



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE
UFR ENVIRONNEMENT

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2021 - 2022

N° D'ORDRE :

55

CANDIDAT

Nom : KONE

Prénom : Minayégninrin

THESE DE DOCTORAT

Mention : Ecologie, Biodiversité et Evolution

**Spécialité : Parasitologie et Biologie
Moléculaire**

**Performance des techniques et
algorithmes diagnostiques comme
paramètre pour l'élimination de la
Trypanosomiase Humaine Africaine**

JURY

Président : M. KOFFI Béné Jean-Claude, Professeur Titulaire,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Co-Directeurs: M. KOFFI N'Goran Mathurin, Professeur Titulaire,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

M. JAMONNEAU Vincent, Habilitation à Diriger des
Recherches, Institut de Recherche pour le Développement

Rapporteur : Mme YOBOUE Ahou Nicole Epse KOUAME, Maître de
Conférences, Université Jean LOROUGNON GUEDE

Examineurs: M. YAO Kouassi Patrick, Maître de Conférences,
Université Alassane OUATTARA

Mme YEBOUE N'Guessan Lucie, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Soutenue publiquement
le: 02/07/2022

TABLE DES MATIERES	
TABLE DES MATIERES.....	i
DEDICACE.....	v
REMERCIEMENTS.....	vi
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES ANNEXES.....	xviii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: GENERALITES.....	5
I.1. Contexte historique de la trypanosomiase humaine africaine.....	6
I.1.1. Premières descriptions de la maladie.....	6
I.1.2. Grandes épidémies de trypanosomiase humaine africaine.....	6
I.2. Situation épidémiologique actuelle de la trypanosomiase humaine africaine.....	9
I.3. Identification du parasite.....	14
I.3.1. Trypanosomes: agents étiologiques.....	14
I.3.2. Taxonomie.....	15
I.3.3. Morphologie de <i>Trypanosoma brucei s.l.</i> et cycle parasitaire.....	18
I.3.4. Génome du parasite.....	20
I.3.4.1. Génome nucléaire.....	22
I.3.4.2. Génome mitochondrial : le kinétoplaste.....	22
I.3.5. Reproduction chez le parasite.....	23
I.3.6. Mécanisme d'échappement du parasite au système immunitaire.....	24
I.3.6.1. Protéines de surface et variation antigénique.....	24
I.3.6.2. Résistance au sérum humain.....	26
I.4. Diagnostic de la THA et prise en charge thérapeutique.....	30
I.4.1. Diagnostic de la maladie.....	30
I.4.1.1. Tests sérologiques.....	30
I.4.1.2. Tests parasitologiques.....	36
I.4.1.3. Tests moléculaires.....	37

I.4.1.4. Limites du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine	40
I.4.1.5. Stadification de la maladie ou diagnostic de phase.....	40
I.4.2. Traitement de la trypanosomiase humaine africaine	41
I.5. Différentes stratégies de lutte actuelle.....	44
I.5.1. Lutte médicale.....	44
I.5.1.1. Dépistage actif.....	45
I.5.1.2. Dépistage passif.....	47
I.5.1.3. Dépistage actif ciblé.....	48
I.5.2. Lutte antivectorielle	49
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	51
II.1. ZONES D'ETUDE.....	52
II.1.1. Choix des différentes zones d'étude	52
II.1.2. Description de la zone de Bonon.....	55
II.1.3. Description de la zone de Sinfra.....	57
II.2. MATERIEL	57
II.2.1. Matériel biologique	57
II.2.2. Matériel technique.....	57
II.3. METHODES	58
II.3.1. Aspects éthiques de l'étude	58
II.3.2. Surveillance passive de la maladie du sommeil dans les foyers endémiques .	60
II.3.2.1. Critères d'inclusion et d'exclusion	60
II.3.2.2. Procédure de diagnostic.....	61
II.3.3. Evaluation des tests diagnostiques	63
II.3.3.1. Réalisation des tests de diagnostic rapide	63
II.3.3.2. Réalisation des tests parasitologiques	64
II.3.3.3. Réalisation des tests de laboratoire.....	67
II.3.3.3.1. Préparation des papiers filtres	67
II.3.3.3.2. Réalisation de la trypanolyse (TL)	69
II.3.3.3.3. Réalisation du test ELISA/ <i>T. b. gambiense</i>	70
II.3.3.3.4. Réalisation du test PCR en temps réel (qPCR).....	74

II.3.3.3.4.1. Extraction de l'ADN génomique	74
II.3.3.3.4.2. Procédure de la PCR en temps réel (qPCR)	76
II.3.3.3.5. Réalisation de la LAMP	80
II.3.3.3.5.1. Extraction de l'ADN	80
II.3.3.3.5.2. Réaction LAMP	80
II.3.3.4. Evaluation de la performance des tests diagnostiques	81
II.3.3.5. Analyses des données.....	83
II.3.3.5.1. Détermination des caractéristiques de la population d'étude....	83
II.3.3.5.2. Détermination des paramètres épidémiologiques de la THA ...	84
II.3.3.5.2.1. Calcul des prévalences de la THA	84
II.3.3.5.2.2. Calcul des <i>odds ratio</i> et leurs intervalles de confiance	87
II.3.3.5.3. Détermination des caractéristiques des tests de diagnostic	88
II.3.3.5.3.1. Performance intrinsèque des tests diagnostiques	88
II.3.3.5.3.2. Performance extrinsèque des tests de diagnostic	91
II.3.3.5.4. Détermination des différentes combinaisons de tests diagnostiques	92
II.3.3.5.5. Calcul du coefficient de corrélation Kappa (K) entre les tests de diagnostic	94
II.3.3.5.6. Régression logistique.....	94
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	96
III.1. RESULTATS	97
III. 1.1. Evaluation des tests de diagnostic rapides de terrain	97
III.1.1.1. Inclusions et caractéristiques des patients inclus	97
III.1.1.2. Tests de diagnostic réalisés sur terrain.....	101
III.1.1.3. Symptômes et signes cliniques prédictifs de suspicion sérologique	103
III.1.1.4. Performance des tests de diagnostic rapides de la trypanosomiase humaine africaine interprétés seuls ou en combinaison	108
III.1.2. Performances des tests diagnostiques réalisés au laboratoire.....	110

III.1.2.1. Echantillons de papiers filtres positifs	110
III.1.2.2. Caractéristiques des 12 suspects sérologiques positifs aux tests réalisés au laboratoire	110
III.1.2.3. Performance des tests de diagnostic réalisés de laboratoire	113
III.1.3. Algorithme de diagnostic pour la surveillance passive de la trypanosomiase humaine africaine	113
III.1.3.1. Concordance entre les différents tests de diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine.....	113
III.1.3.2. Séquence de tests de l’algorithme de diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine.....	116
III.2. DISCUSSION	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	130
CONCLUSION GENERALE	131
PERSPECTIVES.....	133
RECOMMANDATIONS	134
REFERENCES.....	135
ANNEXES	
PUBLICATION 1	
PUBLICATION 2	
PUBLICATION 3	
RESUME	

DEDICACE

À MON PÈRE, DE VENERÉE MÉMOIRE

*J'AURAIS BIEN AIMÉ T'EXPRIMER DE VIVE VOIX MON INFINIE
RECONNAISSANCE POUR LES NOMBREUX SACRIFICES QUE MA MÈRE ET TOI
AVIEZ CONSENTIS AU COURS DE MES ÉTUDES. HELAS, JE NE LE PUIS GUÈRE
À PRÉSENT, DU MOINS EN PARTIE. PUISQUE TU PEUX DESORMAIS
ENTENDRE LE SILENCE DE MON CŒUR INTÉRIEUR, AUSSI RÉALISES-TU
AISEMENT L'EXULTATION INEFFABLE ET LA PROFONDEUR DE L'ÉMOTION
QUI M'ÉTREIGNENT À L'ÉVOCATION DE TON SOUVENIR.*

MERCI PAPA

REMERCIEMENTS

La réalisation d'une thèse est le fruit d'un travail de longue haleine qui nécessite l'aide et la collaboration de plusieurs personnes. Il est normal que nous exprimions notre reconnaissance envers toutes ces personnes qui ont contribué aussi bien à la rédaction qu'aux travaux de recherche.

Nous voudrions tout d'abord adresser toute notre reconnaissance à Prof TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE, Présidente de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa.

Nous adressons nos sincères remerciements à Dr LEJON Veerle, Habilitation à Diriger des Recherches (HDR), Chercheur à l'UMR INTERTRYP de l'Institut de Recherche pour le Développement, France, investigatrice principale du projet DiTECT-HAT pour nous avoir permis de faire une thèse sur ce projet de recherche avec une allocation. Nous ne saurons taire votre magnanimité, votre amour pour la recherche et votre dévouement au travail bien fait.

Nous remercions le Prof KOUASSI Kouakou Lazare, Directeur de l'UFR Environnement de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa qui a bien voulu accepter notre inscription en thèse au sein de l'UFR qu'il dirige.

Toute notre profonde gratitude à notre Directeur de thèse, Prof KOFFI N'Goran Mathurin, Directeur de gestion de la qualité et de la bonne gouvernance à de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa, responsable de l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) de de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa pour nous avoir accueilli au sein de son équipe. Merci de nous avoir proposé cette opportunité. Nous vous remercions pour votre aide et pour votre avis toujours très pertinent. Nous vous sommes également reconnaissants pour le temps conséquent que vous nous avez accordé. Vos qualités pédagogiques et scientifiques, votre franchise et votre sympathie nous ont permis de beaucoup apprendre à votre côté cher Maître. Et tout cela a suscité en nous le goût de faire de la recherche.

Ce mémoire de thèse a lieu par la bonne volonté, l'abnégation et un coaching sans faille de notre Co-Directeur de thèse, Dr JAMONNEAU Vincent, Habilitation à Diriger des Recherches

(HDR), Chercheur à l'UMR INTERTRYP de l'Institut de Recherche pour le Développement, à qui nous adressons de chaleureux remerciements. Travailler à vos côtés fut un véritable plaisir et nous sommes contents d'avoir croisé votre route car votre énergie et votre confiance ont été des éléments moteurs pour nous. Nous ne saurons vous remercier sans poétiser et pour vous, nous dirons que: « le désir de bien faire est un puissant moteur mais celui de faire du bien est plus puissant encore». Nous avons apprécié votre vision, votre façon d'aborder l'autre dans la vie sociale et tout cela a créé un environnement scientifique d'exception.

Nous tenons à remercier infiniment Prof KOFFI Béné Jean-Claude, Dr YAO Kouassi Patrick, Dr YOBOUE Ahou Nicole Epse KOUAME et Dr YEBOUE N'Guessan Lucie, d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Nous désirons grandement remercier Dr KABA Dramane, Maître de Recherches, Directeur de l'Institut Pierre Richet de Bouaké, Responsable de l'URF Trypanosomoses et Leishmanioses, pour avoir permis pendant ces longues années, le stage de cette thèse au sein de l'institut de recherche dont il assure la direction. Vos remarques, votre ouverture d'esprit, votre franchise et votre charisme exceptionnel sont autant d'éléments qui nous ont permis d'atteindre nos objectifs de formation. Vous avez su être père, formateur et leader quand il le fallait, et nous vous en sommes reconnaissants.

Nous adressons nos sincères remerciements :

Au Professeur Philippe BÜSCHER, Chercheur à l'Institut de Médecine Tropicale (IMT) à Anvers, Belgique, Chef de l'unité de diagnostic des parasites pour son implication dans le projet DiTECT-HAT, notamment sur la problématique d'assurance qualité. Nous avons été honorés de travailler avec vous pendant notre formation.

Au Professeur Eric FEVRE, à Dr Lian Francesca THOMAS, Attaché de Recherche et à Dr Laura Cristina FALZON, Attaché de Recherche ; tous Chercheurs à l'institut international de recherche sur le bétail (ILRI), Nairobi, Kenya et à l'institut des sciences infectieuses, vétérinaires et écologiques, Université de Liverpool, Royaume-Uni, pour le soutien et la collaboration dans les analyses des données.

.....
A Dr KOUAKOU Lingué, Medecin et Directeur Coordonnateur du Programme National d'Elimination de la Trypanosomiase Humaine Africaine (DC-PNETHA).

Egalement à Dr N'GOUAN Kouassi Emmanuel, Médecin chirugien, Directeur du Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase (PRCT) et leurs collaborateurs, qui nous ont aidés à la réalisation des enquêtes sur le terrain.

Nos remerciements vont également à l'endroit de Messieurs N'DRI Kouadio Louis et DOUHAYERE Zohouri, dit « la Panthère de Ziplignan », pour les activités de terrain malgré le poids de l'âge ainsi que les sages conseils qu'ils n'ont cessés de nous prodiguer.

Nous remercions toute l'équipe « TRYPANO » du CIRDES, notamment Dr KABORE Jacques, Maître de Conférences et Enseignant-Chercheur à l'Université Nazi-Boni de Bobo-Dioulasso ; Dr ILBOUDO Hamidou, Attaché de Recherche, Chercheur à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé/Unité de Recherche Clinique de Nanoro ; M. COMPAORE Charlie Franck Alfred, Doctorant et les techniciens de laboratoire M. SAKANDE Hassane et BAMBA Mohamed pour la réalisation des travaux de laboratoire et la bonne collaboration.

Il est également important pour nous de montrer notre gratitude à M. KONAN Konan Thomas, précurseur de notre formation au laboratoire de l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa.

Un grand merci à tous nos aînés Docteurs: Drs AHOUTY Ahouty Bernadin et N'DJETCHI Kassi Martial, Assistants à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa, Drs SIMARO Siriki et YOBOUE Félix, Assistants à l'Université Alassane OUATTARA de Bouaké, Drs COULIBALY Bamoro et BERTE Djakaridja Attachés de Recherche à l'Institut Pierre Richet de Bouaké, Dr OUATTARA Aboubacar, Assistant à l'Université de San-Pedro, Dr TA Bi Tra Dieudonné, , Dr ABE Allepo Innocent.

Aux Doctorants: KASSI Bohoussou Georges, ADINGRA Guy-Pacôme, ASSOVIE Koco Rita, TRAORE Barkissa Melika, SOKOURY Aba Edwige et YAO Blé Gbacla Flora Dominique nous vous remercions pour l'ambiance qui a régné pendant les moments d'étude partagés.

Remerciements

Aux techniciens et machinistes de l'IPR en l'occurrence M. N'GUESSAN Marcellin, M. KOFFI Kouadio Alain De Marie, M. KOUAME Mambo cyrille, M. GNANKOU Firmin Bolivar, M. BENIE Tano Lopez, M. KONE Abdoulaye, M. KONE Mamadou pour tous leurs apports dans les travaux de terrain comme au laboratoire.

Un grand merci à tous nos amis notamment à Dr JOSEPH Kouassi Kouamé James, M. N'DJORE Komenan Jean-Claude, Dr ESSANIN Jean Bosco, M. SEKONGO Wangboho pour leur aide, leur bonne humeur et tous nos bons moments passés ensemble.

A Messieurs, KONE Sidiki, Ex sous-Directeur chargé des bourses au CROU de Daloa, CAMARA Valy, Chauffeur à UJLoG, KONAN Mathieu, Comptable à SIPEFCI de San-Pedro, TRAORE Gabéhonron, Technicien Entomologiste au Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire de l'Université Alassane OUATTARA de Bouaké, pour les affections de père qui se sont épanchées de leurs cœurs et leurs conseils à notre égard.

Nous tenons à remercier tous les membres de notre famille pour le soutien et les encouragements et surtout la confiance qu'ils ont placée en nous.

Nous remercions de façon spéciale notre bien-aimée, Mlle SAGBO Antonia Celesta Floria pour son soutien et sa patience tout au long de la thèse.

L'expression de notre profonde gratitude à toutes les personnes dont les noms n'ont pu être mentionnés ici.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIC	Akaike Information Criterion (critère d'information d'Akaike)
APOL1	Apolipoprotéine L1
ARN	Acide Ribonucléique
BPC/GCP	Bonnes Pratiques Cliniques / Good Clinical Practice
CATT	Card Agglutination Test for Trypanosomiasis
CC	Contrôle Conjugué
C ⁺	Contrôle positif
C ⁻	Contrôle négatif
CDT	Centre de Diagnostic et Traitement
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CIRDES	Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide
CNESVS	Comité National d'Éthique des Sciences de la Vie et de la Santé
Cq/Ct	Quantitative Cycle/Threshold Cycle (cycle seuil)
CSR	Centre de Santé Rural
CSU	Centre de Santé Urbain
CTC	Centrifugation en Tubes Capillaires
DEAE	Diethylaminoethyl cellulose
DNDi	Drugs for Neglected Diseases <i>initiative</i>
DO	Densité Optique
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESAG	Expression site-associated genes (Gènes associés au site d'expression)
FN	Faux négatif
FP	Faux positif
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GCLP	Good Clinical Laboratory Practice (Bonnes pratiques de laboratoire clinique)
Hbt	Habitant

Hb	Hémoglobine
HDL	High Density lipoprotein (Lipoprotéines de haute densité)
HG	Hôpital Général
HPR	Haptoglobin-related protein (Protéine liée à l'haptoglobine)
IC	Intervalle de Confiance
ICH	International Conference on Harmonisation
Ig	immunoglobulines
IMT	Institut de Médecine Tropicale
INRB	Institut National de Recherche Biomédicale
INSP	Institut National de Santé Publique
IPR	Institut Pierre Richet
ITS	First internal transcribed spacer (Premier espaceur interne transcrit)
IV	Intraveineuse
K	Coefficient Kappa
Kb	Kilo paire de bases
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LiTat	Lille Trypanozoon antigen type
M	Molaire
mAECT	miniature Anion Exchange Centrifugation Technique (technique de filtration sur mini-colonne échangeuse d'anions)
MDA	Multiple displacement amplification (amplification par déplacement multiple)
mM	milliMolaire
Mb	Méga paire de bases
MSF	Médecin Sans Frontières
MSHP	Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique
MTN	Maladie Tropicale Négligée
Mol	Moles
M ⁺	Sujet malade
M ⁻	Sujet sain
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification

NECT	Nifurtimox Eflornithine Combination Therapy
NHS	Normal Human Serum (Sérum Normal Humain)
nM	NanoMoles
OR	<i>Odds Ratio</i>
P	Prévalence
Pa	Prévalence apparente
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PG	Ponction Ganglionnaire
PFRA	Paraflagellar rod protein A gene
pH	Potentiel Hydroxyde
PNETHA	Programme National d'Élimination de la THA
PRCT	Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase
PO	<i>per os</i> (voie orale)
QBC	Quantitative Buffy-Coat
RGPH	Recensement Général de la Population et de l'Habitat
RIME	Repetitive insertion mobile element (élément mobile d'insertion répétitive)
rpm	Rotation Per Minute (Tour par minute)
qPCR	real-time quantitative-PCR (PCR quantitative à temps réel)
SD	Standard Deviation (Ecart-type)
SDS	sodium dodecyl sulfate
Se	Sensibilité
Sec	Seconde
SNC	Système Nerveux Central
SOP	Standard Operation Procedure (Procédure d'Opération Standardisée)
Sp	Spécificité
SRA	Serum Resistance-Associated (Sérum associé à la résistance)
SSS	Site de Screening Sérologique
THA	Trypanosomiase Humaine Africaine
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TL	Trypanolyse

