

Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins

M. Desquesnes^{1*} L. Tresse¹

Mots-clés

Trypanosoma vivax - Amplification chaîne polymérase - Ovin - Bétail - Centrifugation - Plasma sanguin - Diagnostic - Guyane Française.

Résumé

Pour le diagnostic des infections actives du bétail par les trypanosomes, les techniques parasitologiques sont peu sensibles, en particulier lors de la phase chronique des infections. La détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* par méthode antigène-ELISA, mise au point par Nantulya et Lindqvist (1989), s'est avérée peu sensible et peu spécifique. La technique de détection de l'ADN de *T. vivax* par *polymerase chain reaction* (PCR), à l'aide des oligonucléotides décrits par Masiga et coll. (1992), est une alternative pour un diagnostic spécifique des infections actives du bétail. Vingt deux échantillons sanguins contenant des nombres déterminés de trypanosomes/ml, allant de 1 à 1 767, ont été constitués à partir de sang de mouton infecté par *T. vivax*, dilué dans du sang d'animal non infecté. La sensibilité de la réaction de PCR a été évaluée sur plusieurs types de préparation du sang : sang total hépariné, plasma, interface globules blancs/plasma de tubes à hématocrite (*buffy coat*), sang lysé, culot de centrifugation de plasma, et ADN purifié à l'aide d'un kit commercial à base de résine échangeuse d'ions. Le sang total inhibe presque toujours la PCR. La réaction sur plasma et sang lysé possède une faible sensibilité, de l'ordre de 450 parasites/ml. La PCR sur *buffy coat* a une meilleure sensibilité, les produits de la réaction sont parfois peu visibles. Le culot de centrifugation de plasma est une préparation originale, rapide et économique, dont les produits de PCR sont bien visibles, et qui a présenté une bonne sensibilité : 100 p. 100 des échantillons étaient positifs au-delà de 9 parasites/ml. La purification de l'ADN est une technique un peu plus longue et coûteuse, puisqu'elle procède de plusieurs manipulations et de l'utilisation d'un kit commercial, mais elle apparaît comme la plus sensible des techniques éprouvées : 100 p. 100 des échantillons étaient positifs au-delà de 2 parasites/ml ; toutefois, la lecture des résultats est parfois délicate. Ces deux techniques permettent de réaliser un diagnostic sensible et spécifique des infections actives du bétail par *T. vivax*. Leur évaluation devra être faite pour les autres espèces de trypanosomes pathogènes du bétail.

■ INTRODUCTION

Pour le diagnostic des infections actives par les trypanosomes, les techniques parasitologiques sont peu sensibles lorsque les parasitemies sont basses, ce qui est la règle lors de la phase chronique des infections (6).

Les techniques de diagnostic mises au point par Nantulya et Lindqvist pour la détection des antigènes par ELISA immunocapture (10) se sont avérées peu sensibles et peu spécifiques (2, 3) ;

elles sont en particulier inutilisables avec IL4007, une souche sud-américaine de *Trypanosoma vivax* (3).

Les techniques de PCR sont une alternative permettant la détection de l'ADN parasitaire. La rémanence de l'ADN de *T. vivax* dans le sang après destruction du parasite est très brève (1) ; en conséquence, une réponse positive à la PCR indique que l'animal est activement infecté.

Des travaux antérieurs ont montré la possibilité d'effectuer un diagnostic spécifique d'espèce (9) des infections actives du bétail par les trypanosomes, par PCR à partir de sang lysé (4), du *buffy coat* de tubes à hématocrite (8), de sérum (1), et d'ADN purifié (11).

L'objet du présent travail est de chiffrer le seuil de détection et la sensibilité de la PCR selon divers modes de préparation des échan-

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

* Adresse actuelle : CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex, France

tillons sanguins. Le travail a été réalisé au CIRAD-EMVT-Guyane, avec une souche Guyanaise de *T. vivax* cultivée sur 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 aux tests de Woo et de recherche d'anticorps par ELISA à l'aide d'une méthode voisine de celle de Ferenc et coll. (5), ont été maintenus en bergerie sous moustiquaire.

L'un d'eux a été expérimentalement infecté par voie intraveineuse avec une 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*).

