérée comme négligeable ; les nombres de trypanosomes/ml de ces échantillons ont donc été affectés d'un intervalle de confiance de ± 13 p. 100.

Interprétation de la réponse qualitative

Le nombre de trypanosomes observés dans chacun des 132 tubes capillaires est reporté dans le tableau II ; pour chaque dilution, la probabilité pour que le test soit positif a été calculée.

Le regroupement des parasitémies par classes de probabilités voisines permet d'exprimer la sensibilité du test de Woo en fonction de la parasitémie comme indiqué au tableau III.

Tableau II

Nombre de trypanosomes observés dans chaque tube capillaire, et probabilité de réponses positives au test selon la parasitémie

Parasitémie de t./ml *	Séries des tubes capillaires						Probabilité de positivité du test
	1	2	3	4	5	6	
1 767	20	15	14	8	15	10	1
1 325	9	10	10	8	6	12	1
883	5	3	7	4	4	7	1
707	4	4	3	3	2	4	1
530	1	0	1	4	3	2	0,83
442	2	0	2	4	2	4	0,83
353	3	0	4	0	3	1	0,67
265	1	0	1	1	2	2	0,83
177	1	1	0	0	1	0	0,50
88	0	0	0	1	2	2	0,50
71	0	0	0	0	1	1	0,33
57	1	0	0	1	2	0	0,50
44	0	0	0	0	0	0	0,00
35	0	0	0	1	0	0	0,17
26	0	0	1	0	0	0	0,17
18	0	0	0	0	0	0	0,00
13	0	0	0	0	0	0	0,00
9	0	0	0	0	0	0	0,00
7	0	0	0	0	0	0	0,00
4	0	0	0	0	0	0	0,00
2	0	0	0	0	0	0	0,00
1	0	0	0	0	0	0	0,00

t. = trypanosomes

* les parasitémies indiquées sont affectées d'une incertitude de 13 %

Tableau III

Sensibilité du test de Woo selon la parasitémie

Parasitémie (nbre de <i>T. vivax</i> /ml)*	Nombre d'échantillons positifs/ nombre total d'échantillons	Sensibilité
> 700 ± 90	24/24	100 %
de 300 ± 35 à 700 ± 90	19/24	79 %
de 60 ± 10 à 300 ± 35	11/24	46 %
< 60 ± 10	2/36	négligeable

* Chiffres arrondis à la dizaine

Estimation de la parasitémie à partir du résultat du test de Woo

La fréquence des tubes capillaires dans lesquels un nombre «n» de parasites a été observé est reportée dans un tableau à 6 classes (avec n = 1, 2, 3, 4, 5-9 et 10-20), avec les parasitémies correspondantes. Le calcul des parasitémies moyennes pondérées a été effectué pour chaque classe en multipliant le nombre de tubes («n_i») par la parasitémie effective de l'échantillon («x_i»); la somme des «n_ix_i» d'une classe a été divisée par le nombre total d'échantillons dans la classe. Ces données ont été reportées au tableau IV, et ont permis d'établir une correspondance entre la parasitémie et le nombre de trypanosomes observés dans un tube capillaire. Ces estimations ont été reportées au tableau V, en tenant compte de l'incertitude de départ sur la parasitémie (± 13 p. 100).

Dans cette expérience, le seuil minimal de positivité a été de 26 ± 4 parasites/ml.

Le seuil moyen de positivité du test de Woo a été d'environ 200 ± 110 parasites/ml.

DISCUSSION

Méthode de préparation des échantillons

La séparation des parasites du sang sur colonne de DEAE 52 (9), ou par simple centrifugation du sang (16), puis leur adjonction à du sang non contaminé est une des possibilités de préparation d'échantillons de sang de parasitémie déterminée. Toutefois, les risques de réduction de vitalité dus au passage sur la colonne ou à la centrifugation et la plus grande difficulté à homogénéiser des mélanges dont un des composants possède un très grand nombre de parasites sous un très faible volume ont fait opter pour une technique différente, consistant à préparer des dilutions successives de sang contaminé dans du sang d'animal non infecté.

Comptage parasitaire

L'utilisation des techniques anciennes de fixation/coloration des trypanosomes pour le comptage en cellule n'a pas été retenue car, d'une part, la mobilité des parasites facilite leur observation et, d'autre part, les effets de leurs déplacements s'annulent statistiquement. Pour ces raisons, les comptages ont été effectués sur des parasites frais et non colorés.

Aucune cellule microscopique n'est adaptée au comptage direct des trypanosomes dans le sang, leur profondeur étant trop importante.