Liste des sigles et abréviations

TLF	Trypanolytic Factor (Facteur trypanolytique)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)
VAT	Variant Antigen Type (Antigène variant)
VP	Vrai Positif
VPP	Valeur Prédictive Positive
VPN	Valeur Prédictive Négative
VN	Vrai Négatif
VSG	Variable Surface Glycoprotein (Glycoprotéine variable de surface)
WHO/OMS	World Health Organization / Organisation Mondiale de la Santé
μ M	microMolaire

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Liste des anciens et actuels médicaments contre la trypanosomiase humaine africaine (THA) 42

Tableau II: Nombre de cas de trypanosomiase humaine africaine dépistés par an et par foyer entre 2000 et 2019 en Côte d'Ivoire 54

Tableau III: Composition du mix pour la qPCR 78

Tableau IV: Combinaisons possibles à l'issue d'un test de diagnostic, selon le résultat au test et le statut du sujet vis-à-vis de la maladie 90

Tableau V: Cadre général dans le cas de deux modalités de réponse 95

Tableau VI: Degré d'accord et valeurs de Kappa proposés par Landis et Koch en 1977 95

Tableau VII: Nombre des inclusions dans les différents centres de santé par année 98

Tableau VIII: Fréquence d'apparition des signes cliniques et symptômes chez les patients inclus 99

Tableau IX: Répartition des symptômes et signes cliniques en fonction du genre 100

Tableau X: Caractéristiques de la population d'étude et résultats des tests de diagnostic rapides (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT) 102

Tableau XI: Résultats des tests de diagnostic de terrain en fonction du foyer et du genre 102

Tableau XII: Signes cliniques en fonction des 3 tests de diagnostic rapide (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT) 104

Tableau XIII: Symptômes et signes cliniques associés à la positivité des TDR (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT) 105

Tableau XIV: Associations univariables entre les variables explicatives d'intérêt et la positivité de chacun des trois tests de diagnostic rapide (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT) 106

Tableau XV: Modèle de régression logistique multivariable pour les associations entre les symptômes et signes cliniques et la positivité de chacun des trois tests de diagnostic rapides (SD Bioline HAT, HAT Sero-K-Set et rHAT Sero-Strip) 107

Tableau XVI: Performance des différents tests de diagnostic rapide de la trypanosomiase humaine africaine en utilisant le test parasitologique comme "gold standard" 109

Tableau XVII: Statuts et résultats des 12 suspects sérologiques positifs à un test de laboratoire	112
Tableau XVIII: Performance des tests de laboratoire effectués sur les patients positifs aux tests de diagnostic rapides (TDR)	114
Tableau XIX: Concordance entre HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip, SD Bioline HAT, trypanolyse (TL), ELISA/ <i>T b gambiense</i> , LAMP et qPCR m18S	115

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Elimination puis résurgence de la maladie du sommeil en Afrique 7

Figure 2: Distribution géographique de la trypanosomiase humaine africaine (THA) 10

Figure 3: Nombre de cas de trypanosomiase humaine africaine (*gambiense et rhodesiense*)
déclarés en Afrique de 2000 à 2020 11

Figure 4: Nombre de cas de trypanosomiase humaine africaine (THA) déclarés en Côte d'Ivoire
de 2000 à 2020..... 13

Figure 5: Classification des trypanosomes de mammifères 17

Figure 6: Morphologie de *Trypanosoma brucei sl.*..... 19

Figure 7: Cycle parasitaire de *Trypanosoma brucei s.l.* 21

Figure 8: Antigènes de surface des trypanosomes *s.l.* 25

Figure 9: Variation antigénique..... 27

Figure 10: Passage différentiel d'ApoL-1 dans les trois sous-espèces de *Trypanosoma brucei*
..... 29

Figure 11: Trois formats de tests de diagnostic rapide (TDR) de la trypanosomiase humaine
africaine (THA) 33

Figure 12: Dépistage actif de la trypanosomiase humaine africaine à *Trypanosoma brucei*
gambiense 46

Figure 13: Statut épidémiologique de la trypanosomiase humaine africaine dans des districts
sanitaires de Côte d'Ivoire 53

Figure 14: Localisation des différents sites d'échantillonnage 56

Figure 15: Algorithme diagnostique de la surveillance passive de la trypanosomiase humaine
africaine..... 62

Figure 16: Interprétation du résultat des tests de diagnostic rapides 65

Figure 17: Les étapes de réalisation du test parasitologique mAECT 66

Figure 18: Etapes de réalisation d'échantillon sur papier filtre 68

Figure 19: Exemple de plan d'utilisation de la microplaque pour le test ELISA/*T. b. gambiense*
..... 71

Figure 20: Microplaque ELISA/*T.b.gambiense* avec révélateur chromogène 73

Figure 21: Extraction de l'ADN génomique à l'aide de QIAamp DNA Micro Kit 75

Figure 22: Etapes de réalisation de la qPCR	79
Figure 23: Réalisation de la LAMP avec la machine de type incubateur LAMP Génie III (OptiGene)	82
Figure 24: Relation entre la prévalence réelle et la prévalence apparente	86
Figure 25: Association de deux tests diagnostiques interprétés en série (Schéma décisionnel "ET")	93
Figure 26: Association de deux tests diagnostiques interprétés en parallèle (schéma décisionnel "OU").....	93
Figure 27: Algorithme de dépistage de la trypanosomiase humaine africaine (THA) dans un service de santé primaire en zone d'endémie en Côte d'Ivoire	117

LISTE DES ANNEXES

- Annexe IA: Approbation du protocole de surveillance passive dans les foyers endémiques par le CNESVS (anciennement CNER)
- Annexe IB: Accord du comité consultatif de déontologie et d'éthique de l'IRD
- Annexe IC: Approbation du comité éthique de l'Université d'Anvers
- Annexe ID: Approbation du comité éthique de l'Institut de Médecine Tropicale (IMT)
- Annexe II: Fiche d'information du participant pour la surveillance passive
- Annexe III: Formulaire de consentement écrit pour les participants à l'étude
- Annexe IV: Formulaire d'assentiment pour les enfants de moins de 18 ans
- Annexe V: Protocole du test d'immuno-Trypanolyse sur papier filtre
- Annexe VI: Préparation des solutions tampons pour le test ELISA/*T.b.gambiense* sur papier filtre
- Annexe VII: Fiche du participant pour le dépistage passif des cas
- Annexe VIII: Liste et statut des centres de santé ayant participé aux activités du dépistage passif des cas
- Annexe IX: Malade de la THA traité à l'hôpital général de Bonon
- Annexe X: Formation des agents de santé aux divers protocoles de l'étude

INTRODUCTION

La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA), également connue sous le nom de maladie du sommeil est une maladie tropicale négligée (MTN) qui afflige les populations rurales de l'Afrique subsaharienne, dans les limites de la distribution du vecteur, la mouche tsé-tsé (ou glossine) (Büscher *et al.*, 2017). Cette maladie, connue depuis des siècles, est une affection parasitaire à transmission vectorielle dont la distribution géographique est limitée au continent africain avec 36 pays qui sont encore sous son emprise (WHO, 2020). Elle est causée par deux espèces de trypanosomes: *Trypanosoma brucei gambiense* classiquement responsable de la THA chronique en Afrique de l'Ouest et Centrale, et *Trypanosoma brucei rhodesiense* entraînant une forme aiguë en Afrique de l'Est et Australe. A la fin du XX^e siècle, la THA a montré son potentiel d'épidémie avec 37 385 cas rapportés à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1998 (Simarro *et al.*, 2008). Des programmes de lutte coordonnés et mis en œuvre par les programmes nationaux de lutte contre la THA, avec l'appui de l'OMS et d'autres parties prenantes, ont permis de mener une riposte efficace. Depuis 2000, le nombre de cas notifiés a connu une baisse régulière, avec une chute de moins de 10 000 nouveaux cas rapportés annuellement à partir de 2009 (Franco *et al.*, 2014). Ces résultats ont permis à l'OMS de fixer l'objectif d'élimination de la THA comme problème de santé publique (EPSP) en 2020 (WHO, 2012). Avec moins de 1 000 cas rapportés en 2018 et une réduction annuelle de plus de 40 000 km² de la zone rapportant plus de 1 cas pour 10 000 personnes par an, les objectifs fixés pour 2020 sont en train d'être atteints (Franco *et al.*, 2020).

Cependant, malgré les résultats spectaculaires obtenus ces dernières années, plus de 50 millions de personnes sont toujours soumises à un risque plus ou moins élevé d'infection dans l'aire de distribution des glossines, et le passé a déjà montré que la THA a tendance à ré-émerger rapidement après suspension de la lutte. Il est donc crucial de poursuivre les efforts de lutte qui s'inscrivent aujourd'hui au cœur d'un processus de transition épidémiologique importante. Dans ce processus, les stratégies et les outils doivent et devront continuellement s'adapter pour atteindre les prochains objectifs fixés pour 2030 par la nouvelle feuille de route de l'OMS : l'interruption de la transmission pour la THA due à *T. b. gambiense* (Franco *et al.*, 2020).

Les activités de contrôle et de surveillance menées au cours des 15 dernières années ont été particulièrement couronnées de succès en Côte d'Ivoire avec seulement 9 cas signalés entre 2015 et 2019 (WHO, 2021). Ces résultats ont été obtenus en grande partie grâce au dépistage actif des cas, mené par des équipes mobiles. Mais cette stratégie à forte intensité de main-

d'œuvre devient moins rentable en termes de coût/efficacité dans un contexte épidémiologique à faible prévalence (Büscher *et al.*, 2017). De plus, les populations des régions à faible endémicité ne perçoivent plus la THA comme une menace et ne se sentent plus concernées pour les campagnes de dépistage parce qu'elles sont chronophages et manquent d'intimité (Hasker *et al.*, 2012; Mpanya *et al.*, 2012). Le test d'agglutination sur carte pour la trypanosomiase (CATT) (Magnus *et al.*, 1978) utilisé par les équipes mobiles n'est plus approprié pour la détection passive des cas, puisqu'il est fabriqué en flacon de 50 doses de tests qui expirent en quelques jours une fois reconditionnées. De plus, la conservation des tests CATT a besoin d'une chaîne de froid et la réalisation du test nécessite un agitateur électrique. Les techniques de détection parasitologique comme la miniature Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) (Lanham et Godfrey, 1970 ; Lumsden *et al.*, 1977) ne sont plus suffisamment sensibles pour détecter les parasitémies faibles fréquemment observées chez les patients (Büscher et Deborggraeve, 2015). En outre, ces méthodes demandent de l'expérience, de l'équipement spécialisé et de l'électricité qui ne sont pas toujours disponibles dans les centres de santé périphériques (Mitashi *et al.*, 2015). Par conséquent, les équipes mobiles deviennent moins efficaces puisqu'elles détectent de moins en moins de cas pour les mêmes efforts et mêmes coûts.

L'intégration du diagnostic de la THA dans les activités courantes des centres de santé périphériques, ou dépistage passif, devient donc cruciale. Cette stratégie répond mieux aux exigences de cette transition épidémiologique et pourrait assurer et pérenniser l'élimination de la maladie. Cette intégration exige des tests et algorithmes adaptés aux ressources limitées de ces centres (Franco *et al.*, 2014). Par ailleurs, une surveillance soutenue est nécessaire pour atteindre puis suivre l'élimination dans l'optique d'anticiper des phénomènes de réémergence (Nieuwenhove *et al.*, 2001). L'avènement de différents tests de diagnostic rapide (TDR) pour le sérodiagnostic de la THA qui sont stables à la température ambiante et peuvent être exécutés sans matériel additionnel (Büscher *et al.*, 2013; Lumbala *et al.*, 2013 ; Sullivan *et al.*, 2013 ; Büscher *et al.*, 2014), a été un événement important. En effet, ces nouveaux tests diagnostiques ont permis d'intégrer efficacement un système de dépistage passif et la surveillance de la THA dans les structures fixes de santé (Jamonneau et Bucheton, 2014). Aussi, des tests immunologiques comme la trypanolyse (TL) (Van Meirvenne *et al.*, 1995; Jamonneau *et al.*, 2010; Camara *et al.*, 2014) et l'ELISA *Trypanosoma brucei gambiense* (ELISA *T. b.*

gambiense) (Hasker *et al.*, 2010 ; Mumba *et al.*, 2011) dont l'usage est restreint à des laboratoires de référence sont utilisés pour le diagnostic de la maladie. Quant aux tests moléculaires comme l'amplification isothermique à médiation en boucle (LAMP) (Njiru *et al.*, 2011 ; Njiru *et al.*, 2017) et la qPCR en temps réel (RT-qPCR ou qPCR) (Mumba *et al.*, 2014 ; Compaoré *et al.*, 2020a), ils sont employés dans le diagnostic de la THA à *T. b. gambiense* pour pallier le manque de sensibilité des tests parasitologiques (Büscher et Deborggraeve, 2015 ; Compaoré *et al.*, 2020a).

Cependant, à l'heure actuelle, aucune information concrète n'est disponible sur la performance diagnostique des TDR ou encore les combinaisons des TDR avec ou sans des tests parasitologiques, immunologiques ou moléculaires pour la détection passive de cas de la trypanosomiase humaine africaine (THA) en Côte d'Ivoire.

L'objectif général des travaux de recherche présentés dans ce mémoire de thèse est de contribuer à l'éradication de la trypanosomiase humaine africaine en Côte d'Ivoire grâce à la stratégie de surveillance passive. Pour atteindre cet objectif général, trois objectifs spécifiques ont été visés:

- analyser les tests de diagnostic rapide de la THA utilisés sur le terrain ;
- déterminer la performance des tests diagnostiques de laboratoire de la THA ;
- proposer un algorithme diagnostique pour la surveillance passive de la THA.

CHAPITRE I: GENERALITES

I.1. Contexte historique de la trypanosomiase humaine africaine

I.1.1. Premières descriptions de la maladie

La maladie du sommeil est vraisemblablement aussi vieille que l'humanité, mais elle a été signalée pour la première fois au 14^{ième} siècle (1374), à l'occasion de la mort du sultan du Mali survenue après une longue maladie se terminant dans un état de sommeil continu, « *Et le sultan fut frappé par la maladie du sommeil à laquelle sont particulièrement sujets les habitants du pays et surtout les chefs. Le malade est envahi par une somnolence qui se fait toujours plus profonde ; de temps en temps, il est possible de le libérer un bref instant de ce sommeil qui, finalement, devient invincible.* » Ibn Khaldoun, 1375, rapporté par Collomb en 1958 (Ibn, 1927).

Bien connue des marchands d'esclaves qui comprenaient déjà les conséquences de cette maladie car tous les esclaves présentant de gros ganglions à la base du cou étaient écartés. Il faut attendre encore 360 ans (1734) pour que la première description de la maladie sous le nom de "Sleeping distemper", soit faite par John Atkins, chirurgien de la marine anglaise, dans son ouvrage "The Navy Surgeon". Les négriers la considéraient comme une maladie côtière. Ce n'est qu'à partir de 1840, suite aux écrits de Clarke, missionnaire en Sierra Leone et en Côte d'Or (Ghana) que l'on commence à considérer qu'elle peut sévir à l'intérieur des terres.

Dans le courant du 19^{ème} siècle, de nombreux cas sont signalés en Afrique de l'Ouest et Centrale, mais sans que l'on puisse quantifier l'importance de la maladie. La première épidémie connue débute en 1896 et dure jusqu'en 1906 et concerne principalement l'Ouganda et le Congo (WHO, 2006). Elle fait près de 500 000 morts dans le bassin du Congo et l'on considère que c'est l'une des causes principales du sous-peuplement de cette région (Hide, 1999).

Avec l'avènement de l'ère Pasteurienne, des progrès considérables ont été notifiés dans la connaissance des maladies tropicales. Ainsi, de 1841 à 1901, la maladie du sommeil et son épidémiologie ont été définies.

I.1.2. Grandes épidémies de trypanosomiase humaine africaine

La maladie du sommeil est connue depuis le moyen-âge, mais la première grande épidémie connue a frappé l'Ouganda et le bassin du Congo à la fin du XIX^e siècle (de 1896 à 1906), faisant un million de décès (WHO, 2006). Cette épidémie majeure a eu lieu après le début de la colonisation avec pour conséquence le dépeuplement des pays comme la République Démocratique du Congo (RDC), la République Centrafricaine, le Cameroun et l'Ouganda.

Pendant cette période, la lutte ne reposait que sur l'isolement des malades et les déplacements des populations exposées car pour les chercheurs, les zones à risques étaient les endroits proches des cours d'eau ou les zones exondées.

A partir de 1920, la deuxième épidémie a commencé d'abord en Afrique centrale puis s'étend à l'Afrique occidentale. Mais la synthèse de l'atoxyl en 1905 a fourni aux médecins la première arme thérapeutique. C'est lors de cette épidémie que le médecin militaire français Eugène Jamot a édicté les règles de la lutte contre les grandes endémies et a mis en place ses fameuses « équipes mobiles », d'abord en Oubangui-Chari (République centrafricaine) puis au Cameroun. Durant cette période, ont été créés les « Secteurs de prophylaxie de la maladie du sommeil ». Les mêmes dispositions ont été appliquées en Afrique de l'Ouest notamment en Côte d'Ivoire entre 1931 et 1935. Dans les années 1961, grâce aux efforts des équipes de lutte, la deuxième épidémie a été maîtrisée (Figure 1). Dans la majorité des pays touchés, la prévalence de la maladie est restée inférieure à 0,1 % (WHO, 2000).

Dans les années 1970, s'est développée en particulier dans les anciens foyers de la maladie, la troisième épidémie suite à la désorganisation des services administratifs après les indépendances et le relâchement des efforts des équipes médicales mises en place dans une indifférence générale. Elle a été sûrement accentuée par l'effet des activités anthropiques sur l'environnement (climat et végétation) qui a permis aux populations de glossines de reconquérir des territoires plus étendus. Cette troisième épidémie a été victime du succès de la lutte sous l'ère Jamot. Ainsi, elle n'a plus été considérée comme un problème de santé publique et les équipes de lutte ont été affectées à d'autres priorités sanitaires. Par ailleurs, si, dans certains pays, la situation est restée relativement contrôlée, dans d'autres, l'endémie a connu des proportions catastrophiques à l'instar de la République Démocratique du Congo (De Raadt, 2005).

