

Maladie de Chagas en phase chronique hors zone d'endémie. Les outils diagnostiques

Chagas disease in chronic phase outside the endemic area. The diagnostic tools

L. Paris · F. Touafek · M.-H. Elghouzzi · S. Chérif · D. Mazier

Reçu le 27 septembre 2009 ; accepté le 1^{er} octobre 2009
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2009

Résumé Le diagnostic de la maladie de Chagas en phase chronique repose actuellement sur la sérologie. Dans l'idéal, hors zone d'endémie, il doit systématiquement associer l'IFI et un Elisa. Une troisième technique doit être disponible pour les discordants. Il n'y a pas actuellement de technique de référence indiscutable. L'expérience de dépistage ciblé fait sur 254 patients d'origine bolivienne en région parisienne est cohérente avec les données de l'OMS et la bibliographie, avec 165 patients négatifs, 69 positifs et 20 cas indéterminés sur 254 sujets. La PCR, dont la sensibilité est au mieux de 70 %, n'a pas d'intérêt diagnostique en première intention. Il n'y a ni trousse commerciale ni techniques standardisées. Il y a un consensus pour l'utilisation des amorces TCZ1-TCZ2 (dont la cible se trouve sur l'ADN nucléaire) qui ont l'avantage d'une spécificité de 100 % et permettent l'amplification de toutes les souches de *Trypanosoma cruzi* quelle que soit la lignée. Cette technique n'a d'intérêt que chez des patients dépistés par la sérologie, pour éventuellement confirmer un diagnostic ne reposant que sur une seule technique sérologique ; elle peut servir à évaluer les échecs de traitement. Ses modalités de réalisation doivent tendre à une amélioration de la sensibilité.

Mots clés Maladie de Chagas · Diagnostic · Sérologie · PCR · Europe

Abstract The diagnosis of Chagas disease during the chronic phase is based on serology. Outside South America the use of two methods is recommended by WHO. A third method must be available for inconclusive results but there

is no gold standard. A pilot study of screening in 254 Bolivian people living in the Paris area (France) was made. Serological study was performed using IIF and three Elisa, Elisa Cruzei[®] (BioMérieux Brésil), BioElisa Chagas[®] (Bio-kit), and Chagatest Elisa[®] recombinante v. 3.0 (Wiener Lab). 165 patients were negative, 69 positive and 20 inconclusive. PCR-based assays appear to have a better sensitivity than parasitological methods, but not more than 70% that do not justify their use for primary testing. There are no standardized and commercial assays. The primer pairs based on the nuclear sequence TCZ1-TCZ2 seems to be the more specific (no cross reaction with others *Trypanosomatidae*) and the most sensitive with the strains of the two lineage of *Trypanosoma cruzi*. PCR would have a role in inconclusive serological cases or in the evaluation of treatment failure.

Keywords Chagas disease · Diagnosis · Serology · PCR · Europe

Introduction

La trypanosomose humaine américaine ou maladie de Chagas est une pathologie émergente en dehors de sa zone d'endémie, en raison des migrations de population vers les pays à économie développée. La très grande majorité des cas observés en France métropolitaine depuis 2004 sont des formes chroniques ou indéterminées concernant une population jeune, majoritairement féminine, en âge de procréer [8].

Les problèmes posés par cette émergence sont de deux ordres :

- risques directs pour les patients en raison de l'évolution naturelle de la maladie et des conditions intercurrentes (réactivation en cas de déficit immunitaire acquis ou induit) ;
- risques indirects liés à la transmission verticale, par transfusion ou par des greffons.

L. Paris (✉) · F. Touafek · D. Mazier
Laboratoire de parasitologie-mycologie,
groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital,
F-75013 Paris, France
e-mail : luc.paris@psl.ap-hop-paris.fr

M.-H. Elghouzzi · S. Chérif
EFS Île-de-France, 83-87 rue des Alpes,
F-94263 Rungis cedex, France

Le risque transfusionnel est en théorie contrôlé par le dépistage systématique pratiqué dans les EFS pour tous les sujets à risque.

Le problème du diagnostic individuel est différent de celui du dépistage tel qu'il est pratiqué dans les EFS. Dans les formes chroniques de maladie de Chagas, le diagnostic parasitologique direct ou indirect (xénodiagnostic, hémoculture) est le plus souvent négatif, car la parasitémie est faible ou nulle. Le diagnostic repose donc sur la sérologie. La place des techniques d'amplification génique, dont la sensibilité est meilleure que celle des techniques parasitologiques traditionnelles, doit être clairement définie.