Un volume de 5 ml de sang de l'animal infecté a été collecté lors du quatrième pic parasitémique suivant l'infection. Un volume de 150 ml de sang non infecté a été récolté au même moment sur l'autre animal.

Les échantillons sanguins ont été collectés sur héparinate de lithium, en tubes vacutainers siliconés de 5ml, puis déposés sur glace.

Comptage des parasites

Après une estimation de la parasitémie, 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. Après homogénéisation du mélange de sangs, le dénombrement des parasites dans la pré-dilution a été effectué comme suit :

Un volume de 10 μ l de sang a été déposé, à l'aide d'une micro-pipette, entre lame et lamelle (22 x 22 mm) ; lorsque la lamelle a été déposée, les auteurs se sont assurés que la répartition du sang était homogène sur l'ensemble de sa surface. Au grossissement x 400, 2 fois 25 champs de microscope ont été explorés, par une lecture en croix partant et aboutissant aux extrémités de la lamelle, soit un total de 50 champs par préparation. Le nombre total de parasites observés a été enregistré au cours de l'exploration.

En supposant une répartition homogène du sang, la hauteur moyenne de la «cellule» constituée par la lame et la lamelle était $h = 0,0207$ mm (10 μ l/484 mm²). Au grossissement microscopique utilisé (x 400), l'arête de la lamelle (22 mm) représentait 46 diamètres du champ microscopique ; le rayon d'un champ microscopique était donc de 0,239 mm, et le volume de sang exploré dans un champ microscopique de $3,707.10^{-3}$ mm³ (selon l'équation $V = h \times \pi R^2$). L'observation d'une moyenne d'un trypanosome par champ correspondait donc à une parasitémie de 269 711 trypanosomes/ml.

Les comptages ont été effectués sur neuf préparations différentes de la pré-dilution, afin d'établir la parasitémie de cette pré-dilution, avec un risque d'erreur limité.

L'intervalle de confiance de la moyenne au risque de 5 p. 100 a été établi selon la formule donnée par Schwartz (12) :

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

Préparation des dilutions de sang

A partir de la parasitémie calculée sur la pré-dilution, 22 dilutions mathématiques successives du sang parasité dans le sang non parasité ont été préparées, avec des volumes finaux de 5 ml pour chaque dilution. Avant et après homogénéisation des mélanges de sangs les échantillons ont été placés sur glace afin de préserver la vitalité des parasites. Les dilutions ont été réalisées comme suit (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.

Préparation des échantillons pour la PCR

Partant de 22 dilutions, chacune sous un volume de 5 ml, six modes de préparation des échantillons ont été appliqués.

n°1 - Sang total : un volume de 50 μ l de sang a été placé en cryotube à -20°C. Il a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°2 - Plasma : après centrifugation de 3,5 ml de sang hépariné à 304 g (1 300 t/min), à 4°C, pendant 10 min, le plasma a été récolté ; 0,5 ml a été placé dans un microtube à centrifugation et destiné à la préparation du «culot de centrifugation de plasma» (voir n°4), et 50 μ l ont été conservés en cryotube à -20°C. Ce plasma a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°3 - Buffy coat : un tube capillaire (70 μ l) a été préparé et centrifugé selon la technique de Woo (13) pendant 5 min à 15 000 t/min, puis, à l'aide d'une pointe de diamant, le tube a été coupé à environ 1 mm au-dessus de l'interface globules blancs/plasma ; 3 μ l de *buffy coat* ont été recueillis à l'aide d'une micro-pipette, placés dans un microtube et conservés à -20°C. Le *buffy coat* a été décongelé et pipeté directement pour la PCR. Le volume de matériel biologique étant très faible, dans l'expérience, six tubes ont ainsi été préparés afin de pouvoir réaliser plusieurs réactions de PCR sur la même dilution.