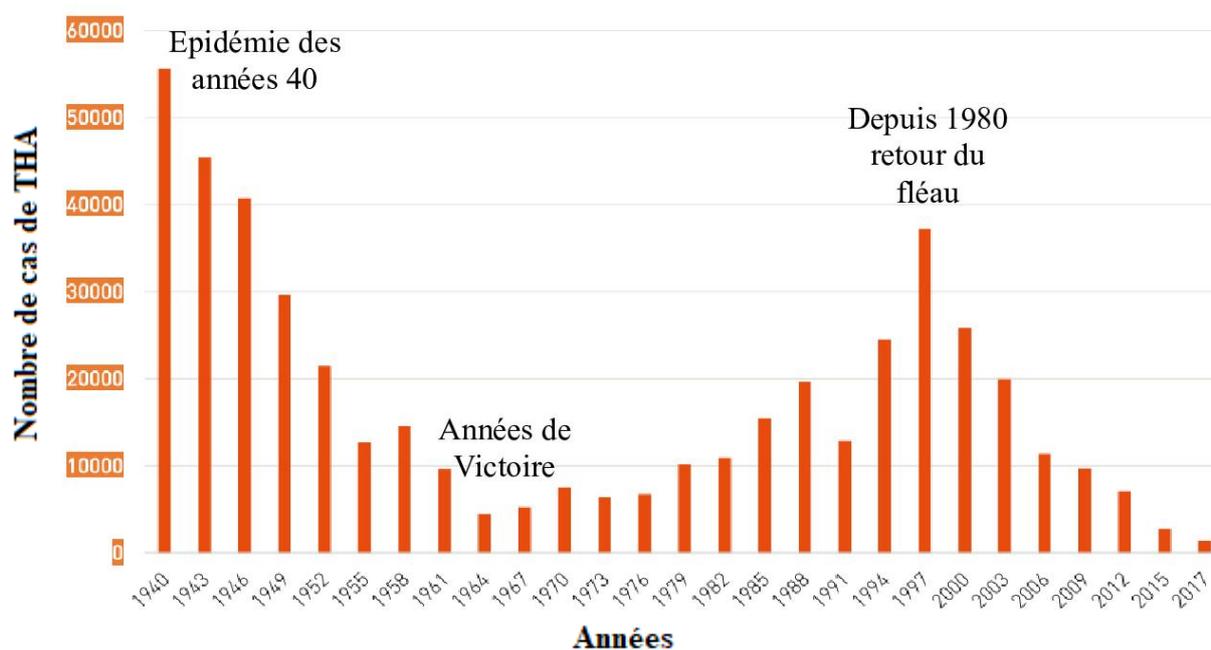


Figure 1: Elimination puis résurgence de la maladie du sommeil en Afrique

Source : DNDi-HAT, 2018

I.2. Situation épidémiologique actuelle de la trypanosomiase humaine africaine

Historiquement présente dans 36 pays de l'Afrique subsaharienne dans les années 1930, aujourd'hui, des cas de trypanosomiase humaine africaine (THA) sont encore signalés dans 20 pays dont 15 pays rapportant des cas de THA à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) et 6 pays des cas de THA à *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*). L'Ouganda est touché par les deux formes de la THA. Parmi les pays endémiques, la République Démocratique du Congo (RDC) porte le lourd fardeau avec 74 % des cas dus à *T. b. gambiense* (Figure 2) (WHO, 2019; Franco *et al.*, 2020).

Depuis le début des années 2000, la lutte contre la THA s'est réorganisée, avec une coordination entre l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les programmes nationaux de lutte contre la THA, les agences de financement, les partenaires industriels, la coopération bilatérale et les organisations non gouvernementales (WHO, 2013 ; WHO 2021). Cette coordination a amélioré le soutien des activités de lutte dans les pays endémiques avec une meilleure surveillance et un meilleur accès aux outils de diagnostic et aux traitements (Büscher *et al.*, 2017). Ce réinvestissement, couplé aux progrès du diagnostic et du traitement de l'infection, ont conduit à une forte baisse des cas de THA (Figure 3). En 2018, le nombre de cas de THA rapportés annuellement est tombé en dessous de 1 000 cas (WHO, 2018).

Sur la feuille de route de l'OMS pour les MTN publiée en 2012, la THA a été identifiée comme candidate à l'élimination en tant que problème de santé publique en 2020 (WHO, 2012). Cette candidature a été formalisée comme objectif en 2013, avec la définition d'élimination, comprenant deux indicateurs mondiaux: (1) moins de 2000 cas signalés par an et (2) réduction de 90 % de la zone à risque de déclarer plus d'un cas pour 10 000 personnes par an par rapport au niveau de référence de 2000-2004. La feuille de route a été mise à jour en 2020 et il est proposé d'inclure l'objectif de zéro cas de THA à *T. b. gambiense* déclaré d'ici 2030 (WHO, 2013 ; Franco *et al.*, 2017; WHO, 2019). Le premier indicateur qui est d'éliminer la maladie en tant que problème de santé publique a été atteint avant 2020 car 977 et 992 cas de THA ont été signalés à l'OMS respectivement en 2018 et 2019, bien en deçà de l'objectif de 2000 (Figure 3) (WHO, 2018 ; Franco *et al.*, 2020). Le deuxième indicateur est plus difficile à évaluer; toutefois 195 000 km² (période 2014-2018) de territoires rapportaient plus d'un cas pour 10 000 habitants par an, contre 709 000 km² (période 2000-2004), soit une réduction de 90% (Franco *et al.*, 2020).

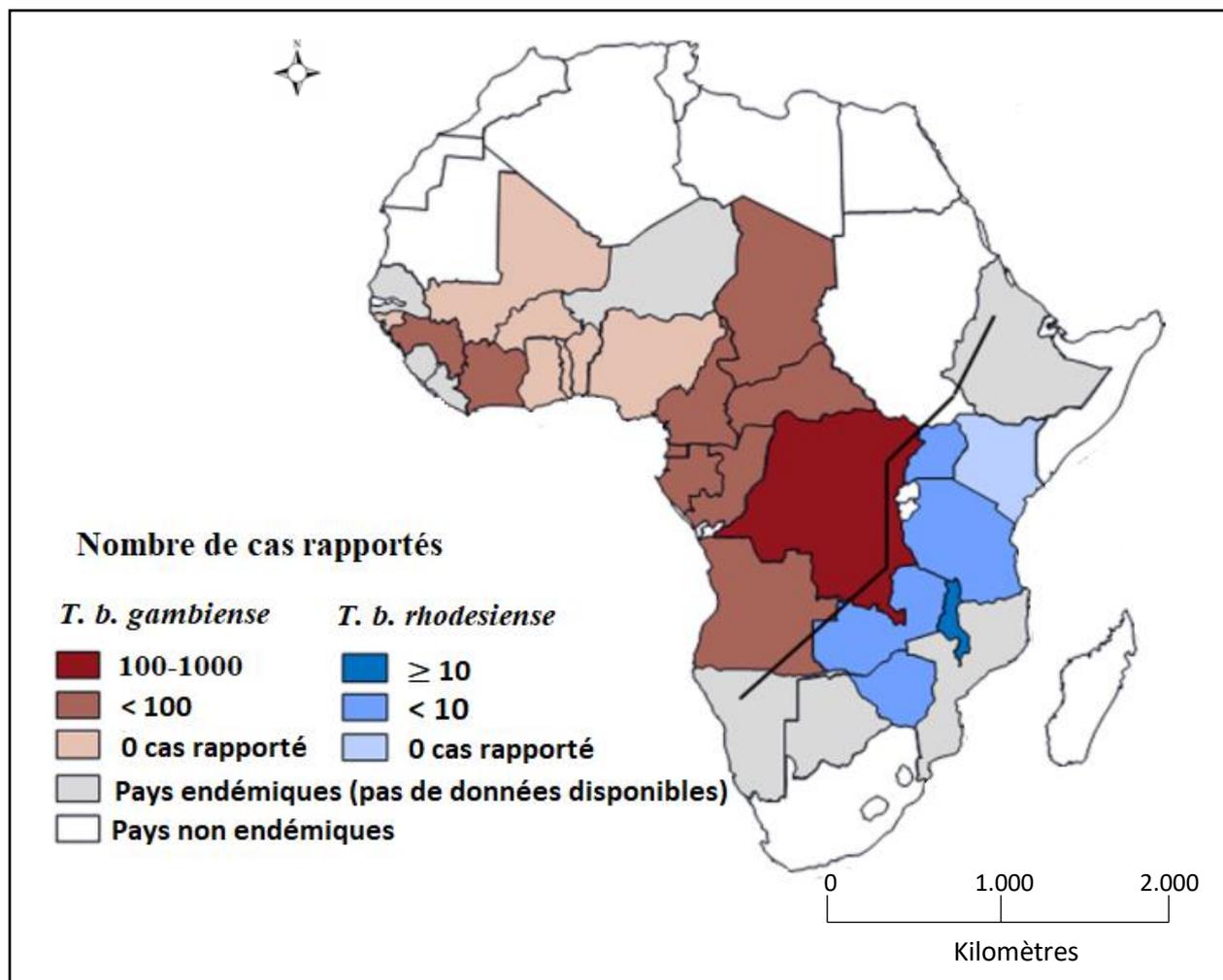


Figure 2: Distribution géographique de la trypanosomiase humaine africaine (THA)

Source: données WHO, 2019

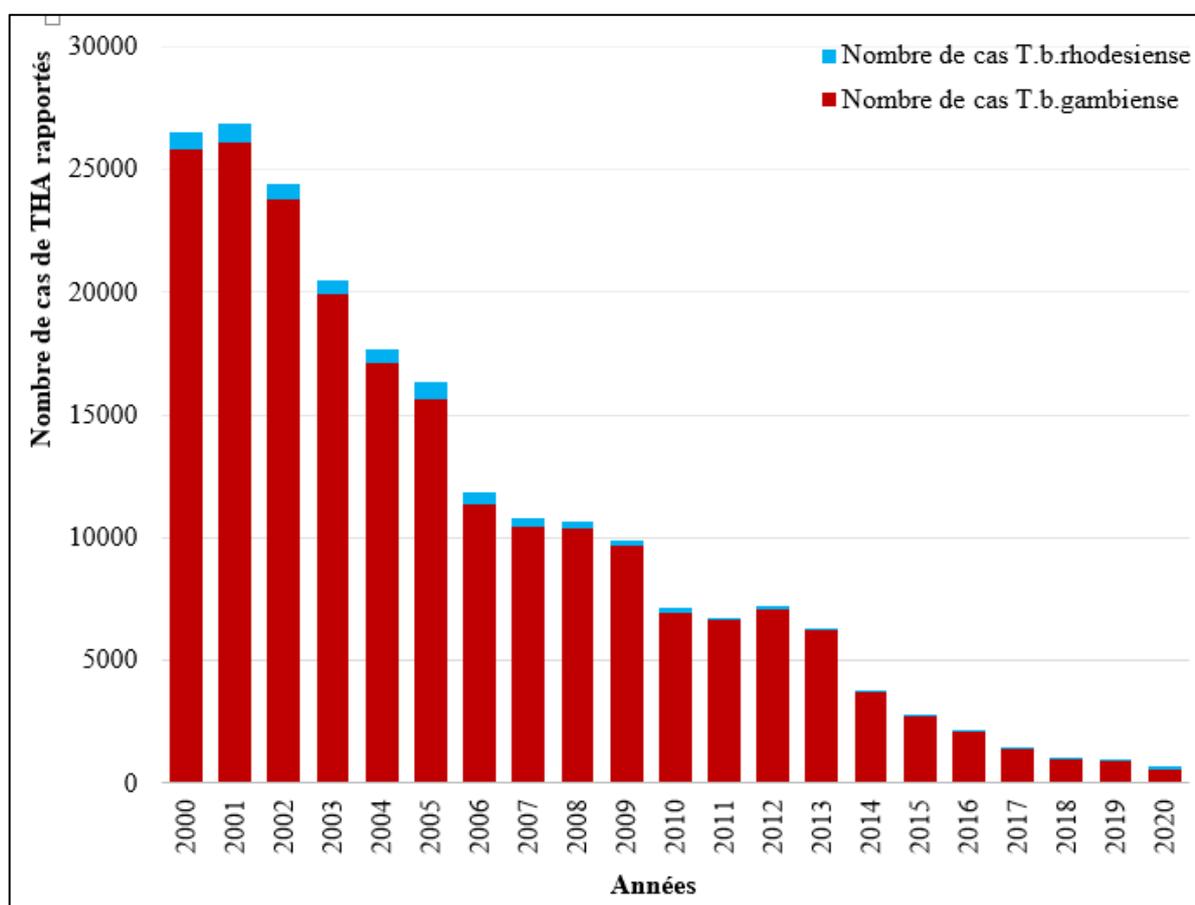


Figure 3: Nombre de cas de trypanosomiase humaine africaine (*gambiense et rhodesiense*) déclarés en Afrique de 2000 à 2020

Source : WHO, 2021

Ces tendances à la baisse reflètent un réel déclin de la transmission, plutôt qu'une simple sous-déclaration, car le nombre de personnes testées activement ne diminue pas et le nombre d'établissements de santé assurant la surveillance, le diagnostic et le traitement de la trypanosomiase humaine africaine (THA) est en augmentation (Franco *et al.*, 2020). Par ailleurs, la situation reste non homogène, car les efforts de contrôle et de surveillance de la THA à *T. b. gambiense* se sont affaiblis dans quelques pays comme la République Centrafricaine et le Soudan du Sud, principalement pour des raisons sécuritaires.

En Afrique de l'Ouest, la Côte d'Ivoire est actuellement le deuxième pays le plus touché par la THA après la Guinée avec deux foyers endémiques dans les zones forestières du Centre-Ouest (Kaba *et al.*, 2006 ; Koffi *et al.*, 2016). La prévalence de la THA a fortement chuté au cours de la dernière décennie (Figure 4) et seuls des cas sporadiques continuent d'être signalés dans un contexte de renforcement des activités de détection des cas (Franco *et al.*, 2020). Les populations rurales vivant du travail du binôme café-cacao et de l'agriculture de subsistance (banane, riz) sont les plus touchées.

Depuis longtemps, le contrôle de la THA s'appuie sur des institutions comme l'Institut Pierre Richet à Bouaké (IPR) et le Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase (PRCT) à Daloa, qui entre 2006 et 2016, était le seul centre de dépistage passif et de traitement du pays (Kambiré *et al.*, 2012 ; Koffi *et al.*, 2016). Ce système précaire n'offrait qu'un accès très limité au dépistage et aux soins spécialisés, en particulier dans les zones rurales où sévit principalement la THA (Simarro *et al.*, 2015).

Depuis 2007, le ministère de la santé et de l'hygiène publique (MSHP) a créé le programme national d'élimination de la trypanosomiase humaine africaine (PNETHA) avec pour mission de lutter contre la morbidité et réduire la mortalité due à la THA. Grâce au dynamisme de ce programme, appuyé par l'Institut National de Santé Publique (INSP) et d'autres structures partenaires de recherche, la lutte contre la THA est devenue pluridisciplinaire et repose sur le diagnostic, le traitement et la lutte anti-vectorielle.

Les activités de diagnostic sont basées sur le dépistage actif (exhaustif), le dépistage passif et le dépistage réactif et ciblé. La lutte anti-vectorielle est réalisée en parallèle avec les autres activités de lutte afin de réduire le contact homme-vecteur dans les zones de transmission.

Le PNETHA a décidé de renforcer le système de surveillance passive à partir de 2016, en déployant progressivement cette stratégie dans tous les foyers hypo-endémiques et à risque.

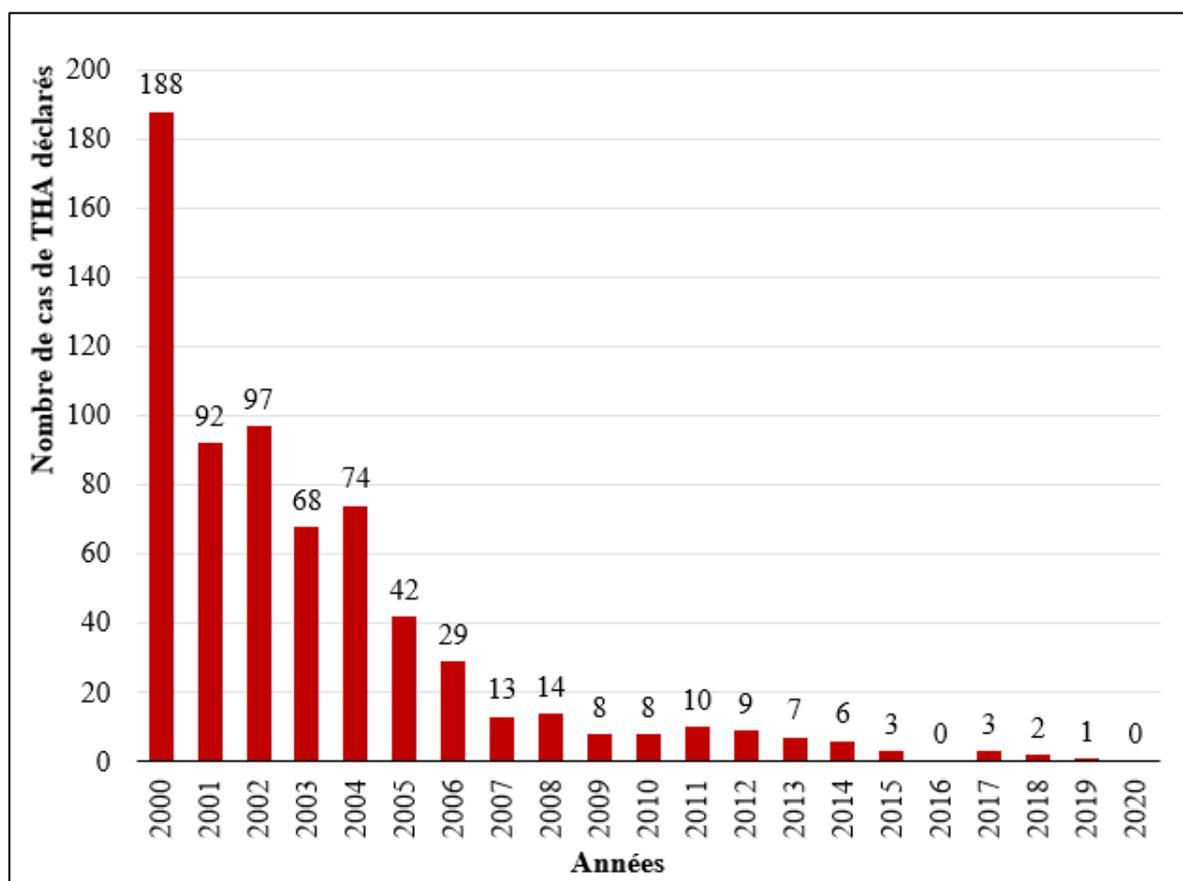


Figure 4: Nombre de cas de trypanosomiase humaine africaine (THA) déclarés en Côte d'Ivoire de 2000 à 2020

Source : WHO, 2021

Entre 2000 et 2019, 674 cas de trypanosomiase humaine africaine (THA) ont été dépistés (figure 4) grâce aux différentes stratégies de diagnostic. Pourtant, de 2015 à 2019, seulement 9 cas de THA ont été dépistés indiquant la baisse de la prévalence sur le plan national. Cette évolution du contexte épidémiologique a présenté la Côte d'Ivoire comme un pays ayant les caractéristiques d'éliminer la THA en tant que problème de santé publique (Franco *et al.*, 2020). La Côte d'Ivoire a donc franchit cette étape cruciale d'élimination de la THA en tant que problème de santé publique le 10 décembre 2020 (WHO, 2021), annoncée officiellement le 25 mars 2021 à Abidjan par le Ministre en charge de la Santé. Le critère de l'OMS pour valider l'élimination de la THA comme problème de santé publique a été d'atteindre moins d'un cas pour 10.000 habitants par an et par district sanitaire sur les cinq dernières années, dans un contexte d'activités de contrôle et de surveillance adéquate.

Le nouveau défi consiste désormais à maintenir le niveau de surveillance requis et, à parvenir à l'interruption de la transmission de la THA d'ici 2025. Toutefois, la maladie continue de se maintenir dans les foyers de Bonon et Sinfra à l'état résiduel avec un risque de réapparition dans le pays, car le vecteur est présent sur l'ensemble du territoire (Nekpeni *et al.*, 1989).