Diagnostic sérologique de la maladie de Chagas en phase chronique indéterminée

Principes généraux

Les recommandations de l'OMS, dans son rapport de 2002, restent la base de ce diagnostic [13]. Ce rapport liste trois principes techniques sur lesquels étaient basées la majorité des trousse commercialisées à l'époque : immunofluorescence indirecte (IFI), *enzyme linked immunosorbent assay* (Elisa) avec des antigènes natifs et inhibition de l'hémagglutination (IHA). L'OMS recommande l'utilisation de ces techniques dites conventionnelles comme suit :

- études épidémiologiques : une technique ;
- dépistage en banque du sang : Elisa ;
- diagnostic d'une suspicion clinique : utiliser systématiquement deux tests conventionnels.

En diagnostic clinique, le diagnostic de maladie de Chagas est considéré comme acquis quand un résultat positif est obtenu avec plus d'une technique. En cas de discordance entre deux techniques, les tests doivent être répétés, de préférence sur un nouveau prélèvement et une troisième technique mise en œuvre ; le rapport prévoit la possibilité, dans ce cas, d'utiliser des techniques, principalement de type Elisa, avec antigène recombinant (au moins deux épitopes).

Outre l'apparition de nouvelles trousse depuis 2002, l'application de ces recommandations en France doit prendre en compte des difficultés de trois ordres :

- les dispositions légales en vigueur imposent l'usage de réactifs marqués CE ou, à défaut, permettent l'utilisation d'une technique maison si celle-ci est validée localement avec une traçabilité dans la préparation des antigènes ;
- un certain nombre de réactifs marqués CE n'ont pas d'importateur régulier en France et ne sont pas disponibles facilement ;
- les dispositifs de diagnostic *in vitro* pour la maladie de Chagas sont hors annexe 2 au sens de la directive

98/79/CE. Ce marquage, dans cette catégorie, garantit la qualité de fabrication du test mais n'est pas une preuve de bonne performance. En pratique, cela signifie simplement que le réactif a réellement les performances qu'il revendique, quelles qu'elles soient.

Critères de choix des techniques

Aucune technique d'IHA n'ayant le marquage CE, les seules méthodes disponibles dans la liste de celles proposées par l'OMS sont donc l'IFI et plusieurs trousse Elisa (Tableau 1). Il existe une technique d'agglutination de particules marquée CE et distribuée en France, mais ses caractéristiques ne permettent pas son utilisation en diagnostic au sens de l'OMS. Les tests rapides, qui peuvent avoir une utilité en cas d'urgence, ont une sensibilité trop faible pour avoir une place en diagnostic, compte tenu de leurs performances actuelles [11].

Le choix est donc, en pratique, limité à celui de la technique Elisa qui sera associé à l'IFI, si on souhaite se conformer aux recommandations de l'OMS.

La majorité des trousse disponibles revendiquent des sensibilités et des spécificités élevées, supérieures à 98 voire 99 %. Il est toutefois évident que ces données, basées sur des études ponctuelles pour chaque réactif, ne reflètent pas la réalité diagnostique quotidienne [1].

En pratique, plusieurs critères doivent être analysés pour le choix de la technique.

Nature de l'antigène

Les réactifs disponibles en immunoenzymologie utilisent soit des extraits antigéniques de *Trypanosoma cruzi* (antigène natif) soit des antigènes recombinants. Ces antigènes peuvent provenir de formes amastigotes, épimastigotes ou trypomastigotes du parasite, ce qui n'est pas indifférent [2]. Les trousse utilisant des antigènes natifs seraient plus sensibles et celles des antigènes recombinants plus spécifiques. Ces données de la littérature sont parfois contredites par l'expérience ainsi la spécificité de trousse utilisant des antigènes recombinants a été mise en défaut dans le bilan fait par l'EFS sur plus de 160 000 dépistages. Pour les trousse utilisant des antigènes recombinants, la sensibilité semble d'autant meilleure que le nombre d'épitopes est élevé et l'OMS recommande un nombre minimum de deux. Enfin, des réactions croisées sont possibles avec d'autres *Trypanosomatidae* [4].