n°4 - Culot de centrifugation de plasma : c'est une préparation originale qui consiste à séparer les cellules sanguines du plasma par une première centrifugation du sang hépariné à basse vitesse (1 300 t/min), puis à sédimenter les parasites par une centrifugation du plasma à haute vitesse. Une quantité de 0,5 ml de plasma, précédemment obtenu (n°2), a été centrifugé à l'état frais, à 17 530 g (14 000 t/min), à 4°C, pendant 15 min. Le surnageant a été délicatement éliminé à la pipette, le culot a été placé à -20°C. L'échantillon a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°5 - Sang lysé : le protocole de lyse à la saponine décrit par Diall (4) a été utilisé. En bref, un volume de 50 μ l de sang hépariné a été ajouté à 500 μ l de tampon de lyse et centrifugé pendant 15 min à 17 530 g. Le surnageant a été éliminé, et le culot repris dans 500 μ l de tampon de lyse pour un deuxième lavage dans les mêmes conditions. Le culot a été repris dans 500 μ l de tampon de PCR, et centrifugé pendant 15 min à 17 530 g. Le culot a été repris dans 25 μ l d'eau distillée, incubé pendant 20 min à 100°C, puis conservé à -20°C. Il a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

n°6 - ADN purifié : la méthode décrite par Penchenier et coll. (11) a été utilisée pour la préparation des échantillons à l'aide du kit «ReadyAmp® Genomic DNA Purification System» (Promega®), à partir d'un volume de 0,8 ml de sang. Succinctement, 0,8 ml de sang hépariné et 0,8 ml d'eau stérile ont été incubés et agités 10 min à température ambiante, puis centrifugés pendant 2 min à 17 530 g. Le surnageant a été éliminé. Le culot a été resuspendu dans 100 μ l de résine et incubé pendant 20 min à 56°C, passé au vortex, incubé 10 min à 100°C, puis centrifugé pendant 2 min à 17 530 g. Le surnageant a été récolté et

Sample preparation for PCR diagnosis of *T. vivax* infections

stocké à -20°C en microtube. Il a été décongelé et pipeté directement pour la PCR.

Technique de PCR

Le protocole de PCR a été celui décrit pour la détection de l'ADN de *T. vivax* par Masiga et coll. (9), mis à part que le volume du milieu réactionnel n'était que de 20 µl (contre 50 µl dans la publication originale).

Les séquences des oligonucléotides sont rappelées ci-après :

TVW1 : 5'-CTG AGT GCT CCA TGT GCC AC-3' et

TVW2 : 5'-CCA CCA GAA CAC CAA CCT GA-3'

Le produit de PCR attendu est d'environ 150 pb.

Les concentrations finales des réactifs dans le milieu de PCR étaient les suivantes : 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 200 µM de chaque nucléotide (Nucleotide solutions, Biolabs®) ; 0,83 µM de chaque oligonucléotide, et 0,25 unité de Taq DNA polymérase (Taq DNA polymérase 5 000 U/ml, Promega®). Les réactions ont été menées en microtube de 0,5 ml ; le milieu réactionnel a été couvert à l'aide d'une goutte d'huile minérale (Mineral oil, Sigma®).

Le témoin positif était constitué de plasma du mouton infecté récolté au quatrième pic parasitémique (2.10⁶ parasites/ml). Le témoin négatif était constitué d'eau bidistillée. Les témoins et les échantillons ont été agités vigoureusement au vortex avant d'être pipetés et déposés à travers l'huile, à la micropipette, sous un volume de 1 µl.

Les 30 cycles thermiques de 30 sec (94°C/55°C/72°C) ont été effectués à l'aide d'un thermocycleur programmable (Thermojet V2.0®) ; une étape de dénaturation à 94°C pendant 5 min a précédé les cycles, une étape d'élongation terminale de 10 min à 72°C a été réalisée à l'issue des 30 cycles, puis les échantillons ont été ramenés à 4°C jusqu'à leur dépôt sur le gel d'agarose.