I.3. Identification du parasite

I.3.1. Trypanosomes: agents étiologiques

Pour Brault (1898), l'agent pathogène pourrait être "un protozoaire sanguicole dans le genre du "Trypanosome". Les trypanosomes étaient déjà connus puisque les premières descriptions remontent au début des années 1840, Valentin en 1841 le décrit chez la truite et Gruby en 1843, l'observe chez la grenouille. En 1901, Forde voit des "vermicules mobiles" dans le sang d'un capitaine de bateau faisant du trafic fluvial depuis 6 ans en Gambie (Forde, 1902). Dans la même année, Joseph Everett Dutton, examine le sang du patient et identifie l'agent pathogène qu'il décrit sous le nom de *Trypanosoma gambiense* (Dutton, 1902). En 1903, des trypanosomes sont retrouvés dans le sang de plusieurs Gambiens et la même année, Aldo Castellani met en évidence des trypanosomes dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), chez des malades sommeilleux en Ouganda. Désespérés par le fait que le parasite se trouve dans deux liquides biologiques différents, les chercheurs de cette époque ont conclu qu'il existe alors deux trypanosomes distincts. Pour eux, les trypanosomes se trouvant dans le sang sont peu pathogènes tandis que ceux présents dans le LCR et le système nerveux central sont les vrais

responsables de la maladie du sommeil. Grâce aux études menées par Bruce et Nabarro (1903a), ils comprennent que cette maladie évolue en deux périodes et que le trypanosome en est l'agent pathogène.

En 1908, en Afrique de l'Est, des cas de maladie du sommeil sont rapportés mais plus sévères avec une évolution plus courte et rapide vers la mort (Barrett *et al.*, 2003). Il est démontré, en 1912, que le trypanosome responsable de cette forme aiguë diffère de l'espèce découverte en Gambie. Ainsi, du fait de son origine géographique car découvert chez un patient de Rhodésie (l'actuel Zimbabwe), il fut baptisé *Trypanosoma rhodesiense* (Mulligan, 1970).

L'agent causal de la maladie est connu mais la principale préoccupation reste celle de sa transmission à l'homme. Bruce, en 1903, suspecte les glossines d'être les vecteurs de la maladie et en fournit la preuve expérimentale en transmettant des trypanosomes des malades à des animaux par l'intermédiaire de glossines sauvages nourries sur ces sommeilleux (Bruce D. et Nabarro D., 1903b). Quelque temps après, Roubaud et Bouet précisent l'évolution cyclique de chaque type de trypanosome à l'intérieur de la glossine, en 1913 (Roubaud et Bouet, 1913).

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés sanguicoles exoérythrocytaires. Ce sont des êtres vivants constitués d'une seule cellule munie d'un flagelle. Ils vivent dans le sang (extracellulaire), la lymphe et le liquide céphalo-rachidien (LCR). Le nom « *Trypanosoma* » a été donné par Gruby, après l'observation, en 1843, de ces hémoflagellés chez des grenouilles (Hoare, 1972). Il tire son étymologie des racines grecques «trypanon» qui signifie tarière, et «soma», corps, faisant référence aux mouvements et mode de déplacement du parasite.

Depuis la découverte de ces trypanosomes, une polémique au sujet de leur taxonomie existe mais nous retiendrons seulement l'hypothèse la plus courante, qui n'admet qu'une seule espèce *Trypanosoma brucei* (Plimmer et Bradford, 1899) se subdivisant en 3 sous espèces : *T. brucei brucei* (Plimmer et Bradford, 1899), pathogène pour les animaux mais pas du tout pour l'homme, et *T. brucei gambiense* (Dutton, 1902) et *T. brucei rhodesiense* (Stephens et Fantham, 1910), qui se discriminent de *T. brucei brucei* par leur pathogénicité pour l'homme.

I.3.2. Taxonomie

La systématique des trypanosomes de mammifères repose sur la localisation du développement des trypanosomes chez l'insecte vecteur et sur le mode de transmission des formes contaminantes à l'hôte vertébré (Wenyon, 1926; Hoare, 1972). Selon la classification

de Hoare revue par Levine *et al.* (1980) et Añez (1982), l'agent pathogène est un protozoaire du phylum *Sarcomastigophora* (Honigberg et Balamuth, 1963), de la classe *Zoomastigophorea* (Calkins, 1909), de l'ordre *Kinetoplastida* (Honigberg et Balamuth, 1963), de la famille *Trypanosomatidae* (Dörflein, 1901), du genre *Trypanosoma* (Grüby, 1843) (Figure 5). On distingue au sein de ce genre deux sections, la section des *Stercoraria* et celle des *Salivaria*, selon que le parasite a un cycle de développement postérograde ou antérograde.

La section des *stercoraria* a un développement postérograde avec un cycle de développement se déroulant entièrement dans le tractus digestif chez l'insecte vecteur et des formes matures infectantes transmises par les déjections contaminantes de l'insecte. La pénétration des trypanosomes se fait au niveau de la peau de l'hôte. La section comprend 3 sous-genres: les *Schizotrypanum* (*Trypanosoma cruzi*, agent de la Maladie de Chagas), les *Herpetosoma*, trypanosomes de reptiles et les *Megatrypanum*, trypanosomes des microchiroptères.

Les trypanosomes africains transmis par piqûre infectante des glossines appartiennent à la section des *Salivaria*, objets de cette étude. Ils ont un développement antérograde. Leur cycle de développement se déroule dans l'intestin et/ou dans la région buccale du vecteur (insecte hématophage) et s'achève dans les glandes salivaires. La transmission se fait par inoculation des formes infectantes lors de la piqûre de l'insecte. Cette section regroupe 5 sous-genres : *Tejeraia*, *Duttonella* (*Trypanosoma vivax*), *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*), *Pycnomonas* et *Trypanozoon*. Le sous-genre *Trypanozoon* (Lühe, 1906) regroupe 3 espèces : *T. brucei s.l.* (Dutton, 1902), *T. evansi* (Balbiani, 1888), et *T. equiperdum* (Dörflein, 1901). L'espèce *T. brucei s.l.* comprend trois sous-espèces génétiquement différentes (Gibson, 2007 ; Balmer *et al.*, 2011). Il s'agit de *T. brucei brucei* (Plimmer et Bradford, 1899), *T. brucei gambiense* (Dutton, 1902) et *T. brucei rhodesiense* (Stephens et Fantham, 1910).

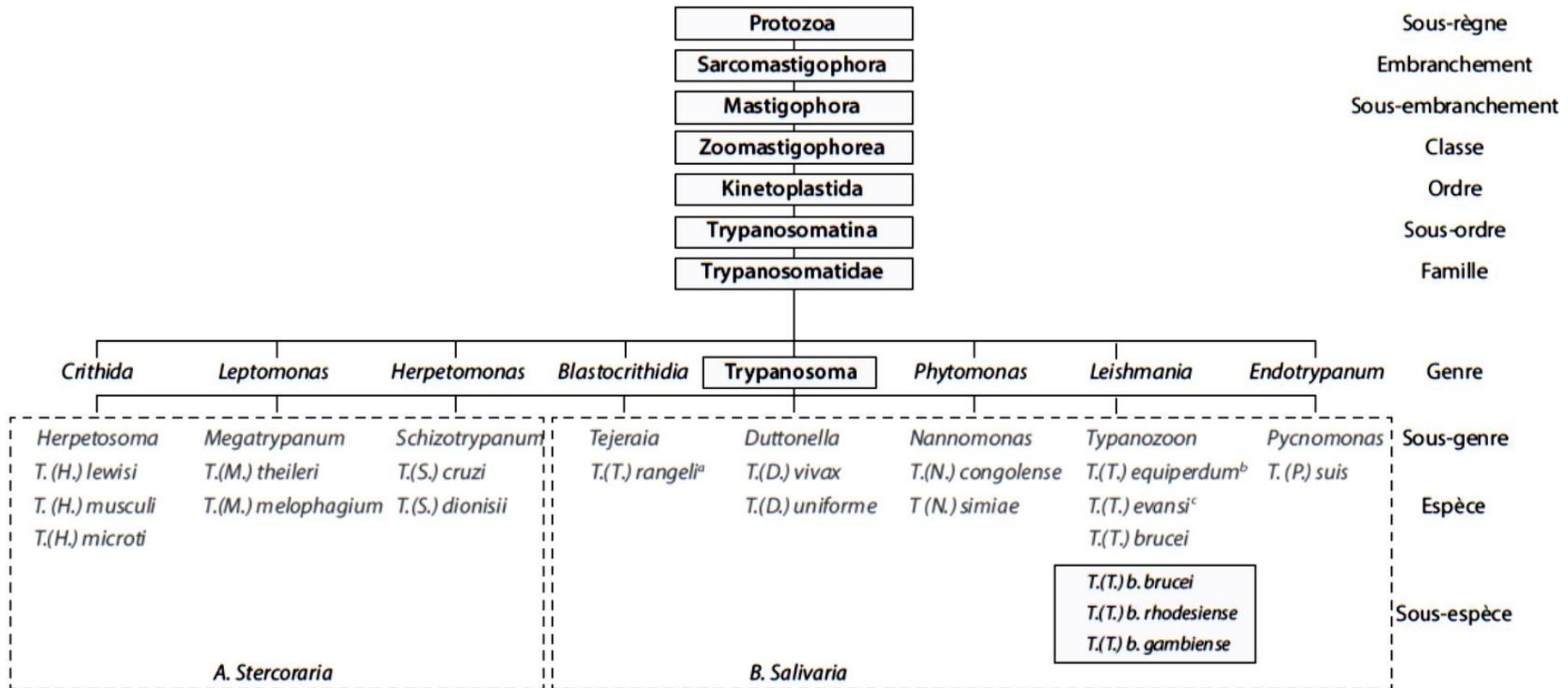


Figure 5: Classification des trypanosomes de mammifères

Source : (WHO, 2013)

I.3.3. Morphologie de *Trypanosoma brucei s.l.* et cycle parasitaire

Les trypanosomes ont un corps en forme de croissant très effilé dont la taille varie selon l'espèce de 12 à 42 μm de long et de 1,5 à 3,5 μm de large. Ce corps renferme un gros noyau central et des organites tels que la mitochondrie, l'appareil de Golgi, le flagelle, le corps basal et le kinétoplaste qui sont présents en exemplaire unique dans la cellule. Au voisinage du kinétoplaste, part un long filament, le flagelle, qui borde latéralement le corps cellulaire en déterminant la formation d'une membrane ondulante, et se prolonge à l'extrémité antérieure du parasite sur 6 à 7 μm (Figure 6). Le niveau de développement du flagelle permet de distinguer les stades d'évolution morphologique du parasite.

Dans le sang *T. brucei s.l.* peut se voir sous plusieurs formes :

- longue ou grêle dite « slender » dont la taille moyenne est de 23 à 30 μm mais qui peut dépasser 40 μm . Le parasite est muni d'un flagelle libre de 6 μm environ et d'une membrane ondulante bien développée. Le kinétoplaste est subterminal à plus de 4 μm de l'extrémité postérieure qui est allongée. Le noyau est ovale. Sous cette forme, le parasite peut se multiplier de façon active occasionnant des pics parasitaires (Johnson *et al.*, 2012).
- courte ou trapue, dite « stumpy », mesurant 12 à 26 μm , épaisse sans flagelle libre (ou faiblement marqué), avec un kinétoplaste plus terminal que dans la forme longue, une extrémité postérieure arrondie, un noyau arrondi et une membrane ondulante bien développée. Cette forme est prête pour être transmise à la mouche tsé-tsé, avec un mitochondrion mieux développé.

La proportion de ces différentes formes et des formes intermédiaires dans le sang est dépendante de la réponse immunologique de l'hôte. Toutes les formes sanguicoles du trypanosome sont regroupées sous le terme de « formes trypomastigotes ». Les trypanosomes, une fois inoculés chez l'hôte vertébré par la piqûre de l'insecte vecteur, se multiplient d'abord dans le collagène dermique et passent ensuite dans la circulation générale par voie sanguine ou lymphatique avec un séjour plus ou moins prolongé dans les nœuds lymphatiques. Après cette période lymphatico-sanguine qui peut durer de quelques semaines à plusieurs années (WHO, 2013), les trypanosomes finissent par envahir le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les centres nerveux (Brun *et al.*, 2010). Morphologiquement, *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* ne sont pas distinguables.

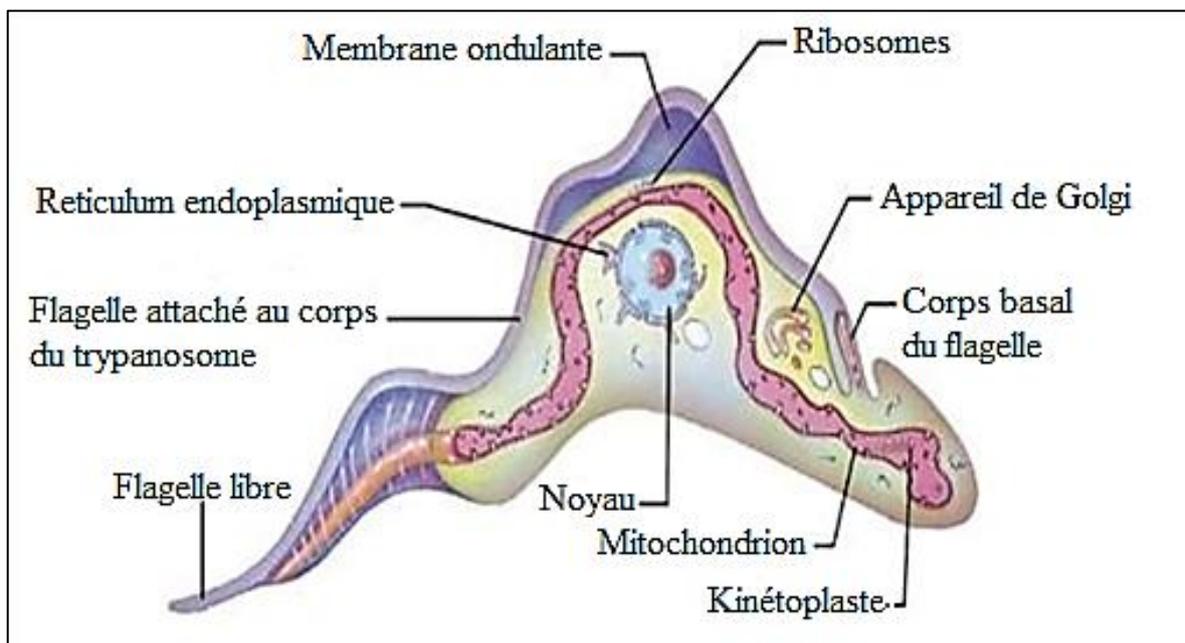


Figure 6: Morphologie de *Trypanosoma brucei sl.*

Source : Laveissière et Penchenier, 2005

Le cycle de *Trypanosoma brucei s.l.* se déroule dans le sang de l'hôte mammifère et chez le vecteur (Figure 7). La glossine ingère les formes trypomastigotes trapues au cours de son repas de sang sur un mammifère infecté. Dans l'intestin moyen de la glossine, les formes ingérées commencent par s'allonger et perdent leur manteau antigénique de surface (couche de glycoprotéines variables de surface située sur la partie externe de la membrane cellulaire du trypanosome et responsable de la variation antigénique) : c'est la « forme procyclique ». Cette dernière se caractérise par la présence d'un réseau extensif de tubes mitochondriaux et d'une membrane ondulante. Cette forme se multiplie, gagne le proventricule où elle se raccourcit et son kinétoplaste migre à l'arrière du noyau : c'est le stade épimastigote. Les épimastigotes poursuivent leur migration vers les glandes salivaires où ils se transforment en trypomastigotes métacycliques, formes infectantes transmises à l'hôte vertébré lors de la piqûre de l'insecte (Sharma *et al.*, 2009; Dyer *et al.*, 2013). A ce stade, le kinétoplaste se replace en avant du noyau et le trypanosome reconstitue son manteau antigénique de surface ce dernier le protégera contre l'attaque immunitaire de l'hôte mammifère chez lequel il retrouvera sa forme trypomastigote (MacGregor et Matthews, 2010). Le cycle complet du vecteur dure entre 18 et 35 jours et, une fois infectée, la mouche tsé-tsé le reste toute sa vie (Franco *et al.*, 2014).

I.3.4. Génome du parasite

Trypanosoma brucei est un organisme diploïde possédant un génome nucléaire et un génome mitochondrial (ou kinétoplastique). Les principaux chromosomes du noyau sont diploïdes ; mais le génome contient également de nombreux chromosomes de taille intermédiaire (300 à 900 kb) et de nombreux mini-chromosomes (50 à 100 kb) qui servent de répertoires de gènes de Glycoprotéines Variables de Surface (GVS ; en anglais VSG pour Variable Surface Glycoprotein). Cette architecture du génome pourrait jouer plusieurs rôles dans le développement des stratégies de survie, ce pour échapper aux réponses immunitaires de leurs hôtes (Laura *et al.*, 2018). Le génome des trypanosomes africains est aussi relativement plastique en ce sens que le nombre de copies géniques peut s'accroître ou se réduire à une fréquence relativement élevée (WHO, 2013).

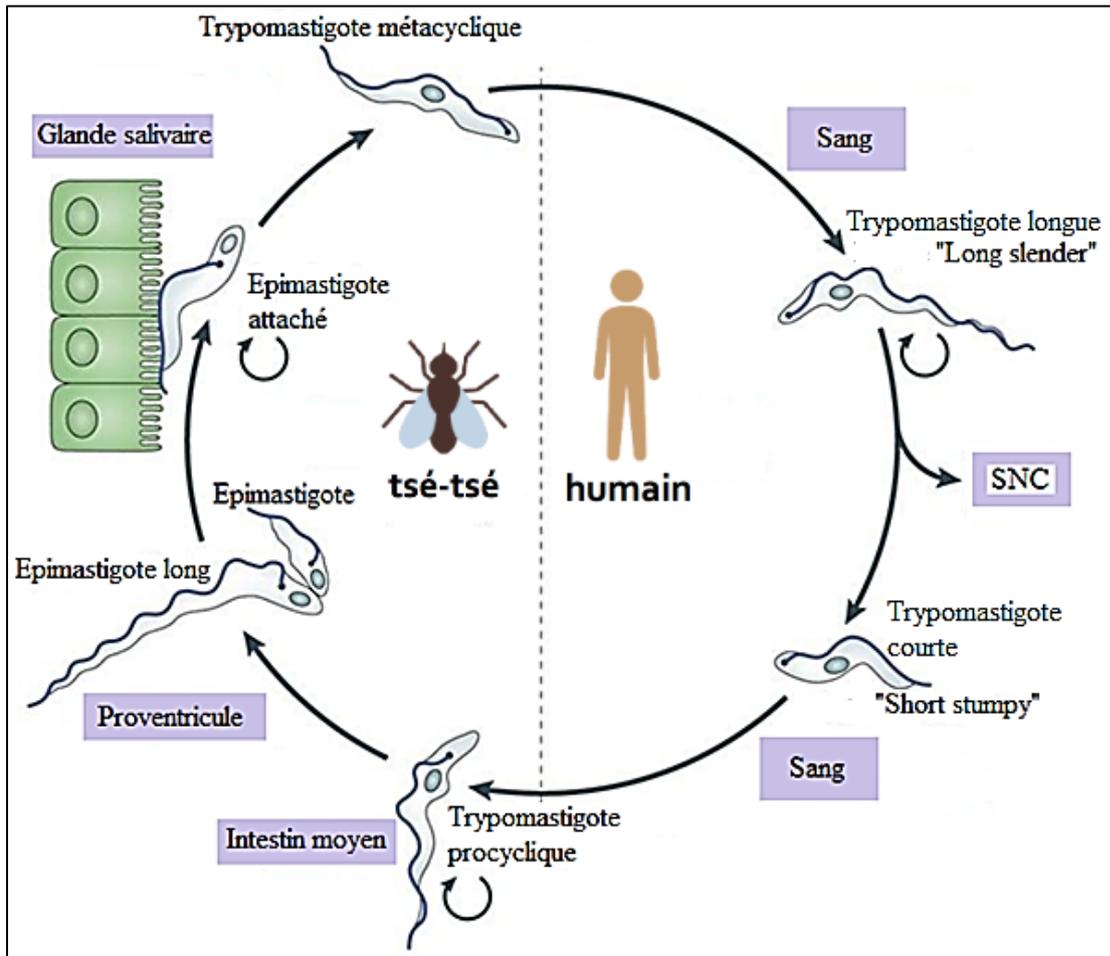


Figure 7: Cycle parasitaire de *Trypanosoma brucei s.l.*

Lors d'une piqûre par une glossine infectée, les formes métacycliques infectieuses sont injectées dans le sang de l'hôte où elles se différencient en formes sanguines « long slender ». Ces formes se multiplient dans le sang et la lymphe et pourront se différencier en « short stumpy ». Ces dernières seront ingérées par une mouche tsé-tsé lors de son repas sanguin et se différencieront dans son intestin moyen en formes trypomastigotes procycliques. Les procycliques vont ensuite se différencier en épimastigotes capables de proliférer. Ces derniers vont se différencier en métacycliques infectieuses dans les glandes salivaires.