Isotypes détectés

Les informations disponibles sont variables selon les trousse dont les caractéristiques, quand elles sont précisées, peuvent influencer sur les performances. En effet, certaines ne détectent que les IgG, d'autres les IgG et les IgM, voire

Tableau 1 Trousses pour le diagnostic sérologique de la maladie de Chagas marquées CE et distribuées régulièrement en France (*Kits for serologic diagnosis of Chagas disease, EU approved and regularly available in France*)

<i>Elisa cruzi BioMérieux</i>	Ag natif	IgG	Elisa
Test Elisa Chagas III GrupoChile	Ag natif	IgG	Elisa
EIAgen T. cruzi Ab Adaltis	Ag natif	IgG, IgM, IgA	Elisa
<i>Ortho T. cruzi Elisa Ortho clinical diag.</i> Recommandé FDA pour dépistage des donneurs de sang	Ag natif	?	Elisa
Chagas Elisa Diagnostic automation	Ag natif ?	?	Elisa
<i>Chagas Elisa IgG + IgM Vircell</i> (distribué par Orgentec)	Antigènes recombinants	IgG, IgM	Elisa
<i>BioElisa Chagas Biokit</i>	Ag recombinant 4 épitopes	IgG, IgM	Elisa
<i>Chagatest Elisa rec v 3.0 Wiener Lab</i> (distribué par Medicolab). approuvé FDA pour usage clinique	Ag recombinant	?	Elisa
Recombilisa Chagas IgG test CTK Biotech	Ab recombinant	?	Elisa
UBI Magiwel T. cruzi IgG & IgM United Biotech	Ag recombinant	IgG, IgM	Elisa
<i>ID PAGIA Antibody test Diamed</i>	3 peptides		Agglutination
<i>Chagas IFA IgG + IgM Vircell</i> (distribué par Orgentec)	Ag recombinants	IgG, IgM	IFI
<i>Immunofluor Chagas Bioscientifica</i> (distribué par Ingen)	T. cruzi	IgG	IFI
Chagas Stat Pak Chembio diagnostic	Ag recombinant		Tests rapides
Chagas two spot rapidip insta test Diagnostic automation			Tests rapides
OnSite Chagas Ab rapid test CTK Biotech	Precoated T. cruzi Ag	IgG, IgM, IgA	Tests rapides
OnSite Chagas Ab Combo rapid test CTK Biotech			Tests rapides
Chagas Chek 1 Vedalab			Tests rapides

Les réactifs en italiques ont un importateur régulier en France.

parfois les IgA. En théorie, dans les formes chroniques, ce sont les IgG qui sont présentes et donc recherchées. L'insuffisance de données en fonction des réactifs ne permet toutefois pas de se faire une idée très claire des performances relatives de chacun.

Problème des souches de *T. cruzi*

Les études phylogénétiques permettent de distinguer deux lignées principales du parasite. La lignée 1 est répartie de façon assez homogène dans toute la zone d'endémie, tant dans le cycle domestique que le cycle sauvage. La lignée 2 est subdivisée en cinq « clusters » phylogénétiques, dont les deux premiers circulent essentiellement dans un cycle sauvage quand les trois autres ont un cycle exclusivement domestique et ont été isolés uniquement au sud du bassin de l'Amazone [3]. Cette diversité génétique peut probablement expliquer les différences de performances des tests en fonction des régions où ils ont été évalués.

Tests de référence

Les recommandations de l'OMS, comme les difficultés de choix des réactifs, posent la question de la technique de référence en cas de discordances entre les méthodes utilisées en première intention. Quatre techniques revendiquent le statut de test de référence [9] : l'IFI, deux techniques d'immuno-

blot basées sur des antigènes différents [5,14] et une technique de radio-immunoprécipitation (RIPA [*radio immune precipitation assay*]).

IFI

L'IFI utilise une suspension de formes épimastigotes de *T. cruzi*. Il existe deux trousse commerciales marquées CE, régulièrement disponibles en France : la trousse Immunofluor Chagas, Biocientifica SA, Buenos Aires, Argentine, comprenant des lames préparées et un conjugué anti-IgG, IgA et IgM et la trousse Chagas IFA IgG + IgM, Vircell, Granada, Espagne, avec un conjugué anti-IgG et IgM. Ces trousse ont les limites habituelles de l'IFI : nécessité d'un microscope à fluorescence et d'un personnel entraîné, subjectivité de la lecture et inadaptation aux grandes séries. C'est toutefois la seule technique « de référence » accessible à la fois sur des critères commerciaux et réglementaires.