La technique utilisée pour le dénombrement des parasites dans le sang, consistant à placer à l'aide d'une micro-pipette, un volume connu de sang (10 µl) entre lame et lamelle (22 x 22 mm), présente l'avantage de permettre une bonne visualisation des parasites dans le sang brut car la profondeur de la «cellule» constituée par la lame et la lamelle est très faible (h = 0,0207 mm). En outre, contrairement à l'utilisation d'un hémocytomètre, elle permet de maintenir les parasites continûment dans du sang total.

En revanche, la répartition de l'échantillon est moins homogène que dans une cellule vraie, étant donnés les bords naturels de la «cellule capillaire», et la possible déformation de la lamelle par les forces capillaires; pour pallier à ces inconvénients, il est préconisé :

- d'utiliser des lamelles rigides, peu déformables sous l'effet des forces capillaires, ce qui évite une répartition hétérogène du sang sous la lamelle ;

Tableau IV

Fréquence des tubes capillaires ayant présenté un nombre «n» de trypanosomes à une parasitémie donnée, et calcul des parasitémies moyennes pondérées correspondantes

Parasitémies (t./ml) x _i	Nbre «n» de t. observés par tube capillaire (n _i)					
	1	2	3	4	5 à 9	10 à 20
1 767	0	0	0	0	1	5
1 325	0	0	0	0	3	3
883	0	0	1	2	3	0
707	0	1	2	3	0	0
530	2	1	1	1	0	0
442	0	3	0	2	0	0
353	1	0	2	1	0	0
265	3	2	0	0	0	0
177	3	0	0	0	0	0
88	1	2	0	0	0	0
71	2	0	0	0	0	0
57	2	1	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0	0	0
26	1	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
Effectifs :	16	10	6	9	7	8
Somme des n _i x _i	3 144	3 326	3 533	5 654	8 391	12 810
Parasitémies moyennes pondérées* (t./ml)	197	333	589	628	1 199	1 601
et incertitude** ±	±87	±154	±225	±150	±309	±191

t. = trypanosomes

* quotient de la somme des n_ix_i / effectif de la classe

** l'incertitude indiquée est celle portant sur la distribution des n_ix_i, l'incertitude globale doit également inclure l'incertitude de départ de ± 13 %

Tableau V

Estimation de la parasitémie à partir du nombre de trypanosomes observés dans un tube capillaire

Nbre de <i>T. vivax</i> observés dans un tube à hémocrite	Parasitémie correspondante en parasites/ml*
1	200 ± 110
2	330 ± 200
3	590 ± 300
4	630 ± 230
5 à 9	1 200 ± 460
10 à 20	1 600 ± 400

* Chiffres arrondis à la dizaine

- de respecter une hauteur d'environ 0,02 mm ; si l'on utilise des lamelles de surface (S) différente de celle indiquée, le volume de sang est choisi tel que $V = S \cdot 0,02$;

- de s'assurer visuellement de la répartition homogène de l'échantillon sous la lamelle et de rejeter les préparations contenant des bulles d'air ;

- d'effectuer une lecture en croix de la préparation, allant d'une extrémité à l'autre de la lamelle ;

- de compter les parasites sur un nombre important de champs, afin de fournir une moyenne représentative de l'échantillon (50 champs dans la présente expérience) ;

- de lire plusieurs échantillons différents de la même dilution (9 dans la présente expérience) ;

- d'avoir recours à au moins deux techniciens différents.

Enfin, une cellule vraie de profondeur 0,02 mm permettrait d'affiner cette technique de dénombrement parasitaire.

Application aux suivis de parasitémie

Pour réaliser des suivis de parasitémie, pour lesquels la précision n'est pas aussi cruciale, cette technique de comptage peut être allégée à la lecture de 40 champs sur un seul échantillon, et devient alors très rapide.

Aux grossissements 100, 400 et 1 000, avec le matériel utilisé, la parasitémie est respectivement égale à environ 17 000, 270 000 et $1,7 \cdot 10^6$ fois le nombre moyen de parasites/champ. D'autres coefficients doivent être calculés avec des grossissements, des lamelles et/ou des appareils optiques différents. Dans les conditions décrites, la technique permet l'estimation de la parasitémie depuis $1,7 \cdot 10^3$ (1 parasite/10 champs au grossissement x 100) jusqu'à $2 \cdot 10^7$ parasites/ml (12 parasites/champ au grossissement x 1 000).