Source : (Langousis et Hill, 2014), «Motility and more : the flagellum of *Trypanosoma brucei*»

I.3.4.1. Génome nucléaire

Le matériel génétique nucléaire de *Trypanosoma brucei s.l.*, d'environ 35 Mb par génome haploïde, est composé de plus d'une centaine de chromosomes classés en 3 groupes en fonction de leur taille : 11 grands chromosomes de 1 à 6 Mb, des chromosomes intermédiaires de 200 à 900 kb et une centaine de minichromosomes de 50 à 150 kb (Laura *et al.*, 2018 ; Ersfeld *et al.*, 1999).

Les 11 grands chromosomes dont le caryotype est essentiellement diploïde ont été entièrement séquencés en 2005 (Berriman *et al.*, 2005) et codent pour près de 10 000 gènes dont environ 900 pseudo-gènes et 1700 gènes spécifiques de *T. brucei*. Ces gènes sont présents dans la partie centrale des grands chromosomes alors que les régions sous-téломériques contiennent les sites d'expression des glycoprotéines variables de surface (GVS).

Chez les chromosomes intermédiaires, la ploïdie est méconnue et les régions sous-téломériques sont composées de répétitions de 177 kb (Wickstead *et al.*, 2004). Ils contiennent également des sites d'expression des GVS (Berriman *et al.*, 2005).

Les minichromosomes sont composés de séquences répétées de 177 kb à structure palindromique. Environ 65 gènes de GVS sont situés sur les mini-chromosomes (Cross *et al.*, 2014). On y retrouve des éléments sous-téломériques non répétés incluant des pseudogènes de GVS et il est supposé que ces minichromosomes servent au stockage des gènes de GVS inexprimés pour la variation antigénique (Wickstead *et al.*, 2004).

I.3.4.2. Génome mitochondrial : le kinétoplaste

L'ADN mitochondrial est contenu au sein d'une structure appelée kinétoplaste et représente 10 à 20 % de l'ADN cellulaire total. Cette structure est composée d'un amas de milliers de molécules d'ADN circulaires réparties en deux groupes : les minicercles et les maxicercles (Liu *et al.*, 2005 ; Jensen et Englund, 2012).

Les minicercles en très grand nombre, entre 5000 et 10000, ont une taille comprise entre 0,5 et 2,5 kb. Ils sont hautement variables au sein d'une espèce, voire d'une souche et codent pour de petits ARN guides (ARNg) qui servent de matrice pour le mécanisme de correction des ARN ou « RNA editing » (Stuart et Panigrahi, 2002). Les maxicercles de 20 à 40 kb dont le nombre est compris entre 30 et 50, codent pour des ARN ribosomiaux (ARNr) ainsi que pour les sous-unités du complexe respiratoire mitochondrial (Lin *et al.*, 2015).

I.3.5. Reproduction chez le parasite

La reproduction des trypanosomatidés est une question fondamentale pour l'interaction hôte-parasite. Son importance biologique réside dans le fait de savoir comment ces espèces acquièrent de nouveaux mécanismes de défense contre les ripostes imposées par l'hôte. Cette lutte s'apparente à la théorie de la course sans fin pour l'existence du sexe méiotique (Heitman, 2006). La façon dont ces espèces se reproduisent peut être à l'origine de clades nouveaux et plus virulents. Mais également, cette manière est pertinente d'un point de vue thérapeutique ou vaccinal. Car le sexe peut contribuer à une tolérance accrue et même à l'acquisition rapide de mécanismes de résistance aux médicaments (Gutiérrez *et al.*, 2021).

Suite à des approches de génétique de population appliquées à *Trypanosoma brucei s.l.*, Tibayrenc *et al.* (1990) ont d'abord proposé une structure de population largement clonale. Les progrès dans la compréhension de la nature sexuelle de ces organismes et de la dynamique de leur structure de population ont permis de découvrir que la reproduction et la recombinaison sexuelles ont conduit leur évolution, donnant naissance à des structures de populations clonales ponctuées de recombinaisons. Ainsi, le parasite peut se reproduire sexuellement via une exogamie ou une autofécondation (Heitman, 2006). Les rapports sexuels ne se produisent que dans les glandes salivaires de l'hôte vecteur (Gibson *et al.*, 2006). Les mécanismes de cette reproduction sexuée restent méconnus.

Toutefois, des études de population cadrent avec un degré élevé de clonalité chez *T. brucei s.l.* (Tibayrenc *et al.*, 1990 ; Tibayrenc et Ayala, 1991 ; MacLeod *et al.*, 2001 ; Koffi *et al.*, 2007). Cette théorie de clonalité indique que même si ces organismes ont conservé les mécanismes nécessaires à un cycle sexuel complet, l'impact sur la structure de la population reste limité. La sexualité intervient dans des conditions limitées dans lesquelles se produisent l'allogamie et l'autofécondation. Par ailleurs, Gibson et collaborateurs ont découvert que des souches génétiquement marqués subissent à la fois une allogamie et une autogamie, mais uniquement lorsque les deux souches génétiquement distincts sont présentes (Gibson, 1989). Ces résultats soutiennent l'hérédité mendélienne via la méiose avec un taux élevé de recombinaisons (Heitman, 2006). Ces processus sont difficiles à détecter car le sexe ne semble pas être une étape obligatoire de leur cycle de vie ; il n'y a pas de dimorphisme sexuel évident et parfois les formes compétentes pour l'accouplement sont confinées à une étape du cycle de vie (Gibson, 2021).

I.3.6. Mécanisme d'échappement du parasite au système immunitaire

Les trypanosomes africains sont des parasites dixènes obligatoires et extracellulaires. Ils circulent dans différents liquides biologiques chez leurs différents hôtes. Ainsi, ils sont entièrement exposés aux réponses immunitaires innées et adaptatives de ceux-ci et ont développé des stratégies particulières de survie. D'une part, le trypanosome change régulièrement de revêtement de surface en variant les épitopes antigéniques de son composant de surface majeur qui sont les glycoprotéines variables de surface (GVS). Ce changement régulier de GVS permet au trypanosome d'échapper en permanence aux anticorps de l'hôte (Pays *et al.*, 2014 ; Sima *et al.*, 2019). D'autre part, le trypanosome est capable de modifier le programme d'expression des cytokines par les macrophages et les lymphocytes ; ce qui amoindrit considérablement l'efficacité du système immunitaire (Darji *et al.*, 1992). Le mécanisme se fait par l'induction de la voie de l'arginase macrophagique (Gobert *et al.*, 2000).

I.3.6.1. Protéines de surface et variation antigénique

Le trypanosome dans le sang de l'hôte humain exprime les GVS qui couvrent de façon dense et homogène toute la surface du parasite et lui permettant d'échapper à l'immunité lors de l'infection de l'hôte (Pays et Berberof, 1995). Environ 10^7 molécules de GVS constituent ce manteau moléculaire visible au microscope électronique sous forme de couche dense de dimères de 12 à 15 nm situé au-dessus de la couche lipidique externe membranaire (Ferguson, 2000) (Figure 8a). Les GVS n'existent que chez les formes métacycliques et sanguicoles du parasite et sont très immunogènes. Leur taille est comprise entre 400 et 450 acides aminés insérés sous forme d'homodimère dans la membrane plasmique *via* une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Ferguson, 1999). La structure reste inchangée d'une GVS à l'autre et elles sont recyclées toutes les 12 minutes environ, ce qui permet d'internaliser et détruire les complexes GVS-anticorps et de redistribuer des GVS «libres» à la surface (Engstler *et al.*, 2004). A la surface des formes présentes chez l'insecte vecteur (excepté la forme métacyclique), on retrouve un manteau de procyclines (Figure 8b) assurant la protection du parasite contre l'environnement du tube digestif (Acosta-Serrano *et al.*, 2001 ; Hovel-Miner *et al.*, 2015) mais qui ne sont pas impliquées dans un phénomène de variation antigénique.

L'architecture des glycoprotéines variables de surface (GVS) leur permettent de fonctionner efficacement comme bouclier physique grâce à son recyclage doté d'un mécanisme

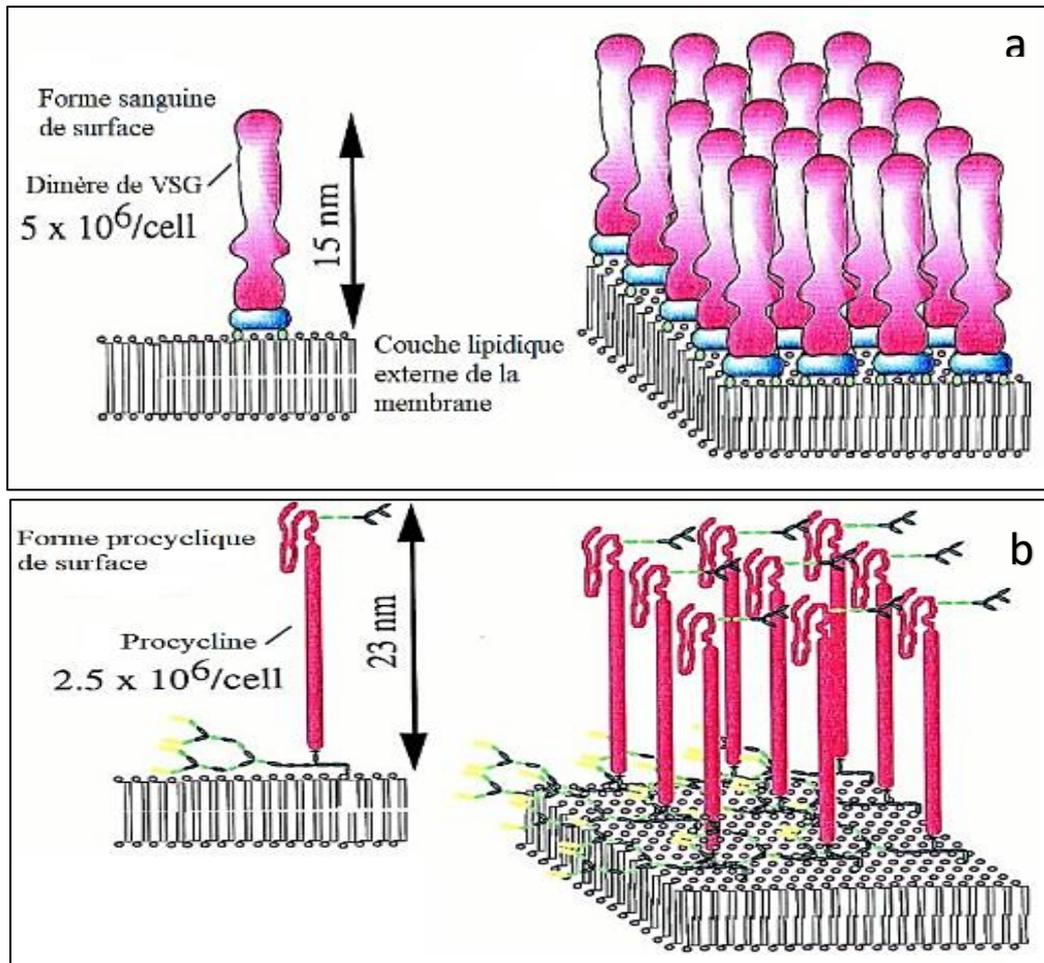


Figure 8: Antigènes de surface des trypanosomes *s.l.*

Représentation schématique des protéines de surface majoritaires, retrouvées à la surface du parasite. a: la glycoprotéine variable de surface (GVS) pour les formes sanguines; b: la procycline pour les formes procycliques. Ces protéines sont ancrées à la membrane par une ancre Glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Source : Ferguson, (2000), « Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness ».

permettant l'élimination rapide des anticorps de l'hôte de la surface du trypanosome. Cependant, ce processus n'est pas suffisant pour échapper au système immunitaire de l'hôte. C'est alors qu'intervient la variation antigénique (Horn, 2014 ; Taylor et Rudenko, 2006 ; Weirather *et al.*, 2012) (Figure 9). En effet, *T. brucei* possède un répertoire de plus de 1500 gènes et pseudo-gènes codant pour les GVS (Taylor et Rudenko, 2006 ; Weirather *et al.*, 2012) et peut donc changer le variant exprimé à sa surface grâce à des remaniements dans le génome.

Les antigènes variants ou VAT pour Variant Antigen Type sont portés par les GVS et un seul type de VAT est exprimé à la fois à la surface du parasite. On observe alors des pics de parasitémies qui sont corrélés avec l'apparition d'un nouveau variant à la surface des parasites. Il naît alors un mimétisme moléculaire entre les composants parasitaires et ceux du système nerveux central. C'est à cause de ce phénomène de variation antigénique que la création d'un vaccin est compromise. Par ailleurs, l'analyse globale du répertoire génomique des gènes des GVS, qu'elle soit totale ou partielle, a fourni des informations utiles. Cependant, la manière dont ce répertoire génomique est utilisé pendant une infection, ainsi que son mécanisme de corrélation avec les anticorps sont des questions importantes restant dans l'incertitude totale. Mais des approches à haut débit récemment développées pour examiner les GVS exprimées au cours d'une infection semblent très prometteuses pour répondre à ces questions (Mugnier *et al.*, 2015).

I.3.6.2. Résistance au sérum humain

Au début du 20^{ième} siècle, Laveran a signalé l'immunité naturelle de l'homme contre l'infection à *Trypanosoma brucei s.l.* (Laveran, 1902). Il a été constaté que les humains et les primates possédaient un système immunitaire particulier contre les trypanosomes africains et que seulement deux sous-espèces de *Trypanosoma brucei* (*T. b.*) *gambiense* et *rhodesiense* pouvaient résister à cette défense et provoquer la maladie du sommeil (Malvy et Chappuis, 2011 ; Pays *et al.*, 2014). De façon générale, cette immunité dépend de deux complexes sériques appelés facteurs trypanolytiques (TFL) pour Trypanosome Lytic Factor 1 et 2 (TLF-1 et TFL-2), qui contiennent tous deux une protéine apparentée à l'haptoglobine (HPR) et l'Apolipoprotéine L-1 (ApoL-1) une toxine trypanolytique dans le sérum humain normal (NHS) (Pays *et al.*, 2006 ; Vanhollenbeke et Pays, 2010 ; Verdi *et al.*, 2020).

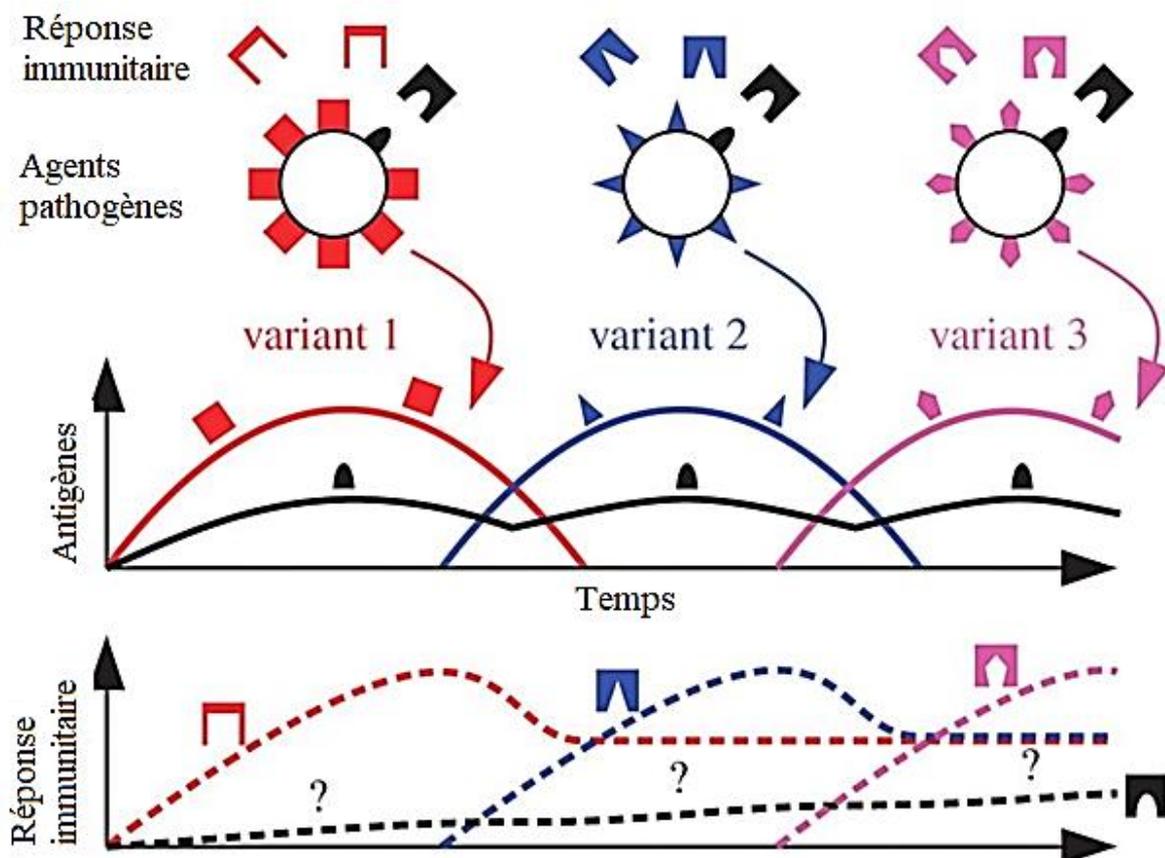


Figure 9: Variation antigénique

Lorsque l'hôte produit des anticorps dirigés contre la glycoprotéine variable de surface (GVS) exprimée (carré rouge) on observe une diminution de la parasitémie. Un nouveau variant est alors exprimé à la surface du parasite (triangle bleu). Un variant antigénique distinct, revêtant une GVS donnée (cône noir) chez les trypanosomes en forme trapue. Ce processus se répète sans cesse afin d'échapper au système immunitaire.