INNOLIA Chagas assay (Innogenetics, Ghent, Belgique)

C'est une technique standard d'immunoblot utilisant sept antigènes recombinants déposés sur une membrane de nylon. Après incubation des sérums, lavage des bandes, puis une seconde incubation avec un conjugué anti-IgG humaines, les bandes de précipitation sont mises en évidence par une réaction colorée. La lecture est visuelle par comparaison

avec les bandes témoins du contrôle positif de la trousse. Il n'y a actuellement aucune fabrication industrielle de ce réactif.

TESA blot (BioMérieux, Rio do Janeiro, Brésil)

C'est également une technique d'immunoblot, mais qui utilise des antigènes excrétés-sécrétés de formes trypanomastigotes de *T. cruzi*. Hormis l'antigène qui est différent, le principe de réalisation et de lecture du test est le même que le précédent. Ce réactif est enregistré au Brésil, et son producteur envisagerait de demander son marquage CE.

RIPA

Cette technique, non commercialisée, difficile à utiliser en routine compte tenu de l'utilisation d'éléments radiomarqués, est disponible uniquement à l'université d'Iowa pour la recherche et un usage diagnostique limité.

En pratique, l'utilisation de ces techniques, hormis l'IFI, est limitée à un usage de recherche. Qui plus est, en dépit de leur statut de potentielles techniques de référence, aucune n'a fait la preuve d'une sensibilité et d'une spécificité de 100 %, permettant de classer tous les sérums. L'évaluation de l'OMS menée par Otani et al. [9] est, à cet égard, très informative (Fig. 1). Ce travail, mené sur un panel de 437 sérums provenant de dix états d'Amérique latine, visait à évaluer 19 réactifs commerciaux. Chacun de ces sérums a été testé avec les quatre techniques ci-dessus, dites « de confirmation » ; un échantillon était déclaré positif quand il était positif dans au moins trois des techniques de confirmation, négatif si négatif avec au moins trois des techniques de confirmation et indéterminé si positif avec seulement deux techniques de confirmation. Sept sérums sont restés indéterminés ; le statut de ces patients n'est pas clair, compte tenu du biais lié au recrutement et à la classification a posteriori. Si on analyse les résultats obtenus avec les techniques commerciales évaluées, on voit que sur 257 sérums classés négatifs avec les techniques de référence 126 sont pourtant positifs avec une trousse parmi les 19 testées, 35 avec deux trousse et sept avec trois trousse. À l'inverse, parmi 162 sérums classés positifs, 18 sont négatifs avec une trousse, trois avec deux trousse et encore trois avec trois trousse. Ces résultats montrent bien qu'au-delà des critères de l'OMS les choix techniques sont cruciaux. Il faut se baser à la fois sur les spécifications techniques, les performances revendiquées, les données publiées, la population cible et se faire une expérience personnelle.

Expérience sur un an de dépistage ciblé

Cette expérience, au plan biologique, a été menée en parallèle sur deux sites, le laboratoire de parasitologie mycologie

Etude OMS. 437 sérums. 18 tests sérologiques

Otani et al, Transfusion. 2009 Mar 5

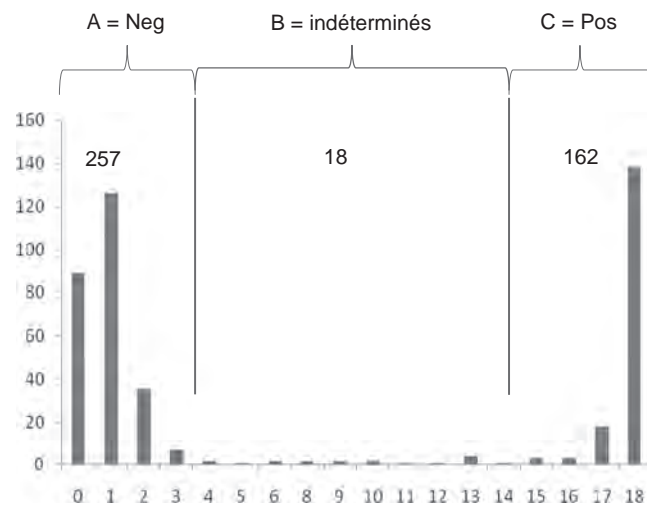


Fig. 1 Étude OMS sur les réactifs destinés au diagnostic sérologique de la maladie de Chagas. (WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease). Les sérums ont été classés positifs, indéterminés ou négatifs sur les résultats obtenus par les techniques de référence (IFI, RIPA, immunoblot). En abscisse : nombre de techniques utilisées ; en ordonnée : nombre de sérums positifs

du Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière (GHPS) et le laboratoire de l'EFS Île-de-France, site de Rungis. Pour chaque patient, les deux laboratoires ont reçu un sérum, et chacun a techniqué en aveugle ; les fichiers de résultat ont été croisés a posteriori. Au laboratoire de l'EFS Île-de-France de Rungis sont utilisés en parallèle deux Elisa :