Sensibilité du test de Woo

La sensibilité relative de l'HCT et du BCM/DG est variable selon les auteurs et selon les espèces parasitaires étudiées, comme le soulignent quelques rappels de résultats publiés antérieurement.

Murray et coll. (12), montrent que sur 100 N'Dama de Gambie, la technique du DG donne 39 positifs alors que celle de l'HCT n'en donne que 15, mais la proportion des espèces de trypanosomes rencontrés dans leur étude n'est pas précisée.

De même, Paris et coll. (13) indiquent que, pour *T. vivax*, la sensibilité du DG est meilleure (500 parasites/ml) que l'HCT (1 250/ml). Les résultats sont différents avec les autres espèces ; pour *T. brucei*, ils observent que l'HCT est meilleure (500/ml) que le DG (5 000/ml) et, pour *T. congolense*, le DG est plus sensible (250/ml) que l'HCT (6 250/ml). Il faut mettre en relation ces variations entre espèces avec la forme et la taille des parasites qui se comportent différemment lors de la centrifugation différentielle.

Camus (2) estime que les techniques ont la même sensibilité pour le diagnostic de *T. vivax* et *T. brucei*.

En revanche, Kalu et coll. (7) montrent que l'HCT est plus sensible que le DG pour le diagnostic de *T. vivax* et *T. brucei* sur des chèvres au Nigeria. Pour *T. congolense*, ils s'accordent sur le fait que la méthode du DG est plus sensible que l'HCT. De même, en Amérique du Sud, pour *T. vivax*, Betancourt et coll. (1), Monzon et coll. (11), Van Vlaenderen (15) et Desquesnes (3) trouvent que

l'HCT est plus sensible que le DG, mais ils ne chiffrent pas leurs résultats.

L'origine de l'ensemble de ces variations tient probablement à plusieurs facteurs :

- la variabilité intrinsèque de la technique du DG est assez importante ; l'extrusion et l'étalement du *buffy coat* à partir du tube capillaire est une étape délicate qui peut être à l'origine de grandes variations d'un technicien à l'autre ;

- la fatigue oculaire due à l'examen exhaustif des préparations peut être à l'origine d'une perte de sensibilité avec la technique de Murray lorsqu'un grand nombre d'échantillons sont traités ;

- la force centrifuge réellement exercée, qui dépend de la vitesse de rotation, de la taille des tubes, de la tension électrique et de la durée de centrifugation. Ainsi, Leeftang et coll. (10) ont observé qu'une centrifugation de 3 min au lieu de 5 donnait des résultats plus sensibles pour la détection de *T. vivax*, en particulier quand la parasitémie était basse ;

- les performances des microscopes modernes, en particulier leurs qualités optiques, et celle des condenseurs de lumière, ont considérablement amélioré les conditions de l'examen direct du *buffy coat* dans le tube capillaire ;

- l'utilisation d'objectifs normaux au grossissement x 100, ou d'objectifs à longue distance frontale aux grossissements x 250 ou x 320 peuvent également être à l'origine de variations importantes ;

- les multiples espèces parasitaires présentes en Afrique, parfois dans le même échantillon, ont pu interférer lors des estimations menées sur le terrain ;

- les performances individuelles et les habitudes des microscopistes doivent être prises en compte ;

- des variations morphologiques au sein d'une espèce, concernant en particulier la taille des parasites qui retentit sur l'effet différentiel de la centrifugation, ont été décrites chez *T. vivax* par Floch (5, 6) ; elles peuvent être à l'origine de certains écarts observés entre les auteurs utilisant des souches d'origine différente ;

- enfin, la sensibilité du test dépend étroitement de la vitalité des parasites, conditionnée notamment par : l'espèce-hôte utilisée, l'état immunitaire du sujet, mais surtout la fraîcheur et les conditions de conservation des échantillons, etc.

Dans l'expérience de Véry et coll. (16), pour *T. vivax*, le test de Woo n'est toujours positif qu'à partir de 10^4 parasites/ml de sang ; leur technique de préparation des échantillons de parasitémie déterminée passe par la séparation des parasites par centrifugation, puis la dilution du plasma riche en parasites dans du sang non infecté. En appliquant la technique de double centrifugation décrite par Kratzer et Ondiek (8), les auteurs observent que le test est toujours positif quand la parasitémie est supérieure à 10^3 , mais cette technique est plus lourde que l'HCT.

Paris et coll. (13) indiquent que, pour *T. vivax*, la sensibilité du test de Woo est de $12,5 \cdot 10^2$ parasites/ml, mais leur technique de comptage repose sur le dénombrement de parasites tués, qui peut être considérablement moins sensible que celui de parasites à l'état frais, mobiles et donc plus facilement observés.