Source : Johnson *et al.*, 2012

Bien que les deux complexes semblent lyser les trypanosomes par le même mécanisme, ils pénètrent dans le parasite par divers modes d'absorption. Dans le cas de TLF-1, un processus d'absorption a été caractérisé et qui est facilité par la formation du complexe TLF1–Hpr–Hb dans l'assimilation de l'hème pour une croissance optimale du parasite (Widener *et al.*, 2007 ; Vanhollebeke *et al.*, 2008). L'entrée de TLF-2 implique la liaison de l'immunoglobuline M (IgM) non spécifique à la GVS (Verdi *et al.*, 2020 ; Pays *et al.*, 2014). Une fois les TLF entrés, l'ApoL-1 génère des pores dans la membrane lysosomale (Figure 10), ce qui entraîne l'entrée d'ions chlorure et d'eau du cytosol vers le lysosome et un phénomène d'osmose est mis en place conduisant à la lyse du parasite (Pays *et al.*, 2006; Vanhollebeke et Pays, 2010 ; Wheeler, 2010). Alors que Hpr est impliqué en tant que ligand de TLF, l'activité lytique est due à ApoL-1.

Cependant, *T. b. rhodesiense* possède une protéine de résistance au sérum humain (serum resistance-associated protein (SRA)) (Xong *et al.*, 1998; Vanhamme *et al.*, 2003 ; Lecordier *et al.*, 2009). Cette protéine est apparentée à une glycoprotéine variable de surface (GVS). La protéine interagit directement avec l'ApoL-1 en la neutralisant, ce qui permet la survie du parasite (Xong *et al.*, 1998) (Figure 10). Le gène SRA est nécessaire et suffisant pour la résistance contre le sérum humain (Xong *et al.*, 1998). Toutefois son expression par *T. b. rhodesiense* n'est pas un phénomène permanent car il pourrait perdre cette résistance contre le sérum humain en l'absence du facteur trypanolytique, par exemple après plusieurs passages chez des rongeurs (Van Meirvenne *et al.*, 1976).

Quant à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*), il exprime une glycoprotéine spécifique : TgsGp (*T. b. gambiense* specific glycoprotein) (Capewell *et al.*, 2013 ; Uzureau *et al.*, 2013) avec un mécanisme de résistance différent (Figure 10). En effet, la protéine TgsGP renforce les membranes lysosomales en interagissant avec les lipides, ce qui empêche l'incorporation de ApoL-1 dans ces dernières (Uzureau *et al.*, 2013). La TgsGP empêche la toxicité d'ApoL-1 dans un processus qui est associé à un raidissement des lipides membranaires, ce qui ne peut pas protéger le parasite contre un apport élevé d'ApoL-1 (Pays *et al.*, 2014).

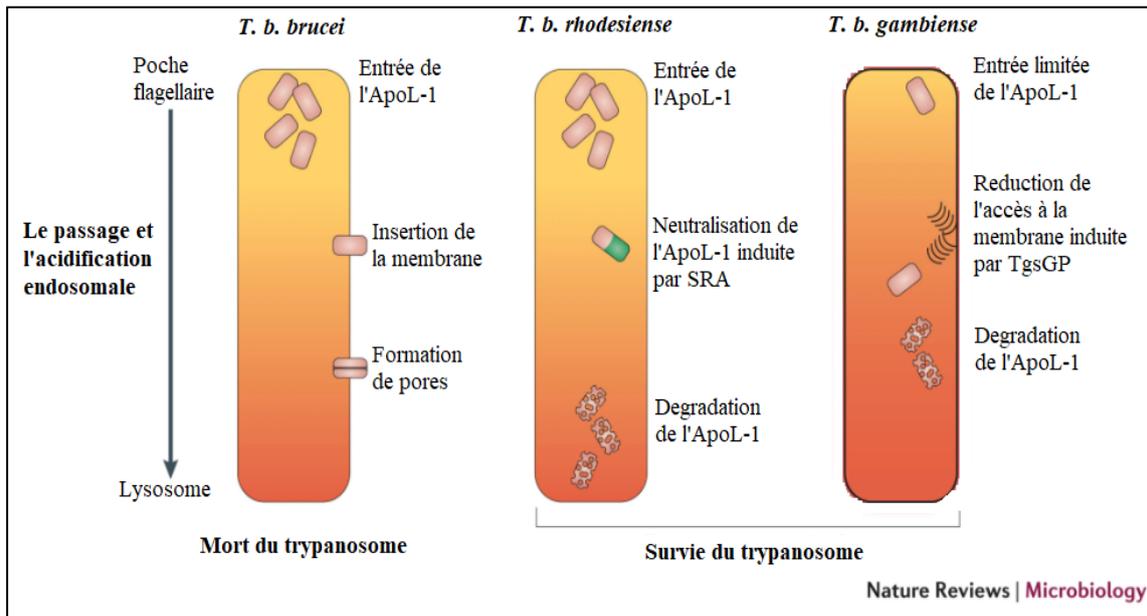


Figure 10: Passage différentiel d'ApoL-1 dans les trois sous-espèces de *Trypanosoma brucei*

Chez *Trypanosoma brucei brucei*, l'insertion de l'apolipoprotéine L1 (ApoL-1) dans les membranes endolysosomales permet à la protéine d'échapper à la dégradation par les protéases à cystéine et conduit à la destruction du parasite, en raison de la formation de pores anioniques dans ces membranes. Chez *Trypanosoma brucei rhodesiense*, la protéine associée à la résistance au sérum (SRA) dérivée de la glycoprotéine variable de surface (VSG) interagit avec ApoL-1 et empêche son insertion membranaire, ce qui conduit à la dégradation des deux protéines par les protéases à cystéine. Chez *Trypanosoma brucei gambiense*, la *T. b. gambiense*- glycoprotéine spécifique (TgsGP) empêche l'insertion d'ApoL-1 dans les membranes endolysosomales, en raison de sa capacité à rigidifier les membranes après interaction avec les lipides ; en outre, l'inactivation du récepteur de *T. brucei* pour l'haptoglobine-hémoglobine (TbHpHbR) par une substitution L210S réduit l'absorption d'ApoL-1, et un pH plus faible dans les endosomes précoces pourrait permettre une digestion plus rapide d'ApoL-1 par la protéase cystéine. Les cases représentent les compartiments endocytiques, et un dégradé de couleurs illustre l'acidification endosomale qui a lieu entre le début (c'est-à-dire la poche flagellaire) et la fin (c'est-à-dire le lysosome) de la voie endocyttaire

Source : Pays *et al.*, 2014

I.4. Diagnostic de la THA et prise en charge thérapeutique

La démarche diagnostique comprend deux grandes étapes. Le diagnostic de la maladie proprement dit et le diagnostic de phase, dont dépendent les choix thérapeutiques. Un traitement précoce est nécessaire car il permet d'interrompre le cycle de transmission de l'infection dont le réservoir semble être principalement humain.

I.4.1. Diagnostic de la maladie

De façon classique, la démarche diagnostique de la THA est fondée sur une suspicion clinique et/ou sérologique, suivie de la mise en évidence du parasite dans le sang, la lymphoganglionnaire et/ou le liquide céphalo-rachidien (LCR). Jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle les descriptions de la THA étaient purement cliniques et se résumaient exclusivement aux troubles neurologiques. Cependant, la symptomatologie clinique de cette maladie est peu spécifique (Jannin *et al.*, 1993 ; WHO, 2020), polymorphe et varie en fonction de l'espèce trypanosomienne et des réactions immunitaires de l'hôte (Büscher *et al.*, 2017). D'une manière générale, cette symptomatologie clinique évolue avec la progression de la maladie (Franco *et al.*, 2014). Dans certains cas, elle peut aussi passer longtemps inaperçue ou se manifester de façon spectaculaire (Jamonneau *et al.*, 2012) et les symptômes sont communs à plusieurs pathologies tropicales (Cattand *et al.*, 2001). De plus, Camara *et al.* (2005) ont montré une différence de fréquence des adénopathies cervicales entre les foyers de THA en Guinée et en Côte d'Ivoire. Ceci atteste une certaine variabilité des signes cliniques d'une zone d'endémie à une autre. Cette difficulté à élucider de façon succincte et spécifique les signes cliniques rend difficile le diagnostic de la THA (Jannin *et al.*, 1993). Pourtant, la démarche diagnostique doit être simple pour permettre l'intégration des activités liées à la THA dans les infrastructures sanitaires reculées et publiques. Le diagnostic est basé sur des tests pratiqués lors d'un dépistage actif ou passif et commence généralement par des tests sérologiques suivis des techniques parasitologiques pour mettre en évidence le parasite, une étape nécessaire pour initier un traitement (WHO, 2013). Il existe plusieurs tests de diagnostic de la THA, mais ceux décrits ici sont les plus couramment utilisés et notamment ceux qui l'ont été dans le cadre de cette étude.

I.4.1.1. Tests sérologiques

Il s'agit des tests indirects qui détectent les anticorps 3 à 4 semaines après l'infection permettant d'identifier les sujets susceptibles d'être infectés (WHO, 2013). L'identification des

.....

suspects sérologiques est le principal point d'entrée dans les algorithmes de diagnostic de la THA gambienne (Lumbala *et al.*, 2018). Le diagnostic sérologique doit être considéré comme une preuve indirecte de la trypanosomiase et doit être suivi de techniques parasitologiques pour confirmer l'infection (Lejon *et al.*, 2013).

✓ **Card Agglutination Test for human Trypanosomiasis**

Connu sous le nom de test d'agglutination sur carte pour la trypanosomiase humaine africaine (THA) gambienne (CATT/ *T. b. gambiense*) (Magnus *et al.*, 1978), le CATT/ *T. b. gambiense* est un test sérologique pour le diagnostic de la THA basé sur une souche lyophilisée de *T. b. gambiense* exprimant la glycoprotéine variable de surface (GVS) LiTat 1.3 à la surface des parasites. Le test consiste à la détection dans le sang total, le plasma ou le sérum, de la présence d'un anticorps dirigé contre la GVS LiTat 1.3. Ces anticorps contre LiTat 1.3 sont les plus fréquemment détectés chez les patients parasités par *T. b. gambiense* (Van Meirvenne *et al.*, 1995). La production en masse des trypanosomes exprimant la GVS LiTat 1.3 se fait en cultivant les parasites chez des rongeurs de laboratoire et les parasites sont extraient du sang (Van Nieuwenhove *et al.*, 2011). Les parasites récoltés exprimant la GVS LiTat 1.3 sont fixés, colorés avec du bleu de coomassie avant d'être lyophilisés (Chappuis *et al.*, 2005). Pour la mise en œuvre du test, le sang et le réactif antigénique en suspension dans du tampon phosphate salin sont mélangés sur une carte; le mélange est homogénéisé à 60 rpm pendant 5 minutes à l'aide d'un agitateur et le résultat est analysé par observation macroscopique. En cas d'agglutination observée, le test est positif. Il a été le test sérologique le plus utilisé pour le diagnostic indirecte de la THA, notamment dans le cadre des vastes campagnes de dépistage actif de masse (WHO, 2013 ; Büscher *et al.*, 2017). Mais, bien qu'il ait eu un rôle prépondérant pour juguler la THA, le test d'agglutination sur carte pour la THA (CATT) a des limites (Simarro *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2000). Il est inadapté dans certaines conditions et notamment dans la surveillance passive (Lumbala *et al.*, 2018 ; Simarro *et al.*, 2012). Dans les centres de santé, la durée de conservation limitée du réactif du test d'agglutination sur carte pour la trypanosomiase (CATT) reconstitué à température ambiante (un jour seulement) entraîne une perte considérable du réactif lorsque peu de tests sont effectués par jour. Une autre limitation du CATT est le besoin d'un agitateur et d'une chaîne de froid et donc d'électricité, qui ne sont pas toujours disponibles dans les centres de santé ruraux (Hasker *et al.*, 2011; Jamonneau *et al.*, 2015 ; Mitashi *et al.*, 2015 ; Bisser *et*

.....

al., 2016). Le CATT/*T. b. gambiense* peut donner des réactions croisées avec des trypanosomes des animaux et la prévalence de la séropositivité au CATT n'est pas corrélée à la prévalence de la THA (Jamonneau *et al.*, 2010). De plus, des variations de sensibilité et de spécificité ont été observées à l'échelle de pays et de foyers de la maladie (Louis *et al.*, 2001 ; Truc *et al.*, 2002).

✓ Tests individuels de diagnostic rapide

Les Tests individuels de Diagnostic Rapide (TDR) sont des tests immunochromatographiques de détection qualitative des anticorps des isotypes (IgG, IgA et IgM) de *T. b. gambiense* dans le sang total, le sérum ou le plasma. Ces tests de diagnostic sérologique ont été développés afin de combler les lacunes du CATT et notamment pour la surveillance passive dans les centres de santé (Lumbala *et al.*, 2018). Les TDR ont été évalués avec des résultats de performance très prometteurs (Büscher *et al.*, 2013 ; Sternberg *et al.*, 2014) et ils sont maintenant introduits dans des algorithmes diagnostiques de plusieurs pays d'endémie de la THA, où ils sont utilisés dans les programmes d'élimination (Lumbala *et al.*, 2018). Les TDR peuvent se présenter sous la forme d'une cassette en plastique ou d'une tigette nue non contenue dans une cassette (Figure 11). La production de ces TDR nécessite des antigènes natifs ou recombinants. Le test SD Bioline HAT, développé par Abbott Diagnostics (Corée du Sud), a une bande de membrane de nitrocellulose avec deux zones (T1 et T2) qui sont pré-revêtues de deux glycoprotéines variables de surface (GVS) natifs de *Trypanosoma brucei gambiense* (GVS LiTat 1.3 et GVS LiTat 1.5) (Sternberg *et al.*, 2014 ; Lumbala *et al.*, 2018). Les tests fabriqués par Coris BioConcept en Belgique à savoir HAT Sero-K-Set (test de première génération) et rHAT Sero-Strip (test de deuxième génération) présentent une seule zone de test. Le test HAT Sero-K-Set est revêtu d'un mélange de GVS LiTat 1.3 et de LiTat 1.5 natifs (Büscher *et al.*, 2014; Jamonneau *et al.*, 2015).

Le test de 2^{ième} génération, le rHAT Sero-Strip, est un test en forme de bandelette et constitué d'une ligne de test simple revêtue d'un mélange de glycoprotéine de surface invariante 65 (Invariant Surface Glycoprotein 65 (ISG 65)) produit dans des *Leishmania tarentolae* recombinant et GVS LiTat 1.5 recombinant produit en *Escherichia coli* (Büscher *et al.*, 2013). La réaction de ce test a lieu dans un tube à essai inclus dans le kit de test. Une ligne de contrôle de procédure (C) est présente sur chacun des tests dont son apparition au cours du test permet de valider le résultat du test. Ces tests sont stables pendant au moins 24 mois à 40°C.



TDR HAT Sero-K-Set (1^{ère} génération de Coris BioConcept, Belgique)



TDR rHAT Sero-Strip (2^{ème} génération de Coris BioConcept, Belgique)



TDR SD Bioline HAT 1.0 (1^{ère} génération d'Abbott Diagnostics, Corée du Sud)

Figure 11: Trois formats de tests de diagnostic rapide (TDR) de la THA

Tous ces tests possèdent le même mode d'action. Une fois que le sang ainsi que la solution tampon sont déposés dans la fenêtre de dépôt, le mélange peut s'écouler à travers la membrane de la bandelette réactive. Les anticorps spécifiques anti-*T. b. gambiense* présents dans l'échantillon interagissent avec les antigènes (GVS LiTat 1.3 et/ou GVS LiTat 1.5) porteurs de particules d'or et il y a formation d'un complexe anticorps-antigène-particule d'or. Les complexes formés migrent vers les lignes de test (par exemple avec le SD Bioline HAT : ligne 1 pour GVS LiTat 1.3 et ligne 2 pour GVS LiTat 1.5). Si des anticorps spécifiques anti-*T. b. gambiense* sont présents dans l'échantillon, les complexes correspondants se lient spécifiquement à la ligne de test correspondante car ces complexes sont stoppés par l'anticorps spécifique immobilisé. Les particules d'or assurent la coloration visible de la ligne de test. Une fois l'ensemble de la procédure terminé, le résultat du test peut être lu dans un délai de 15 à 20 minutes. Le test est positif si les lignes de contrôle et de test se sont formées. Le test ne doit pas être lu après 20 minutes, car cela peut entraîner des résultats erronés. Les TDR sont généralement effectués sur du sang frais collecté à partir d'une ponction digitale avec une micro-lancette.

✓ **ELISA/*T. b. gambiense***

Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) (Voller *et al.*, 1975 ; Liu *et al.*, 1989) est un test immuno-enzymatique qui démontre indirectement la présence du parasite dans les fluides corporels. Contrairement aux autres tests immunologiques, l'ELISA utilise des marqueurs pour permettre la détection ou la visualisation des complexes antigène-anticorps.

Le test est utilisé dans le sérodiagnostic de la trypanosomiase humaine africaine (THA) pour détecter les anticorps spécifiques anti-trypanosomes dans le sérum et le LCR (Büscher *et al.*, 1995 ; Lejon *et al.*, 1998) ou dans la salive (Lejon *et al.*, 2003 ; Lejon *et al.*, 2006). Aussi, l'ELISA peut être réalisé sur des échantillons de plasma ou de sang séché sur du papier filtre (Hasker *et al.*, 2010 ; Luz *et al.*, 2021). Le test a également trouvé une application dans la stadification de la THA, car les anticorps spécifiques anti-trypanosomes ou l'immunoglobuline IgM cérébrospinale sont élevés dans le LCR pendant l'infection (Greenwood et Whittle, 1973 ; Whittle *et al.*, 1977 ; Lejon *et al.*, 2002). Une technique a été proposée pour l'espèce *T. b. gambiense* avec la combinaison d'antigène de GVS LiTat 1.3 et 1.5 (Van Nieuwenhove *et al.*, 2011). Le sang ou les sérums dilués des sujets à tester sont mis en présence d'antigènes

trypanosomiens sur une microplaque. Un conjugué couplé à une enzyme permet de révéler la réaction, la lecture se faisant visuellement ou par mesure de la densité optique au spectrophotomètre. Une sensibilité comprise entre 82,8 % et 96,9 % a été rapportée sur des échantillons de sang séché sur du papier filtre (Hasker *et al.*, 2010). Cependant, ce test souffre de sensibilités variables, et sa réalisation requiert une expertise et de l'équipement d'un laboratoire de référence.

✓ Test de trypanolyse

La trypanolyse (TL) (Van Meirvenne *et al.*, 1995) est un test sérologique à médiation complément-anticorps des trypanosomes. Ce test est utilisé pour confirmer la présence d'anticorps spécifiques de *T. b. gambiense* dans un échantillon de sang ou de plasma (Jamonneau *et al.*, 2010 ; Dama *et al.*, 2019). A base d'antigènes dérivés de populations clonées de trypanosomes vivants exprimant spécifiquement les GVS LiTat 1.3 ou LiTat 1.5 (décrits comme étant spécifiques de *T. b. gambiense*) et LiTat 1.6 (aussi exprimé chez *T. brucei s.l.*), la TL révèle un contact avec le parasite (Camara *et al.*, 2014 ; Jamonneau *et al.*, 2015 ; Koffi *et al.*, 2016).