- Elisa cruzi, BioMérieux, Brésil SA (Acarepaguã, RJ, Brasil) ; antigène : lysat de formes épimastigotes de *T. cruzi* souche « y » ; conjugué anti-IgG ;
- BioElisa Chagas, Biokit, Barcelone, Espagne ; antigène recombinant, quatre épitopes provenant de formes épimastigotes chez les triatomidae vecteurs : *T. cruzi* F antigen (*T. cruzi* fusion protein) et PEP-III contenant les peptides D, E et LOE 1.2 de *T. cruzi*, conjugué anti-IgG et IgM.

Ponctuellement, au cours de l'année 2009, certains sérums discordants ont été testés avec la trousse *T. cruzi* Elisa test system, ortho-clinical diagnostics, Inc. (Raritan, NJ, États-Unis) ; antigène : lysat parasitaire ; conjugué anti-IgG.

Les deux techniques utilisées au laboratoire de parasitologie-mycologie du GHPS sont :

- IFI, préparation personnelle, Ag *T. cruzi* dans un premier temps, puis lames Immunofluor Chagas, Biocientifica SA (Buenos Aires, Argentine) ; conjugué anti-IgG, IgM, IgA, BioRad (Marnes la Coquette, France) ;

- Chagatest Elisa recombinante v. 3.0, Wiener Lab, (Rosario, Argentine) ; antigènes recombinants, six épitopes : SAPA, Ag1, 2,13, 30, 36 présents aux stades épimastigotes et/ou trypomastigotes. Cette trousse a été utilisée en routine à partir de décembre 2008, tous les sérums antérieurs ont été testés rétrospectivement.

Du 1^{er} juin 2008 au 30 mai 2009, nous avons reçu 707 sérums pour sérodiagnostic de maladie de Chagas, dont 254 provenant de la consultation ciblée de Tenon. Nous présentons ici les résultats obtenus (Tableau 2) sur cette cohorte pour laquelle toutes les demandes sont correctement documentées et des résultats disponibles par au moins quatre réactifs différents.

Les critères pour interpréter le résultat individuel de chaque technique comme positif sont :

- IFI supérieure ou égale à 200 ; ce critère a été fixé sur la positivité de la PCR (de l'anglais *polymerase chain reaction*) dans le sang périphérique pour des patients ayant comme seul résultat sérologique positif une IFI égale à 200 ;
- Elisa : un index dans la zone de positivité définie par le fabricant de chaque trousse.

Les critères pour interpréter le résultat individuel de chaque technique comme négatif sont :

- IFI inférieure à 100 ;
- Elisa : un index dans la zone de négativité définie par le fabricant de chaque trousse.

Un résultat est indéterminé si l'IFI est égale à 100 ou index Elisa dans la zone grise définie par le fabricant. L'analyse des résultats avec ces critères permet de classer sans

difficultés 212 sérums : 165 négatifs avec toutes les techniques et 47 positifs avec toutes les techniques.

Quarante-deux sérums ont des résultats incomplets, indéterminés ou discordants, résumés dont le détail figure dans le Tableau 2. L'analyse de toutes ces données a mené à la définition d'un critère composite pour classer les patients comme positifs, négatifs ou indéterminés.

La classification finale a été faite sur les critères suivants :

- sérodiagnostic considéré comme positif :
 - IFI supérieure ou égale à 200 quel que soit l'Elisa ;
 - IFI égale à 100 et au moins un Elisa positif ;
 - IFI égale à 0 mais au moins deux Elisa positifs ;
- sérodiagnostic considéré comme indéterminé :
 - IFI égale à 100 et tous les Elisa négatifs ;
 - IFI égale à 0 et un seul Elisa positif ;
- sérodiagnostic considéré comme négatif si toutes les techniques sont négatives.