Les résultats de cette étude indiquent une sensibilité supérieure à celles précédemment publiées, le seuil moyen de positivité a été d'environ 200 ± 110 parasites/ml, et le test a toujours été positif quand la parasitémie était supérieure à 700 parasites/ml.

■ CONCLUSION

Une technique simple a été décrite pour le comptage des parasites directement dans le sang, entre lame et lamelle ; cette technique est applicable dès que la parasitémie est supérieure à 2 000 parasites/ml (comptage au grossissement x 100).

Une correspondance entre la parasitémie et le nombre de trypanosomes observés dans un tube capillaire a été établie ; cette technique est applicable quand la parasitémie est inférieure à 2 000 parasites/ml.

L'ensemble de ces indices permet l'estimation rapide de la parasitémie pour des suivis parasitaires.

L'expérience a permis de chiffrer les données suivantes :

- le seuil moyen de positivité du test de Woo pour la détection de *T. vivax* chez le mouton a été d'environ 200 ± 110 *T. vivax*/ml ;

- le test de Woo a présenté une sensibilité de 100 p. 100 quand la parasitémie était supérieure à 700 parasites/ml ; environ 80 p. 100 quand elle était comprise entre 300 et 700 ; 50 p. 100 entre 60 et 300, puis sa sensibilité a été quasi nulle quand la parasitémie était inférieure à 60 trypanosomes/ml.

La divergence des résultats publiés antérieurement sur la sensibilité comparée des tests de Woo et de Murray doit inciter à comparer les techniques en faisant référence à une valeur fixe, qui est celle de la parasitémie, plutôt que de comparer entre elles des techniques ayant une grande variabilité intrinsèque. Le point crucial de la référence fixe sera le dénombrement des parasites dans la pré-dilution ; cette étape devra être réalisée avec la plus grande attention.

Les techniques visant à mettre en évidence une infection active, par l'observation du parasite, ou la mise en évidence de l'ADN parasitaire, doivent être comparées à des valeurs déterminées de la parasitémie.

BIBLIOGRAPHIE

1. BETANCOURT A.E., RAMIREZ L.E., WELLS E.A., BAZALAR H., 1979. La tecnica de centrifugacion en tubo capilar en el diagnostico de tripanosomiasis experimental. *Rev. ICA Bogota (Colombia)*, **14**: 97-104.
2. CAMUS E., 1983. Diagnostic de la trypanosomose bovine sur le terrain par la méthode de centrifugation hématocrite. *Revue sci. tech. Off. int. Epiz.*, **2**: 751-769.

3. DESQUESNES M., 1996. 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* (in press).

4. FERENC S.A., STOPINSKI V., COURTNEY C.H., 1990. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey in the Eastern Caribbean Basin. *Int. J. Parasitol.*, **20**: 51-56.

5. FLOCH H., 1943. Trypanosomes des bovidés en Guyane française. *Arch. Inst. Pasteur Guyane fr.*, **59** : 1-5.

6. FLOCH H., 1954. Sur la pathologie vétérinaire en Guyane française. Les affections des bovidés (I) : Généralités. Trypanosomiasis. *Arch. Inst. Pasteur Guyane fr.*, **329** : 1-8.

7. KALU A.U., EDEGHERE H.U., LAWANI F.A., 1986. Comparison of diagnostic techniques during subclinical single infections of trypanosomiasis in goats. *Vet. Parasitol.*, **22**: 37-47.

8. KRATZER R.D., ONDIEK F.O., 1989. The *buffy coat* double centrifugation technique, an improved method for the diagnosis of African trypanosomiasis. In: 20^e réunion CSIRTC, Mombasa, Kenya, 10-14 avril 1989.

9. LANHAM S.M., GODFREY D.G., 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**: 521-534.

10. LEEFLANG P., BUYS J., BLOTKAMP C., 1978. Studies on *Trypanosoma vivax* : comparison of parasitological diagnostic methods. *Int. J. Parasitol.*, **8**: 15-18.

11. MONZON C.M., MANCEBO O.A., ROUX, J.P., 1990. Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Vet. Parasitol.*, **36**: 141-146.

12. MURRAY M., MURRAY P.K., McINTYRE W.I.M., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **71**: 325-326.

13. 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.

14. SCHWARTZ D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Paris, France, Éditions médicales Flammarion, p. 306.

15. VAN VLAENDEREN G., 1996. In search of cattle trypanosomiasis in Suriname. M. Sci. Thesis, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium. (Santé animale n°46)

16. VERY P., BOCQUENTIN R., DUVALLET G., 1990. Sensibilité de la double microcentrifugation pour la recherche des trypanosomes. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **43** : 325-329.