Pour la révélation des réactions, 10 µl d'échantillon mélangé à 1 ml de tampon de dépôt (tampon Tris, glycérol et bleu de bromophénol) ont été déposés dans un gel à 2,5 p. 100 d'agarose, en tampon Tris-borate EDTA/bromure d'éthidium. Le marqueur moléculaire pBR 322 DNA- *Msp* I Digest (Biolabs®) a été utilisé pour estimer le poids moléculaire des produits de PCR. L'électrophorèse a été réalisée à 85 V, 30-40 mA pendant 50 min. La lecture visuelle des résultats a été faite sur une table UV de longueur d'onde 312 nm. Le résultat était positif lorsqu'une bande fluorescente était visible à hauteur des marqueurs moléculaires spécifiques (doublet 160-147 bp du marqueur utilisé). Un cliché photographique (film Polaroid® 667 ISO 3000/36° et filtre gélatine Wratten® orange n°22) a permis d'archiver les résultats. Si l'un des témoins ne donnait pas satisfaction, l'ensemble des résultats de la réaction était rejeté.

Pour s'assurer de la reproductibilité des réactions, chaque échantillon a été traité trois fois. Au total 396 réactions ont été pratiquées (22 dilutions x 6 préparations x 3 répétitions).

Interprétation des résultats

Le seuil de positivité observé pour chaque technique de préparation des échantillons a été défini à la dilution pour laquelle des réactions négatives ont apparu en relation avec la décroissance de la parasitémie.

La sensibilité (Se) de la PCR a été calculée à partir de la définition de la sensibilité d'un test :

$$Se = \frac{\text{nombre de positifs}}{\text{vrais positifs} + \text{faux négatifs}}$$

Dans cette expérience, tous les échantillons étant infectés, la sensibilité du test s'est exprimée comme suit :

$$Se = \frac{\text{nombre d'échantillons positifs}}{\text{nombre d'échantillons testés}}$$

Elle a été calculée pour chaque type de préparation, aux divers seuils de positivité définis ci-dessus.

■ RESULTATS

Le jour de l'expérience, la parasitémie a été estimée à 2.10⁶ trypanosomes/ml. Une pré-dilution au 1/20^e a ramené la parasitémie aux environs de 10⁵ trypanosomes/ml, puis les 9 comptages ont été réalisés. Le nombre moyen de *T. vivax* observés en 9 lectures de 50 champs a été de 107 000 ± 14 000 (soit 13 p. 100) trypanosomes/ml. Les incertitudes sur les dilutions mathématiques réalisées à partir de cet échantillon étant considérées comme négligeables, les intervalles de confiance des 22 dilutions ont donc également été de 13 p. 100.

La figure 1 illustre le type de tracés obtenus sur les gels d'électrophorèse.



Figure 1 : tracés de migration des échantillons de PCR selon divers modes de préparation, pour une parasitémie de 530 *T. vivax*/ml. De gauche à droite : marqueur moléculaire (MM), témoin négatif, plasma, culot de centrifugation de plasma, sang lysé, sang hépariné, buffy coat, ADN purifié, témoin positif (plasma à 2.10⁶ parasites/ml).

Quand la réaction était positive, avec les échantillons de plasma, de buffy coat et les culots de centrifugation de plasma, une bande unique de 150 pb était généralement observée ; lorsque la parasitémie était très élevée, une bande de double poids (300 pb) était également visible (témoins positifs, plasma à 2.10⁶ parasites/ml). Le sang lysé et l'ADN purifié ont fait apparaître une fluorescence diffuse sur les trajets de migration des échantillons, ainsi que de multiples bandes de poids moléculaire non spécifiques qui pouvaient gêner la lecture du test, et dont l'intensité était parfois égale, voire supérieure à celle du signal spécifique de 150 pb.

Tableau I

Résultats des PCR avec les diverses préparations, selon la parasitémie

Parasitémie en t./ml*	Mode de préparation des échantillons sanguins					
	Plasma	Culot de plasma	Lyse du sang	Sang hépariné	Buffy coat	ADN purifié
1 767	3	3	3	0	3	3
1 325	2	3	3	0	3	3
883	3	3	3	0	3	3
707	3	3	3	0	3	3
530	3	3	3	0	3	3
442	3	3	3	0	3	3
353	0	3	0	0	3	3
265	1	3	2	0	3	3
177	1	3	0	1	3	3
88	2	3	1	0	3	3
71	1	3	2	2	3	3
57	2	3	1	2	3	3
44	1	3	2	0	3	3
35	2	3	1	0	2	3
26	0	2	0	0	1	3
18	1	3	0	0	2	3
13	1	3	0	0	0	3
9	2	3	0	0	2	3
7	0	2	0	0	0	3
4	0	1	0	0	0	3
2	0	1	0	0	0	3
1	0	0	0	0	0	0
Total positifs	31	57	27	5	46	63
Pourcentage de positifs	47 %	86 %	41 %	8 %	70 %	95 %

t. = trypanosomes

* les nombres de trypanosomes/ml indiqués sont affectés d'une incertitude de 13 %