À la lumière de ces critères, le reclassement final est le suivant : 165 négatifs, 69 positifs et 20 indéterminés. Ces résultats ne font que confirmer les recommandations de l'OMS. Dans l'état actuel des réactifs disponibles et marqués CE, la sérologie de la maladie de Chagas doit, en diagnostic, être faite en utilisant deux techniques au moins. Dans l'idéal, ces deux techniques doivent être de principes différents et en pratique, en France, on peut proposer d'associer l'IFI et un Elisa. Si le laboratoire ne peut mettre en œuvre l'IFI, on peut proposer l'utilisation de deux Elisa en associant un réactif utilisant des antigènes recombinants et un avec antigène natif ; cette procédure ne met toutefois pas à l'abri de faux-négatifs en Elisa, comme le démontrent les trois cas positifs uniquement en IFI dans notre cohorte. En cas de discordance,

Tableau 2 Dépistage sérologique ciblé ; récapitulatif des résultats par technique (*serologic screening; results by method*)

Nombre de sérums	IFI	Elisa				PCR+/PCR faite	Statut final
		Wiener	BioMérieux	Biokit	Ortho		
47	≥ 200	+	+	+	+	25/37	+
3		+	ND	ND	ND	ND	+
3		–	–	–	–	2/3	+
7	= 100	+	+	+	+	4/7	+
3		+	ND	ND		2/3	+
1		–	+	+	+	ND	+
1		–	–	+	+	ND	+
1		+	–	–	ND	0/1	+
18		–	–	–	–	0/12	Ind
1	= 0	+	+	+	+	0/1	+
2		+	–	+	ND	0/1	+
1		–	–	+	ND	ND	Ind
1		+	ND	ND	ND	0/1	Ind
165		–	–	–	–		–
Total : 254							

il faut faire un contrôle sur un nouveau sérum et avoir une troisième technique qui devrait être basée sur un principe différent ; la mise à disposition d'une technique de type immunoblot pourrait aider à résoudre en partie les cas indéterminés. Dans ces cas, actuellement, il paraît opportun de proposer une recherche du parasite par amplification génique.

Place de l'amplification génique dans le diagnostic de la maladie de Chagas

Le diagnostic parasitologique de la maladie de Chagas repose classiquement soit sur les examens directs : frottis sanguin mince ou diverses méthodes de concentration (goutte épaisse, QBC, triple centrifugation, microhématocrite), soit sur des méthodes indirectes : culture, xénodiagnostic et amplification enzymatique des gènes, méthode connue sous l'acronyme PCR, à partir du sang périphérique prélevé sur EDTA.

Dans les formes chroniques, les examens directs sont en général négatifs ; la culture et le xénodiagnostic ont également une sensibilité faible dans cette indication et, pour ce qui est du xénodiagnostic, il n'est pas disponible en routine en Europe. Il y a donc une place pour les méthodes de PCR dont la sensibilité est en théorie meilleure [6,7]. Il n'y a toutefois ni trousse commerciale ni techniques clairement standardisées.

Choix des cibles et des amorces

De nombreuses paires d'amorces ont été testées puis comparées [12]. Ces amorces se répartissent en deux groupes. Un premier groupe utilise des amorces dont la cible se trouve sur l'ADN nucléaire du parasite. Dans ce groupe, on trouve les couples TCZ1-TCZ2, DIAZ1-DIAZ2, BP1-BP2, O1-O2, PON1-PON2 et Tca1-Tca2. Le second groupe comprend les amorces 121-122, REV-HUF et S35'-S36' dont la cible se trouve sur l'ADN du kinétoplaste. Il y a un relatif consensus pour l'utilisation du couple d'amorces TCZ1-TCZ2. En effet, les autres couples d'amorces ont soit des bandes moins intenses (DIAZ1-DIAZ2), soit ils ne permettent pas de détecter l'ensemble des lignées (O1-O2, BP1-BP2, Tca1-Tca2) ; enfin, certaines amorces (121-122, S35'-S36') sont susceptibles d'amplifier d'autres parasites ayant des similarités de séquence avec *T. cruzi* comme les leishmanies ou *T. rangeli*. Le couple TCZ1-TCZ2 a donc l'avantage d'une spécificité de 100 % ; de plus, l'absence de polymorphisme de l'ADN génomique permet l'amplification de toutes les souches de *T. cruzi* quelle que soit la lignée.