La forme sanguine du parasite est revêtue de glycoprotéine variable de surface (GVS) hautement immunogènes suscitant une réponse immunitaire de l'hôte d'où la production d'anticorps spécifiques aux antigènes variants (VAT) du parasite. Ces anticorps sont capables d'opsoniser, d'agglutiner et de lyser les trypanosomes circulants (Van Meirvenne *et al.*, 1995). Le test consiste en une suspension dans du sérum de cobaye riche en complément de trypanosomes sanguins clonés, exprimant tous le même VAT, incubée à 37°C avec un sérum test. Lorsque les anticorps se lient aux épitopes spécifiques du VAT à la surface du trypanosome, les cellules sont lysées. Le mélange réactionnel est examiné sous un microscope à contraste de phase (Jamonneau *et al.*, 2010).

La trypanolyse tout comme l'ELISA *T. b. gambiense* reste un potentiel important pour la surveillance post-élimination pour surveiller la résurgence et pour la surveillance exploratoire dans les foyers historiques (Luz *et al.*, 2021). Bien que hautement spécifique, la trypanolyse présente un certain nombre d'inconvénients. Le test reste trop complexe pour être utilisé dans des laboratoires de niveau intermédiaire ce qui le rend difficilement disponible. Dans le monde, seuls quatre laboratoires spécialisés sont capables d'effectuer la trypanolyse. Il s'agit des

laboratoires du CIRDES de Bobo-Dioulasso (Burkina-Faso), de l'IRNB de Kinshasa en RDC, de l'IMT d'Anvers (Belgique) et de l'IPR de Bouaké en Côte d'Ivoire. De plus, la trypanolyse a un faible débit et il est coûteux (Luz *et al.*, 2021) et surtout, il faut maintenir des clones de populations de trypanosomes exprimant les VAT en azote liquide et les cultiver *in vivo* avec des risques d'exposition conséquents pour les manipulateurs (Jamonneau *et al.*, 2010).

Comme ni les signes et symptômes cliniques, ni les examens sérologiques ne sont spécifiques à 100 %, une confirmation parasitologique par la mise en évidence de trypanosomes dans les liquides de l'organisme est généralement nécessaire pour confirmer le diagnostic.

I.4.1.2. Tests parasitologiques

La recherche au microscope du parasite a toujours été la principale voie pour le diagnostic de certitude de la trypanosomiase humaine africaine (THA). Le seul moyen de confirmer si un suspect clinique ou sérologique est effectivement trypanosomé consiste à rechercher le parasite dans les différents liquides de l'organisme: le sang, la lymphe (dans les ganglions) et le LCR. Cette preuve tangible de l'infection est indispensable avant d'initier un traitement toxique et contraignant. Plusieurs tests parasitologiques comme l'examen microscopique du suc ganglionnaire en cas de présence d'adénopathies cervicales, la technique de centrifugation sur mini-colonne échangeuse d'anions (en anglais miniature Anion-Exchange Centrifugation Technique (mAECT)) (Lanham et Godfrey, 1970 ; Lumsden *et al.*, 1977), la centrifugation en tube capillaire (CTC) (Woo, 1970), la double centrifugation du LCR (Cattand *et al.*, 1988) ou la simple centrifugation modifiée du LCR (Miezan *et al.*, 2000), sont actuellement utilisés. Le gold standard du diagnostic de la THA recommandé par l'OMS est la démonstration de la présence de parasites dans les fluides corporels, une méthode qui souffre d'une faible sensibilité. On estime que jusqu'à 20 à 30 % des patients ne sont pas détectés par les différents tests parasitologiques utilisés (Robays *et al.*, 2004 ; Chappius *et al.*, 2005).

La technique la plus sensible et recommandée par l'OMS, la mAECT, consiste à faire passer 350 à 500 μ L de sang sur une colonne garnie de diéthylaminoéthylcellulose (DEAE). Entre un pH de 6 à 9, la surface du trypanosome est moins chargée négativement que celle des cellules sanguines. Lorsque le sang est versé dans la colonne, les cellules sanguines sont retenues sur le gel tandis que les parasites traversent le gel avec le tampon d'éluat et l'éluat contenant les trypanosomes est recueilli dans un tube. Les trypanosomes sont concentrés dans

le fond du tube suite à une centrifugation à faible vitesse (3000 rpm pendant 15 min). L'extrémité du tube de verre est ensuite examinée au microscope (X200) pour détecter la présence de parasites. Le résultat est une suspension pure de trypanosomes qui conservent leur morphologie, leur mobilité et leur infectiosité (Büscher *et al.*, 2009 ; Lejon *et al.*, 2019).

La sensibilité analytique de la mAECT est inférieure à 50 parasites par mL mais grâce à plusieurs modifications, la sensibilité de cette technique a été augmentée (Mumba *et al.*, 2014). Jusqu'à présent, les performances diagnostiques supérieures de la mAECT par rapport à toutes les autres techniques disponibles pour la détection des trypanosomes dans le sang ont été confirmées (Lutumba *et al.*, 2006 ; Mumba *et al.*, 2014 ; Lumbala *et al.*, 2018).

Malheureusement, la mAECT présente également certains inconvénients, notamment son prix (Lutumba *et al.*, 2006). La technique implique des manipulations fastidieuses et nécessite une source de courant, une centrifugeuse et un microscope. Elle ne peut être effectuée que par du personnel qualifié et prend du temps (Lejon *et al.*, 2019).

I.4.1.3. Tests moléculaires

L'essor de la biologie moléculaire a permis de développer de nouvelles techniques fondées sur l'identification des acides nucléiques du trypanosome. La première technique utilisée dans le diagnostic de la THA a été l'hybridation en 1997 et elle a été rapidement suivie par l'amplification en chaîne par polymérase (en anglais polymerase chain reaction (PCR)) (Singh, 1997; Kabiri *et al.*, 1999 ; Desquesnes et Davila, 2002 ; Gibson, 2002 ; Radwanska *et al.*, 2002a ; Radwanska *et al.*, 2002b ; Adams et Hamilton, 2008 ; Gibson, 2009). L'évolution rapide dans le domaine de la biotechnologie a permis le développement de nombreuses méthodes de diagnostic moléculaires avec différentes cibles recherchées (Deborggraeve et Büscher, 2012 ; Büscher et Deborggraeve, 2015). Plusieurs tests de PCR conventionnels ont été développés pour la détection des trypanosomes dans le sang (Kanmogne *et al.*, 1996; Kabiri *et al.*, 1999; Truc *et al.*, 1999 ; Kyambadde *et al.*, 2000; Penchenier *et al.*, 2000; Radwanska *et al.*, 2002b ; Zulantay *et al.*, 2004).

Les tests moléculaires se sont avérés être des méthodes très sensibles et spécifiques pour le diagnostic de la maladie du sommeil. Cependant, les tests de PCR conventionnels sont techniquement lourds et sont sujets à la contamination des produits PCR (Kuboki *et al.*, 2003 ; Njiru *et al.*, 2008). De plus, la présence de ces molécules ne constitue pas en soi la preuve d'une

infection active (une infection active est définie par la présence de trypanosomes vivants au moment du prélèvement) et les tests moléculaires sont considérés comme étant des méthodes indirectes.

Au cours des travaux de cette thèse, deux de ces méthodes moléculaires ont été utilisées à savoir la qPCR en temps réel (en anglais Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction) (qPCR) et l'amplification isotherme médiée par les boucles (en anglais Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)).

a) qPCR en temps réel

Ces dernières années, la technologie de la PCR en temps réel (qPCR) s'est considérablement développée et devient de plus en plus utilisée dans le domaine du diagnostic. La qPCR est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent et elle mesure l'accumulation de produit PCR à l'aide d'une sonde fluorogène (Heid *et al.*, 1996; Poitras et Houde, 2002; Tichopad *et al.*, 2003). Le signal fluorescent augmente de façon proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Yashu *et al.*, 2020). L'observation de la quantité de fluorescence émise à chaque cycle permet de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est corrélée avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template) (Higuchi *et al.*, 1993; Tellinghuisen et Spiess, 2014). Contrairement à d'autres méthodes de PCR quantitatives, la PCR en temps réel ne nécessite pas de manipulation d'échantillons post-PCR car le processus complet est automatisé du début jusqu'à la fin, ce qui empêche une contamination potentielle des produits de PCR. La technique est intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle ou haut débit (high-throughput) (Yashu *et al.*, 2020).

Cette technique a été appliquée au diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine (THA) et une sensibilité analytique de 100 trypanosomes/mL soit 0,1 équivalent génomique par réaction a été obtenue (Becker *et al.*, 2004). Compaoré *et al.* (2020a) ont obtenu dans une étude expérimentale sur des échantillons de sang séché sur papier filtre, une sensibilité analytique de la qPCR 18S en temps réel de 100 trypanosomes/mL et de la qPCR TgsGp, 10⁴ parasites/ mL.

Bien que la qPCR permet d'identifier les agents pathogènes présents dans les échantillons de sang humain et de les quantifier en une seule étape, elle présente des limites. En

effet, seules quelques études fournissent des données sur la répétabilité et la reproductibilité et surtout sur les performances de la méthode dans les études cliniques prospectives (Deborggraeve *et al.*, 2011 ; Mugasa *et al.*, 2012). De plus, le résultat d'un test de diagnostic moléculaire peut être fortement influencé par la nature, le volume et le traitement des échantillons biologiques à examiner (Solano *et al.*, 2003 ; Ahmed *et al.*, 2011). Le développement des amorces plus spécifiques pour les espèces de trypanosomes réduit fortement la sensibilité de la qPCR comme observé par Compaoré *et al.* (2020a).

b) LAMP (Loop mediated isothermal amplification)

La LAMP est une méthode d'amplification isotherme en boucle (en anglais Loop mediated isothermal amplification) (Notomi *et al.*, 2000). Cette méthode de diagnostic a fait son apparition dans la THA pour améliorer le diagnostic moléculaire de la THA à *T. b. rhodesiense*. Son application était spécifique au sous-genre *Trypanozoon* (Kuboki *et al.*, 2003 ; Njiru *et al.*, 2008) et à la sous-espèce *T. b. rhodesiense* (Njiru *et al.*, 2008), mais un format pour *T. b. gambiense* a été développé (LAMP TgsGP) (Njiru *et al.*, 2011 ; Nikolskaia *et al.*, 2017).

Les principaux avantages de la LAMP incluent (i) la rapidité et l'utilisation de six à huit amorces offrant une haute spécificité ; (ii) la capacité de la technique à amplifier l'ADN cible à partir d'une matrice partiellement traitée ; (iii) l'exigence d'un simple appareil de chauffage tel qu'un bain d'eau et (iv) les résultats peuvent être inspectés visuellement à l'aide de formats de détection variés. Les résultats du test LAMP peuvent être visualisés grâce à la turbidité (Mori *et al.*, 2001), à un colorant fluorescent (Mori *et al.*, 2006 ; Boehme *et al.*, 2007 ; Aonuma *et al.*, 2010), à un format de jauge à écoulement latéral (LFD) (Nimitphak *et al.*, 2008) et des puces microfluidiques (Fang *et al.*, 2010).

La LAMP a suscité beaucoup d'intérêt en tant qu'outil moléculaire facile à appliquer, très sensible, offrant un grand potentiel de diagnostic dans les environnements ruraux pauvres en ressources, où la THA est généralement présente (Grab *et al.*, 2019; Hayashida *et al.*, 2020). La rapidité, la spécificité et la simplicité de la technique l'ont rendue attrayante pour une utilisation dans les régions où la trypanosomiase humaine africaine (THA) est endémique.

Des études expérimentales récentes visant à optimiser les procédures de préparation des échantillons de LAMP ont présenté une limite de détection de 10-100 trypanosomes/mL en fonction du temps de stockage des papiers filtre (Matovu *et al.*, 2020). Ainsi, Compaoré et

collaborateurs (2020a) ont observé une sensibilité analytique de la LAMP avec une limite de détection de 100 trypanosomes/mL.

I.4.1.4. Limites du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine

Au fil des années, d'importants progrès ont été réalisés en ce qui concerne le diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine (THA), principalement la forme la plus rencontrée, la THA à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*). Malgré cette multitude de techniques exploitées dans le diagnostic de la THA, celles-ci présentent toujours des limites en termes de sensibilité et/ou de spécificité ou de reproductibilité. En raison de la chute globale de la prévalence de la THA, les valeurs prédictives positives des tests sérologiques existants sont de plus en plus faibles (Lumbala *et al.*, 2018 ; Büscher *et al.*, 2014). Les tests de confirmation dans l'algorithme de tests actuel sont donc essentiels mais nécessitent la disponibilité d'une expertise technique et de fournitures spécialisées et se limitent aux suspects sérologiques et cliniques. La sensibilité des tests parasitologiques de confirmation reste également insuffisante (Luz *et al.*, 2021). Les outils moléculaires conventionnels tels que la PCR sont très gourmands en ressources et en temps, et sont rarement utilisés dans les pays d'endémie de la THA (Hayashida *et al.*, 2020).

Le contexte actuel de transition épidémiologique a suscité une réorientation de la stratégie de lutte contre la THA. Le dépistage actif exhaustif de la population, n'étant plus adapté à la situation épidémiologique réelle pour plusieurs raisons, est progressivement remplacé par le dépistage passif qui est en général intégré aux systèmes nationaux de santé et dans les structures de santé périphériques ou services de soins de santé primaire dans les zones à risque (Mitashi *et al.*, 2015 ; Wamboga *et al.*, 2017; Mulenga *et al.*, 2019).

En 2015-2016, au moment où le projet a été rédigé, il y avait des nouveaux outils disponibles qu'il fallait évaluer. Cette étude a évalué la performance des outils de diagnostic et les algorithmes pour le diagnostic de la THA à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) dans un contexte d'élimination de la maladie du sommeil.

I.4.1.5. Stadification de la maladie ou diagnostic de phase

Après la détection de l'agent pathogène dans le sang, il est nécessaire de déterminer la progression de la maladie par la mise en évidence de parasites dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou la numération des globules blancs dans le LCR, comme le recommande l'OMS

(WHO, 2013). La phase de la maladie conditionne la nature des médicaments utilisés pour le traitement. Le diagnostic de phase est une étape très importante effectuée chez le malade au cours de sa prise en charge thérapeutique. De façon classique, on distingue deux phases de la THA. La 1^{ère} phase est caractérisée par la présence de trypanosomes dans le système lymphatico-sanguin et la 2^{ème} phase s'installe lorsque les trypanosomes traversent la barrière méningée et se retrouvent dans le système nerveux central (SNC). Au stade 2, si le parasite ne peut pas être décelé, on peut prendre la décision thérapeutique sur des marqueurs biologiques signant l'invasion du SNC. Selon les recommandations de l'OMS (WHO, 2013), le stade 2 est défini par la présence d'au moins une des altérations biologiques du LCR ci-dessous avec ou sans présence de signes neurologiques : (i) un nombre de cellules blanches > 5 / μ L, (ii) la présence de trypanosomes.

En pratique, ces critères de stadification font l'objet de nombreuses controverses de par leur manque de sensibilité (détection des trypanosomes) ou par leur manque de spécificité (cytorachie). Le comptage des leucocytes reste encore actuellement l'élément clé pour la décision thérapeutique malgré son manque de spécificité et la difficulté de définir un seuil (Kennedy, 2008).

Par ailleurs, avec l'avènement de nouvelles molécules efficaces contre les 2 phases de la maladie, la détermination du stade de la THA due à *T. b. gambiense* deviendra probablement redondante (Lejon *et al.*, 2019).

I.4.2. Traitement de la trypanosomiase humaine africaine

Le traitement de la trypanosomiase humaine africaine (THA) est complexe car il diffère selon l'espèce parasitaire et le stade de la maladie (Tableau I). Mais plus le diagnostic est précoce, plus les perspectives de guérison sont bonnes (Büscher *et al.*, 2017). Les médicaments utilisés au cours de la première phase présentent peu d'effets secondaires et sont relativement faciles à administrer. Les traitements de la deuxième phase sont plus complexes et/ou toxiques car les médicaments doivent franchir la barrière hémato-encéphalique.

L'iséthionate de pentamidine est le traitement de première intention pour la trypanosomiase humaine africaine (THA) à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) au premier stade et constitue une alternative pour la THA à *T. b. rhodesiense* (Büscher *et al.*, 2017). Quant à la suramine, elle est efficace au premier stade de la THA à *T. b. gambiense* et à

Tableau I: Liste des anciens et actuels médicaments contre la trypanosomiase humaine africaine (Kaba *et al.*, 2021)

Stade de la maladie	Médicament (date de mise sur le marché)	Forme de la maladie	Protocole de traitement	Effets indésirables
Stade 1	Atoxyl [®] (1906)	THA à <i>T. b. gambiense</i>		Cécité, mortalité
	Salvaran (1910)	THA à <i>T. b. gambiense</i> et <i>T. b. rhodesiense</i>		Maux de tête, vomissements, diarrhée, nécrose cutanée, cécité, surdité, paralysie
	Pentamidine (Lomidine) (1940)	THA à <i>T. b. gambiense</i>	4mg/kg/jour en injection IM pendant 7 jours (Pentacarinat [®] 300 mg)	Douleur au point d'injection, nausées, vomissements, hypotension voire callopsus par hypolipémie
	Suramine (Moranyl [®]) (1920)	THA à <i>T. b. rhodesiense</i>	Administration progressive : -jour1 : injection IV d'essai de 4-5 mg/kg -suivi de 20mg/kg par semaine pendant 5 semaines consécutives (dose maximale/ injection : 1 mg)	Réaction fébrile, allergie et atteinte des voies urinaires, réaction anaphylactiques sévères, anémie hémolytique, neuropathie périphérique, etc.
Stade 2	Mélsarsoprol (Mel B ou Arsobal [®]) (1949)	THA à <i>T. b. gambiense</i> et <i>rhodesiense</i>	2,2 mg/kg/jour pendant 10 jours consécutifs	-Encephalopathie réactive chez 5 à 10% des patients -Injection intraveineuse douloureuse -Nombre croissant d'échecs thérapeutiques pouvant atteindre jusqu'à 30%
	Eflornithine (difluorométhyl ornithine ou DFMO) (1990)	THA à <i>T. b. gambiense</i>	-400 mg/kg/jour répartis en 4 perfusions IV lentes (2 h) toutes les 6 heures pendant 14 jours (au total 56 perfusions) -Associée parfois au nifurtimox (NECT)	-Effets indésirables fréquents : anémie, leucopénie, thrombopénie, diarrhée, convulsions, vomissements -administration difficile Inactive sur <i>T. b. rhodesiense</i>
	Nifurtimox (1970)	THA à <i>T. b. gambiense</i>	Utilisé en association avec l'Eflornithine	Fièvre, nausées, vomissements, convulsions, troubles psychiatriques
	NECT : Combinaison nifurtimox et éflornithine (2009)	THA à <i>T. b. gambiense</i>	-Eflornithine : 400 mg/kg en IV, toutes les 12 heures pendant une durée de 7 jours -Nifurtimox : 15 mg/kg, voie orale, toutes les 8 heures pendant 10 jours consécutifs	Fièvre, nausées, vomissements, convulsions, troubles psychiatriques
Stade 1 et 2	Fexinidazole (2018)	THA à <i>T. b. gambiense</i>	3 comprimés à 600 mg par jour pendant 4 jours, puis 2 par jour pendant 6 jours	Nausées, vomissements, asthénie, anorexie, céphalées, insomnie, tremblements, étourdissements
	Oxaborole (en cours de validation)	THA à <i>T. b. gambiense</i>	Dose unique (1 comprimé)	

I. M.: intramusculaire; IV: intraveineuse; mg: milligramme; kg: kilogramme; *T. b.*: *Trypanosoma brucei* ; trypanosomiase humaine africaine (THA)

T. b. rhodesiense mais elle n'est utilisée que dans le traitement de la THA à *T. b. rhodesiense* en raison du risque de coïnfection par l'onchocercose dans les régions où *T. b. gambiense* est endémique. Cependant, étant donné que la pentamidine ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique de manière suffisamment efficace pour éliminer les trypanosomes dans le SNC, elle n'est pas utilisée contre la THA à *T. b. gambiense* de stade 2. Le traitement de la deuxième phase de la maladie, depuis 1949 et jusqu'à récemment reposait sur le mélarsoprol, responsable de 5 à 10 % d'encéphalopathies le plus souvent mortelles. L'éflornithine, ou DFMO (difluorométhylornithine) a été utilisé comme une alternative thérapeutique dans le traitement de 1^{ère} ligne dans les régions où le taux de guérison obtenu avec le mélarsoprol est insuffisant, et comme traitement de 2^{ème} ligne (rechutes après mélarsoprol) dans les autres zones endémiques (Louis *et al.*, 2003).