Les résultats des PCR ont été reportés au tableau I, où figure le nombre de réactions positives observées (sur un total de trois réactions par échantillon), selon la dilution, pour chaque technique de préparation des échantillons. Le pourcentage total d'échantillons positifs est indiqué au bas du tableau (sensibilité globale de chaque test vis-à-vis de l'échantillonnage utilisé).

La réaction de PCR a presque toujours été nulle dans le sang total hépariné ; sur les 66 échantillons testés (3 x 22 dilutions) seulement 8 p. 100 ont été positifs.

Les autres échantillons ont présenté des résultats régulièrement, ou presque régulièrement, positifs au-dessus des seuils de positivité moyens indiqués ci-après :

- plasma et lyse du sang : $\geq 442 \pm 60$ trypanosomes/ml ;

- buffy coat : $\geq 44 \pm 6$ trypanosomes/ml ;

- culot de centrifugation de plasma : $\geq 9 \pm 1,2$ trypanosomes/ml ;

- ADN purifié : $\geq 2 \pm 0,25$ trypanosomes/ml.

Pour chaque mode de préparation des échantillons, la sensibilité de la PCR a été exprimée en fonction de la parasitémie, pour les 4 principaux seuils observés ; ces résultats ont été reportés au tableau II.

DISCUSSION

Choix du mode de préparation des échantillons

Les résultats font apparaître que le sang total est un très mauvais échantillon pour la PCR ; les inhibiteurs de la réaction, comme les substances porphyriques dérivées de l'hème, sont connus et justifient la purification de l'ADN réalisée pour la plupart des réactions de PCR sur échantillons sanguins (7).

Le plasma et le sang lysé ont présenté des sensibilités voisines, de l'ordre de 450 parasites/ml ; en-deçà de cette valeur, plusieurs résultats intermédiaires faussement négatifs ont été observés. D'autre part, avec la lyse du sang, le tracé de migration des échantillons a présenté une fluorescence forte, ainsi que de nombreuses bandes de poids moléculaire non spécifiques ; de plus, la bande de poids moléculaire spécifique ne possédait qu'une faible fluorescence (figure 1). Ces éléments rendent délicate la lecture du produit de PCR sur lyse du sang.

Tableau II

Sensibilité de la PCR selon quatre principaux seuils de positivité, coût et temps de préparation des échantillons

Sensibilité au seuil de (t./ml)	Plasma	Culot de plasma	Sang lysé	Buffy coat	ADN purifié
442 \pm 60	94 %	100 %	100 %	100 %	100 %
44 \pm 6	64 %	100 %	67 %	100 %	100 %
9 \pm 1,3	57 %	98 %	50 %	85 %	100 %
2 \pm 0,3	49 %	90 %	43 %	73 %	100 %
Coût de la préparation*	0,75 FF	0,90 FF	1,85 FF	1,75 FF	6,35 FF
Temps de manipulation :	1 min	3 min	6 min	3 min	4 min
Temps d'attente cumulés :	10 min	25 min	75 min	5 min	44 min

t. = trypanosomes

* ce coût n'inclut que la préparation des échantillons, pour calculer le coût total du diagnostic il faut ajouter celui de la PCR, soit environ 3 FF.

Le seuil de positivité obtenu sur plasma était inférieur à celui précédemment décrit sur sérum qui était de l'ordre de 1 000 à 1 500 parasites/ml (1). Cette différence est probablement due au fait que la séparation du plasma a été réalisée par centrifugation du sang hépariné à basse vitesse, ce qui, par effet différentiel, a permis de préserver au maximum la présence des trypanosomes dans le plasma, tout en éliminant les cellules sanguines dans le culot de centrifugation.