Choix des procédures techniques

L'absence de trousse commercialisées laisse un grand choix technique. Pour la PCR proprement dite, elle peut être faite

de façon conventionnelle ou en temps réel [10], avec tous les avantages que cela comporte (réduction du nombre de manipulations, réduction du risque de contamination, lecture objective). Par contre, la sensibilité peut beaucoup varier en fonction des méthodes d'extraction et du volume de prise. Les résultats partiels exposés dans le Tableau 2 ont été obtenus avec trois techniques d'extraction différentes pour un même prélèvement ; ce travail encore en cours démontre, s'il en était besoin, que les différentes méthodes d'extraction de l'ADN ne sont pas toutes équivalentes en matière de rendement. Enfin, il serait peut-être possible d'améliorer la sensibilité actuelle de la PCR qui est au mieux de 70 % en augmentant le volume de prise ou en faisant une concentration préalable des parasites.

Place de la PCR dans le diagnostic des formes chroniques

Compte tenu de sa sensibilité qui reste trop faible, la PCR n'a pas d'intérêt actuellement en tant que méthode diagnostique en première ligne. Elle a toutefois une place à la fois diagnostique et dans le suivi.

En diagnostic, il faut faire une PCR en plus du contrôle sérologique sur un second prélèvement en cas de sérologie indéterminée.

Chez les patients dont le diagnostic sérologique est positif, la PCR doit également être faite ; si elle est positive, son suivi constituera un argument d'efficacité du traitement. Enfin, même chez les sujets dont la PCR serait négative avant le traitement, cette technique pourrait permettre en partie d'évaluer les échecs de traitement.

Conclusion

En diagnostic, la sérologie dans les formes chroniques de la maladie de Chagas, en France métropolitaine, doit systématiquement associer l'IFI et un Elisa. L'usage de deux techniques Elisa utilisant des antigènes différents peut être proposé en cas d'indisponibilité de l'IFI. Une troisième technique doit être disponible pour les discordants. La PCR n'a pas d'intérêt diagnostique en première intention, mais a une place pour aider à résoudre les situations sérologiques indéterminées et comme critère d'échec de traitement. Ses modalités de réalisation doivent tendre à améliorer sa sensibilité. Des techniques nouvelles (protéomiques) sont à explorer. Compte tenu des difficultés de ce diagnostic, il semblerait logique que les demandes soient centralisées sur quelques sites expérimentés disposant des moyens nécessaires.

Déclaration de conflit d'intérêt : Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Araújo AB, Vianna EE, Berne ME (2008) *Anti-Trypanosoma cruzi* antibody detection in blood donors in the Southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 12(6):480–2
2. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, et al (2006) Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfus Med* 16(6):419–31
3. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M (2000) Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 30(1):35–44
4. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, et al (2007) Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania spp.* *Clin Vaccine Immunol* 14(8):1045–9 [Epub 2007 May 23]
5. Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, et al (2007) Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vaccine Immunol* 14(4):355–6 [Epub 2007 Feb 7]
6. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27:1477–82
7. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR (1996) Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 34:1171–5
8. Lescure FX, Jauréguiberry S, Jeannel D, et al (2008) L'émergence de la trypanosomose humaine américaine (maladie de Chagas) se confirme en France métropolitaine. *BEH* 23–24:200–21
9. Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, et al (2009) WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas' disease. *Transfusion* 49(6):1076–82 [Epub 2009 Mar 5]
10. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, et al (2007) Development of a real time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta tropica* 103:195–200 [Epub 2007 Jun 23]
11. Roddy P, Goiri J, Flevaud L, et al (2008) Field evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. *J Clin Microbiol* 46(6):2022–7 [Epub 2008 Apr 9]
12. Virreira M, Torrico F, Truyens C, et al (2003) Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 68(5):574–82
13. WHO (2002) Control of Chagas disease. WHO-technical report Series, 905
14. Zarate-Blades CR, Bladés N, Nascimento MS, et al (2007) Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57(2):229–32 [Epub 2006 Oct 3]



springer.com

Sign up for SpringerAlerts

The best way to keep you up-to-date with new developments in your field!

You can customize your SpringerAlerts to deliver exactly the information you need!

We offer

- ▶ Table of Contents Alerts for Journals
- ▶ Table of Contents Alerts for Book Series
- ▶ New Book Alert

As an alerts subscriber, you will receive

- ▶ Reliable news about journals and upcoming books
- ▶ Special offers – be the first to know about free online access to journals and discounts on books

springer.com/alerts – fast, free and flexible



011759a