17. WOO P.T.K., 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.*, **47**: 921-923.

18. WOO P.T.K., 1970. The haematocrit centrifuge technique for diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta trop.*, **27**: 384-386.

Reçu le 9.9.96, accepté le 19.2.97

Summary

Desquesnes M., Tresse L. Evaluation of the sensitivity of Woo test for detection of *Trypanosoma vivax*

The haematocrit centrifuge technique (HCT), or Woo test, is the technique most commonly used for diagnosis of animal trypanosomiasis, but its sensitivity is not well defined. Depending on the authors, the sensitivity of the Murray technique (dark ground buffy coat method, or DG/BCM) is higher, equal or lower than that of the Woo test for the detection of *Trypanosoma vivax*. Most authors have compared particular techniques relatively to other techniques, rather than attempting to measure the sensitivity of the tests in relation to a fixed reference. The relative sensitivity of particular tests appears to vary between technicians. The aim of the present study was to measure the sensitivity of the Woo test for French Guiana *T. vivax* detection, using blood samples with pre-determined levels of parasitaemia, ranging from 1 to 1767 parasites/ml, that were prepared by mixing infected ovine blood with non infected ovine blood. A simple technique is described for the enumeration of parasites in blood. The mean positivity level of the Woo test in sheep was about 200 ± 110 *T. vivax*/ml. The sensitivity of the test was 100 % above 700 parasites/ml, about 80 % between 300 and 700, 50 % between 60 and 300, and was negligible below 60 parasites/ml. Parameters are provided to estimate parasitaemia based on the number of parasites observed between slide and cover slip (parasitaemia > 2000) or in the capillary tube (parasitaemia < 2000). Sensitivity of the techniques for detection of active infection could be evaluated in comparison with fixed values such as known parasitaemias, artificially created, as described here.

Key words: *Trypanosoma vivax* - Centrifuging - Haematocrit - Sheep - Blood plasma - French Guiana.

Resumen

Desquesnes M., Tresse L. Evaluación de la sensibilidad del test de Woo para la detección del *Trypanosoma vivax*

La técnica de centrifugación del hematocrito (HTC), o test de Woo, es la más utilizada para el diagnóstico de las tripanosomiasis animales, pero su sensibilidad es poco conocida. Según los autores, en el caso de la detección del *Trypanosoma vivax*, esta es superior, igual o inferior que en el caso de la observación del *buffy coat* entre lámina porta objetos y la lámina cubre objetos del microscopio a fondo oscuro (*dark ground, buffy coat method, DG/BCM*) o técnica de Murray. La mayoría de los trabajos anteriores se orientan hacia una comparación de las técnicas parasitológicas entre ellas, más que a descifrar la sensibilidad de los tests con respecto a una referencia fija. La comparación de los tests entre ellos es una evaluación relativa, debido a que todas las técnicas utilizadas no tienen la misma sensibilidad en manos diferentes. El objetivo del presente trabajo es el de cuantificar la sensibilidad de la técnica de Woo para la detección de *Trypanosoma vivax* en Guyana, mediante pruebas realizadas en muestras sanguíneas con parasitemia determinada, en un rango de 1 a 1767 tripanosomas/ml, preparados mediante dilución de sangre infectada en sangre no infectada. La experiencia se realizó con sangre ovina. Se describe una técnica simple para el conteo de parásitos en la sangre. El límite promedio de positividad del test de Woo en el ovino fue de alrededor de 200 ± 110 *T. vivax*/ml. El test presentó una sensibilidad de 100 p. 100 cuando la parasitemia fue superior a 700 parásitos/ml, alrededor de 80 p. 100 entre 300 y 700, 50 p. 100 entre 60 y 300 y la sensibilidad fue casi nula bajo la barra de 60 parásitos/ml. Se dan los índices que permiten cuantificar la parasitemia en función del número de parásitos observados entre lámina porta objetos y la lámina cubre objetos (parasitemia > 2000) o bien contados en el tubo de hematocrito (parasitemia < 2000). Se propone una evaluación de la sensibilidad de las técnicas destinadas a demostrar una infección activa, con respecto a referencias fijas, es decir parasitemias conocidas, creadas artificialmente, tal y como se describió.

Palabras clave : *Trypanosoma vivax* - Centrifugación - Hematocrito - Ovino - Plasma sanguíneo - Guayana francesa.