Le *buffy coat* a présenté une meilleure sensibilité, l'extinction des signaux de PCR survenant quand la parasitémie était inférieure à 44 ± 6 parasites/ml. La PCR sur *buffy coat* est de lecture facile (une seule bande de fluorescence) bien que la fluorescence soit parfois de faible intensité. Le passage des échantillons au vortex avant l'introduction dans le milieu de PCR est apparu comme une étape déterminante pour des résultats reproductibles. En-deçà de 44 trypanosomes/ml, les résultats étaient irréguliers, probablement du fait que le prélèvement du *buffy coat* est une opération délicate sujette à variations entre techniciens.

Il est à noter que pour pouvoir réitérer la réaction il est nécessaire de préparer plusieurs tubes à hématocrite ou de réaliser la centrifugation à haute vitesse en microtube, avec l'échantillon sanguin de départ, afin de collecter un volume de *buffy coat* suffisant.

La séparation du plasma par centrifugation du sang hépariné à basse vitesse (1 300 t/min) permet d'éliminer les cellules sanguines par sédimentation, sans trop appauvrir l'échantillon en parasites. Par la suite, la centrifugation du plasma à haute vitesse permet d'enrichir l'échantillon en récoltant les parasites dans le culot.

La PCR sur culot de centrifugation de plasma a donné des résultats régulièrement positifs jusqu'au seuil de 9 trypanosomes/ml. Le produit spécifique de PCR est généralement bien visible, et le tracé de migration ne présente aucune fluorescence non spécifique (figure 1).

La purification de l'ADN fournit les meilleurs résultats, avec un seuil de positivité de 2 trypanosomes/ml, et l'absence de résultats intermédiaires faussement négatifs ; c'est donc la préparation la plus sensible. Le seul inconvénient est la forte fluorescence du tracé de migration des échantillons, et la présence de bandes de poids moléculaire non spécifiques qui rendent parfois la lecture du test délicate (figure 1).

Sensibilité et coût

Avec cette technique de purification de l'ADN, et les oligonucléotides TBR1 et TBR2 décrits par Masiga et coll. (9), Penchenier et coll. (11) ont obtenu la détection d'1 *T. brucei*/ml de sang chez l'homme. Ce seuil de positivité est très voisin de celui obtenu ici dans des conditions similaires, avec *T. vivax* chez le mouton. La technique de purification de l'ADN décrite par Penchenier et coll. semble donc parfaitement adaptée à ces deux espèces ; toutefois, le temps de préparation et le coût des réactifs en font un mode de préparation onéreux, peu adapté au traitement d'un grand nombre d'échantillons.

Le tableau II résume, pour chaque type de préparation, la sensibilité du test pour quelques seuils de positivité, les durées de préparation des échantillons (manipulation et temps d'attente) et le coût des préparations. Pour les calculs de coût, seul le matériel et les réactifs nécessaires à la préparation des échantillons sont pris en compte au tarif de base des catalogues des fournisseurs. Avec un volume réactionnel fixé à 20 µl, le coût de la PCR est d'environ 3 FF, ce qui porte le coût total des diagnostics à environ 4 FF (culot de centrifugation de plasma) et 10 FF (purification de l'ADN) ; soit, respectivement, 0,8 et 2 \$US.

Spécificité

Avec les oligonucléotides spécifiques d'espèce, décrits par Masiga et coll. (9) pour *T. vivax*, *T. brucei* et *T. congolense*, il n'a jusqu'à présent jamais été décrit de réactions croisées, ni entre *Trypanosoma* sp. ni avec d'autres genres ; leur spécificité est totale.

Alors qu'avec la technique parasitologique, lorsque les parasites observés dans les tubes capillaires sont peu nombreux ou résultent d'un mélange de plusieurs espèces, il n'est pas toujours possible d'identifier la ou les espèces présentes ; la technique de PCR est, quant à elle, parfaitement spécifique d'espèce.

Comparaison au test de Woo

Les deux techniques préconisées à l'issue de cette expérience montrent, pour la détection de *T. vivax*, une sensibilité bien supérieure à celle du test de Woo dont le seuil de positivité, dans cette même expérience, a été évalué à 700 *T. vivax*/ml pour une sensibilité de 100 p. 100 (voir article précédent).

■ CONCLUSION

Economiquement, à sensibilités voisines, la préparation du culot de plasma est plus rapide et plus avantageuse que la purification de l'ADN. On préconisera donc l'usage du culot de centrifugation de plasma pour la préparation des échantillons à la PCR dans le cadre des études épidémiologiques, et la purification de l'ADN pour le diagnostic individuel.

L'étude de la sensibilité et du seuil de positivité de la technique de culot de centrifugation de plasma devrait être faite avec les autres *Trypanosoma* sp. et les oligonucléotides correspondants. Compte tenu de la faible taille de *T. congolense* et des conséquences sur son positionnement après la centrifugation du sang, il est probable que, pour cette espèce, seule la technique de purification de l'ADN soit adaptée ; en revanche, la large membrane ondulante de *T. brucei* permettra, avec un rendement au moins égal à celui de *T. vivax*, d'enrichir en parasites les échantillons de culot de centrifugation de plasma. La technique du culot de centrifugation de plasma devrait donc être adaptée à ces deux espèces, tandis que la purification de l'ADN pourrait être appliquée à la détection de *T. congolense*. L'évaluation de cette technique pour le diagnostic des infections actives du bétail par *T. brucei* devra être faite.

Remerciements

Nous remercions vivement L. Penchenier et ses collaborateurs pour nous avoir adressé leur manuscrit avant publication et nous avoir autorisé à le citer en référence.

BIBLIOGRAPHIE

- DESQUESNES M. Application of a PCR technique on serum for diagnosis of the infection with *T. vivax* in cattle, comparison of the sensitivity to antigen detection test (trapping-ELISA) and parasitological techniques. *Acta Tropica* (sous presse).
- DESQUESNES M., 1996. Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes, with an isolate of *T. vivax* from French Guyana. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **791**: 172-185.
- DESQUESNES M., LA ROCQUE S. de, 1995. Comparaison de la sensibilité du test de Woo et d'un test de détection des antigènes de *Trypanosoma vivax* chez deux moutons expérimentalement infectés avec une souche guyanaise du parasite. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **48** : 247-253.

4. DIALL O., 1993. Camel trypanosomiasis in Mali; Contribution to the diagnosis and the epidemiology. Thèse Doct. Sci., Institut voor moleculaire biologie, Vrije Universiteit, Bruxelles, Belgique, 92 p.
5. 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.
6. GARDINER P.R., 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv. Parasitol.*, **28**: 229-317.
7. HIGUCHI R., 1989. Principles and applications for DNA amplification. In: H.A. Erlich ed., PCR technology. Stockton, England, Stockton Press, p. 31-37.
8. MAJIWA P.A.O., THATTHI R., MOLOO S.K., NYEKO J.P.H., OTIENO L.H., MALOO S., 1994. Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy coat samples from antigenaemic but aparasi-taemic cattle. *Parasitology*, **108**: 1-10.
9. 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. *Int. J. Parasitol.*, **22**: 909-918.
10. NANTULYA V.M., LINDQVIST K.J., 1989. Antigen-detection enzyme immunoassays for diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasitol.*, **40**: 267-272.
11. PENCHENIER L., DUMAS, V., GREBAUT P., REIFENBERG J.M., CUNY G., 1996. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite*, **3**: 387-389.
12. SCHWARTZ D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Paris, France, Editions médicales Flammarion, p. 306.
13. WOO P.T.K., 1970. The haematocrit centrifuge technique for diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta trop.*, **27**: 384-386.

Reçu le 16.10.96, accepté le 17.2.97

Summary

Desquesnes M., Tresse L. PCR sensitivity for *Trypanosoma vivax* detection with several methods of blood sample preparation

Parasitological techniques show a low sensitivity for diagnosis of active infections with *Trypanosoma* sp. in livestock, particularly in the case of chronic infections. *T. vivax* antigen detection through antigen-ELISA developed by Nantulya and Lindqvist (1989) is not sensitive and specific enough for infection diagnosis. *T. vivax* DNA detection through polymerase chain reaction (PCR) using the oligonucleotides developed by MASIGA et coll. (1992) appears to be an alternative for a specific diagnosis of *T. vivax* active infections in livestock. Twenty-two blood samples containing known numbers of *T. vivax*/ml, ranging from 1 to 1767, were prepared by dilution of *T. vivax* infected sheep blood into blood from a non infected sheep. PCR sensitivity was evaluated in several types of blood sample preparations: crude heparinized blood, plasma, lysed blood, buffy coat from haematocrit capillary tubes, pellet from plasma centrifugation, and DNA purified with an ion exchange resin commercial kit. Crude heparinized blood almost always inhibited PCR. Sensitivity of PCR with plasma and lysed blood was low, around 450 parasites/ml. PCR on buffy coat was more sensitive, but PCR products were sometimes little visible. Pellet of plasma centrifugation is an original, fast and economic preparation, whose PCR products are highly visible and which presents a high sensitivity: one hundred percent of the samples were positive when the parasitaemia was over 9 parasites/ml. DNA purification is slightly more time consuming and expensive, since it requires several manipulations and the use of a commercial kit, but it appears to be the most sensitive technique among those investigated: one hundred percent of the samples were positive when the parasitaemia was over 2 parasites/ml; however, PCR products were sometimes difficult to interpret. These last two techniques are recommended for a sensitive and species-specific diagnosis of active infections of livestock with *T. vivax*. These techniques should be evaluated for other pathogenic trypanosome species of livestock.

Key words: *Trypanosoma vivax* - Polymerase chain reaction - Sheep - Livestock - Centrifuging - Blood plasma - Diagnosis - French Guiana.

Resumen

Desquesnes M., Tresse L. Evaluación de la sensibilidad de la PCR para la detección del ADN del *Trypanosoma vivax* según diversos métodos de preparación de las muestras sanguíneas

Para el diagnóstico de las infecciones activas de tripanosomas en el ganado, las técnicas parasitológicas son poco sensibles, en particular durante la fase crónica de las infecciones. La detección de antígenos de *Trypanosoma vivax*, mediante el método antígenos-ELISA, desarrollado por Nantulya y Lindqvist (1989), se ha revelado poco sensible y poco específica. La técnica de detección del ADN de *T. vivax* mediante una reacción en cadena de polimerasas (PCR), gracias a oligonucleótidos descritos por Masiga *et al.* (1992), es una alternativa para un diagnóstico específico de las infecciones activas del ganado. Se prepararon veintidós muestras sanguíneas, conteniendo cantidades determinadas de tripanosomas/ml, de 1 a 1767, a partir de sangre de ovino infectado con *T. vivax*, diluido en sangre animal no infectada. La sensibilidad de la reacción de PCR fue evaluada sobre diferentes tipos de preparación sanguínea: sangre entera heparinizada, plasma, interfase glóbulos blancos/plasma de los tubos de hematocrito (*buffy coat*), sangre hemolisada, fondo de centrifugación de plasma y ADN purificado mediante un kit comercial a base de resina para intercambio de iones. La sangre total inhibe casi siempre la PCR. La reacción sobre plasma y sangre hemolisada presentan una sensibilidad baja, de alrededor de 450 parásitos/ml. La PCR sobre *buffy coat* presenta una mejor sensibilidad, los productos de la reacción son ocasionalmente poco visibles. El fondo de centrifugación de plasma es una preparación original, rápida y económica, cuyos productos de PCR son bien visibles y que presenta una buena sensibilidad: 100 p. 100 de las muestras fueron positivas a partir de 9 parásitos/ml. La purificación del ADN es una técnica un poco más larga y costosa, ya que proviene de diversas manipulaciones y de la utilización de un kit comercial, pero parece ser la más sensible de las técnicas examinadas: 100 p. 100 de las muestras fueron positivas a partir de 2 parásitos/ml. Sin embargo, la lectura de los resultados puede ser delicada. Estas dos técnicas permiten realizar un diagnóstico sensible y específico de las infecciones activas del ganado por *T. vivax*. La evaluación deberá llevarse a cabo para las otras especies de tripanosomas patógenos del ganado.

Palabras clave: *Trypanosoma vivax* - Reacción de cadenas de polimerasa - Ovino - Ganado - Centrifugación - Plasma sanguíneo - Diagnóstico - Guyana francesa.