Une amélioration radicale des traitements a été obtenue en 2009, lorsque des études cliniques réalisées par Epicentre / Médecins Sans Frontières (MSF) / DNDi ont démontré la sécurité et l'efficacité de l'association thérapeutique nifurtimox-eflornithine (en anglais Nifurtimox-Eflornithine combination therapy (NECT)), un traitement plus sûr et plus court (Priotto, 2009). Comparé au mélarsoprol ou à l'éflornithine en monothérapie, le NECT a des taux de guérison (95-98%) plus élevés, des taux de mortalité (<1%) plus faibles, moins d'effets indésirables graves, une administration plus simple et on pense qu'il ne provoque pas de résistance du parasite (Priotto *et al.*, 2009 ; Alirol *et al.*, 2013).

Le NECT étant maintenant plus sûr et plus facile à administrer que l'éflornithine seule (Priotto *et al.*, 2009), il a été inclus dans la liste des médicaments essentiels en 2009 et est devenu le traitement de première intention du deuxième stade de la THA à *T. b. gambiense* (Franco *et al.*, 2012 ; WHO, 2013; Büscher *et al.*, 2017). Cette thérapie est mieux tolérée chez les enfants que chez les adultes, et est généralement mieux tolérée que les monothérapies à base d'éflornithine et de mélarsoprol. Bien que le NECT soit la première révolution dans le traitement de la maladie du sommeil, il nécessite toujours une hospitalisation et reste lourd et l'intégration ciblée du traitement de la trypanosomiase humaine africaine (THA) dans les structures sanitaires publiques est encore limitée (WHO, 2013).

Des efforts sans précédent ont généré de meilleurs résultats dans la prise en charge thérapeutique des cas. En novembre 2018, le comité scientifique des médicaments à usage

humain (CHMP) de l'agence européenne des médicaments a émis un avis favorable concernant les comprimés de fexinidazole destinés au traitement de la THA à *T. b. gambiense* (Tarral *et al.*, 2014 ; DNDi-HAT, 2018). Cette agence a recommandé l'approbation de fexinidazole en tant que premier traitement entièrement oral efficace contre les deux stades de la THA à *T. b. gambiense* ouvrant la voie à la distribution de fexinidazole dans les pays endémiques. Le Fexinidazole est devenu la deuxième révolution tangible dans le traitement de la THA car il pourrait éliminer les hospitalisations systématiques et réduire potentiellement le nombre de ponctions lombaires. Le fexinidazole est un médicament à prendre par voie orale pendant 10 jours, à raison d'une prise par jour (Tableau I). Le régime oral simplifié du fexinidazole, affectant les deux stades de la maladie plutôt qu'un traitement intraveineux surmonte les obstacles à l'intégration des soins de la THA à *T. b. gambiense* dans les structures de santé périphériques, en particulier dans les zones où les ressources de santé sont limitées. Cependant, des problèmes potentiels concernant l'observance sont présents, étant donné que le fexinidazole doit être administré pendant ou après un repas principal pour atteindre des concentrations efficaces. Egalement, le schéma posologique de 10 jours est relativement long pour un traitement oral et le nombre de comprimés change à mi-parcours du traitement. Des effets secondaires tels que les nausées et les vomissements sont fréquents au cours du traitement (Mesu *et al.*, 2021).

Des essais cliniques avec l'Acoziborole, un nouveau médicament oral à dose unique et efficace contre les deux stades de la trypanosomiase humaine africaine (THA) à *T. b. gambiense* viennent d'être terminés et semblent prometteurs (Jacobs *et al.*, 2011 ; Eperon *et al.*, 2014).

I.5. Différentes stratégies de lutte actuelle

Comme il n'existe pas de vaccin ni de moyen chimio-prophylactique, la lutte contre la THA repose sur le dépistage-traitement le plus précoce possible des personnes infectées (lutte médicale) et sur la lutte contre la mouche tsétsé (lutte anti-vectorielle) pour réduire le risque de transmission.

I.5.1. Lutte médicale

Cette stratégie est basée sur des méthodes bien élaborées comme le dépistage actif exhaustif des cas par des équipes mobiles et le dépistage passif intégré dans les systèmes nationaux de santé. Pour compenser les limites de ces deux méthodes et s'adapter au contexte

actuel de baisse généralisée des prévalences, des stratégies de dépistage actif, ciblé sur les populations les plus à risque, ont récemment été développées pour dépister les cas de THA le plus tôt possible (Compaoré *et al.*, 2020b).

I.5.1.1. Dépistage actif

Cette stratégie développée au début du XX^e siècle a été utilisée à grande échelle au Cameroun (Louis *et al.*, 2002) puis dans d'autres régions de l'Afrique de l'Ouest (Ekwanzala *et al.*, 1996). Le dépistage actif est toujours utilisé pour endiguer les épidémies de THA due à *T. b. gambiense* (Robays *et al.*, 2004 ; Simarro *et al.*, 2006). Le dépistage actif est mené par des équipes mobiles spécialisées qui procèdent à un dépistage à grande échelle parmi les populations à risque et elle est surtout plus effectuée dans les zones fortement endémiques et en cas d'épidémie (WHO, 2013) (Figure 12). Idéalement, elle est précédée (i) d'une sensibilisation pour améliorer le taux de présentation, (ii) d'un recensement de la population (Figure 12A) pour pouvoir en évaluer l'efficacité qui repose sur le taux de présentation de la population (Solano *et al.*, 2003). L'ensemble de la population est d'abord soumise à un test sérologique pour la recherche de cas suspects, suivi d'une recherche parasitologique sur les sujets positifs (Chappuis *et al.*, 2005) (Figure 12B et 12C).

Les tests diagnostiques utilisés sont adaptés aux conditions de terrain. Depuis les années 1980, le test sérologique le plus utilisé a été le CATT (Magnus *et al.*, 1978). Le diagnostic parasitologique consiste à rechercher le parasite par examen microscopique au grandissement (X400) entre lame et lamelle du suc ganglionnaire, en cas d'adénopathies cervicales ; soit dans le sang par des méthodes de filtration et/ou de concentration adaptées aux faibles parasitémies qui caractérisent la trypanosomiase humaine africaine (THA) due à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*). La mAECT reste le test parasitologique le plus sensible (Mumba *et al.*, 2014). Cette stratégie n'est pas adaptée à la THA à *T. b. rhodesiense*, d'une part à cause de son caractère aigu, et d'autre part parce qu'aucun test sérologique n'est disponible. Dans le cas de la THA *gambienne*, le dépistage actif permet une détection précoce des cas, même asymptomatiques, facilitant la prise en charge thérapeutique et limitant dans le temps leur rôle de réservoir, source de contamination pour la population. Il permet aussi d'accéder aux populations à risque les plus reculées ayant un accès limité aux structures de dépistage.



Figure 12: Dépistage actif de la trypanosomiase humaine africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*

A. Enregistrement de population venue se faire tester. B. Prélèvement de sang par ponction digitale. C. Réalisation des tests sérologique et parasitologique

Source : Compaoré *et al.*, 2020b

Si cette stratégie permet de contrôler rapidement les situations épidémiques, son rapport coût/efficacité diminue avec la baisse des prévalences, accompagnée par un désintérêt progressif des populations à participer aux séances de dépistage, notamment parce qu'elles ne considèrent plus la THA comme une menace (Hasker *et al.*, 2012; Mpanya *et al.*, 2012).

Ces situations rencontrées au cours du dépistage actif peuvent entraîner une sous-détection des cas et lorsque le but visé n'est plus désormais de juguler la maladie mais l'éliminer, il faut faire usage d'autres stratégies plus adaptées comme le dépistage passif.

I.5.1.2. Dépistage passif

Généralement intégré aux systèmes nationaux de santé dans les structures de santé périphériques ou services de soins de santé primaire dans les zones à risque, le dépistage est dit passif lorsque le malade sollicite une intervention de sa propre initiative (Mitashi *et al.*, 2015 ; Wamboga *et al.*, 2017 ; Mulenga *et al.*, 2019). Dans le cas de la THA à *T. b. gambiense*, à l'aide d'un test sérologique, des patients qui se sont présentés eux-mêmes à un centre de santé fixe sont dépistés suivant des symptômes et signes cliniques se rapportant à cette infection. Le développement récent des tests de diagnostic rapides (TDR) réalisables par un personnel non spécialisé et ne nécessitant ni source de courant, ni chaîne de froid, a considérablement facilité l'intégration du diagnostic de la THA dans le système de santé et a permis l'extension du dépistage passif à un moment crucial du processus d'élimination (Jamonneau et Bucheton, 2014). Il en existe plusieurs formats (Bisser *et al.*, 2016 ; Büscher *et al.*, 2017) dont les performances diagnostiques sont toujours en cours d'évaluation. Les examens parasitologiques sont alors effectués sur les échantillons des suspects cliniques positifs au test de diagnostic rapide (TDR).

Si la suspicion clinique et sérologique peut se faire dans n'importe quel centre de santé, les examens parasitologiques plus complexes sont souvent effectués dans des centres équipés où sont référés les suspects cliniques positifs au TDR (Hasker *et al.*, 2011). De plus, l'une des options de prise en charge des suspects sérologiques et chez qui le test parasitologique est négatif, consiste à faire appel à un système de référence avec expédition des échantillons à un laboratoire de référence pour la confirmation de la suspicion. Dans ce cas, des tests très spécifiques et sensibles comme la trypanolyse (Jamonneau *et al.*, 2010), des tests de diagnostic moléculaire sont alors utilisés. Pour la trypanosomiase humaine africaine (THA) à

Trypanosoma brucei rhodesiense (*T. b. rhodesiense*), du fait de l'indisponibilité d'un test sérologique adapté, et en raison des fortes parasitémies observées, les examens parasitologiques simples comme l'examen microscopique de sang frais, la goutte épaisse, ou d'un suc du chancre d'inoculation, sont directement effectués pour les suspects cliniques (WHO, 2013).

Le dépistage passif permet de sensibiliser et maintenir le réflexe « Trypano » chez les agents de santé et permet également de dépister à l'aide d'un protocole simple basé sur une suspicion clinique et sérologique. Il rend le diagnostic accessible à toutes les populations à risque tout en ciblant des suspects cliniques même s'ils sont venus consulter pour d'autres motifs (Mitashi *et al.*, 2015). Cependant, le fait de cibler des suspects cliniques amène à ne détecter les cas que lorsqu'ils présentent des symptômes, notamment neurologiques, et sont donc déjà à un stade avancé de la maladie (Fèvre *et al.*, 2005 ; Kambiré *et al.*, 2012). Il s'agit d'une contrainte, non seulement pour le patient, mais aussi pour la communauté, car le sujet constitue un réservoir de parasites et une source de contamination potentielle jusqu'à son traitement. Une autre limite est que le dépistage passif basé sur une suspicion clinique difficile nécessite une formation initiale et continue du personnel de santé souvent soumis à une importante mobilité, ainsi qu'à une baisse de motivation quand le dépistage de nouveau cas devient rare (Matemba *et al.*, 2010 ; Hasker *et al.*, 2015). Le fait que le diagnostic parasitologique de la THA à *T. b. gambiense*, qui est une procédure complexe, ne soit effectif que dans certains centres de référence est aussi un inconvénient majeur. En effet, certains suspects sérologiques détectés dans les centres périphériques ne se rendent pas spontanément, voire pas du tout, dans les centres de diagnostic parasitologique parfois éloignés, ce qui retarde leur dépistage et le traitement (Hasker *et al.*, 2018 ; Mulenga *et al.*, 2019). Enfin un autre inconvénient est que l'efficacité du dépistage passif intégré dépend du taux de fréquentation qui peut être faible dans certaines zones à risque reculées, notamment à cause d'une offre de soin coûteuse et de faible qualité (Mitashi *et al.*, 2015).

I.5.1.3. Dépistage actif ciblé

Dans le but de rendre plus complète la lutte médicale, une stratégie de dépistage actif ciblé a été développée pour compenser les principaux inconvénients du dépistage actif et du dépistage passif, c'est-à-dire pour permettre une détection précoce des cas avec un rapport coût/efficacité acceptable. Le dépistage est mené par des équipes spécialisées qui identifient et

ciblent les populations les plus à risque à tester. Dans une nouvelle zone à risque de transmission ou dans un foyer historique de la trypanosomiase humaine africaine (THA) où aucune information épidémiologique récente n'est disponible, il est nécessaire de déterminer la situation de la maladie pour pouvoir y mettre en place des stratégies adaptées (Compaoré *et al.*, 2020b). Le dépistage actif ciblé peut cibler un choix de villages considérés comme les plus à risque sur la base de données historiques, épidémiologiques et géographiques. Il est alors précédé de la stratégie dite d'identification des villages à risque (Courtin *et al.*, 2019 ; Rouamba *et al.*, 2019).

Le dépistage actif ciblé peut aussi cibler les populations partageant les mêmes espaces que les derniers cas dépistés. Ces populations, considérées comme particulièrement à risque, sont identifiées en déterminant précisément leurs lieux de vie et les trajets quotidiens des cas par un suivi spatialisé (Courtin *et al.*, 2010). Pour améliorer le taux de participation, ce dépistage réactif peut se faire de porte à porte (Koffi *et al.*, 2016) et/ou avec des mini-équipes pour faciliter l'accessibilité aux populations les plus reculées (Hasker *et al.*, 2015). Le dépistage actif ciblé peut aussi consister à suivre les cas dépistés lors des campagnes de dépistage actif exhaustif qui ne se rendent pas spontanément dans un centre de traitement afin de les convaincre de se faire traiter (Jamonneau *et al.*, 2012), et à identifier et effectuer les examens parasitologiques sur les suspects sérologiques du dépistage passif qui ne se sont pas rendus spontanément dans un centre de référence (Hasker *et al.*, 2011, Mitashi *et al.*, 2015 ; Mulenga *et al.*, 2019).

Le suivi des suspects sérologiques non traités peut faire objet d'un dépistage actif ciblé sur ces sujets jusqu'à ce que le parasite soit mis en évidence puis le sujet traité, ou jusqu'à négativation des tests sérologiques (Ilboudo *et al.*, 2011).

I.5.2. Lutte antivectorielle

En l'absence de vaccin et de chimioprophylaxie, le moyen de prévention contre la THA reste la lutte antivectorielle (LAV). Elle vise à diminuer les densités de glossines afin de réduire le contact homme/vecteur et donc le risque de transmission du parasite. La LAV est donc un complément précieux au dépistage et au traitement des cas de trypanosomiase humaine africaine (THA) à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) et à *T. b. rhodesiense* car la réduction de la densité vectorielle peut faire rapidement reculer la transmission des

trypanosomes. Plusieurs méthodes ont été décrites pour combattre le vecteur (WHO, 2013), mais la plus utilisée pour lutter contre la THA à *T. b. gambiense* est l'usage d'attractifs visuels noirs et bleus, sous forme de pièges et d'écrans imprégnés d'insecticide. De nouveaux écrans de lutte récemment développés, appelés les «tiny targets» ont permis de réduire le coût de la LAV sans en altérer l'efficacité, avec des réductions de densités de glossines pouvant atteindre 80 % à 90 %.

Plusieurs études récentes ont montré que cette stratégie associée à la lutte médicale a contribué significativement à contrôler la maladie dans plusieurs foyers en Guinée, au Tchad et en Ouganda (Courtin *et al.*, 2015 ; Tirados *et al.*, 2015 ; Mahamat *et al.*, 2017 ; Kagbadouno *et al.*, 2018). Une étude de modélisation a même montré que la LAV serait nécessaire pour atteindre l'interruption de la transmission de la THA à *T. b. gambiense* dans les foyers de forte endémicité en République Démocratique du Congo avant 2030 (Rock *et al.*, 2017). Du fait de son caractère zoonotique, la LAV est essentielle pour limiter le risque d'infections humaines à partir des animaux domestiques, mais également sauvages, chez lesquels un traitement trypanocide n'est pas envisageable. De façon objective, la LAV est maintenue aussi que l'incidence de la THA demeure dans la zone de lutte.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. ZONES D'ETUDE

II.1.1. Choix des différentes zones d'étude

Grâce à la surveillance épidémiologique menée en Côte d'Ivoire via le programme national d'élimination de la trypanosomiase humaine africaine (PNETHA) en collaboration avec des structures partenaires nationales et internationales, des foyers endémiques, hypo-endémiques et à risque ont été identifiés (Figure 13). Les foyers endémiques sont des zones qui fournissent encore des cas de THA depuis 2015 et les foyers hypo-endémiques correspondent aux zones qui ont rapporté des cas entre 2000 et 2014, mais aucun cas depuis 2015. Les foyers historiques dans lesquels aucun cas n'a été rapporté depuis 2000 sont considérés comme des zones à risque.

Les activités de terrain se sont déroulées dans les foyers endémiques de Bonon et Sinfra (Figure 13). Le choix de ces deux foyers s'est fait en rapport avec l'histoire récente de la THA dans ces zones qui a été retracée à l'aide des données d'archives des différentes structures en charge de la lutte contre la THA. La provenance des malades dépistés annuellement entre 2000 et 2019 a également motivé le choix de ces sites (Tableau II).

Depuis la fin des années 1990, le foyer de Bonon est le plus actif en Côte d'Ivoire (Dje *et al.*, 2002 ; Courtin *et al.*, 2005 ; Coulibaly *et al.*, 2019). De 2000 à 2015, ce sont 325 cas de THA qui ont été diagnostiqués, montrant que la transmission se poursuit et que Bonon est toujours le principal foyer de THA en Côte d'Ivoire (Simarro *et al.*, 2010 ; Franco *et al.*, 2018).

Le foyer de Sinfra a été mis en évidence au début des années 1990 (Laveissière *et al.*, 1997 ; Laveissière *et al.*, 2003) et des cas de THA sont toujours dépistés même si on note une réduction importante de l'incidence de la maladie (Kaba *et al.*, 2021). Comme indiqué dans le tableau II, depuis 2015, seulement 3 cas ont été dépistés dans le foyer.

Ces foyers de Bonon et de Sinfra se sont développés à la suite de l'accentuation de la vitesse de déforestation liée à d'importants flux migratoires (Courtin *et al.*, 2005). En effet, le peuplement de ces deux zones est le fait d'un processus de mouvements migratoires successifs qui seraient à l'origine de l'introduction de la maladie, suivie de son expansion dans la zone grâce à des facteurs de risques liés à la déforestation et au développement des cultures de rentes (le café et le cacao) (Hervouët *et al.*, 2000 ; Kaba *et al.*, 2006 ; Kambiré *et al.*, 2012 ; Fauret *et al.*, 2018).

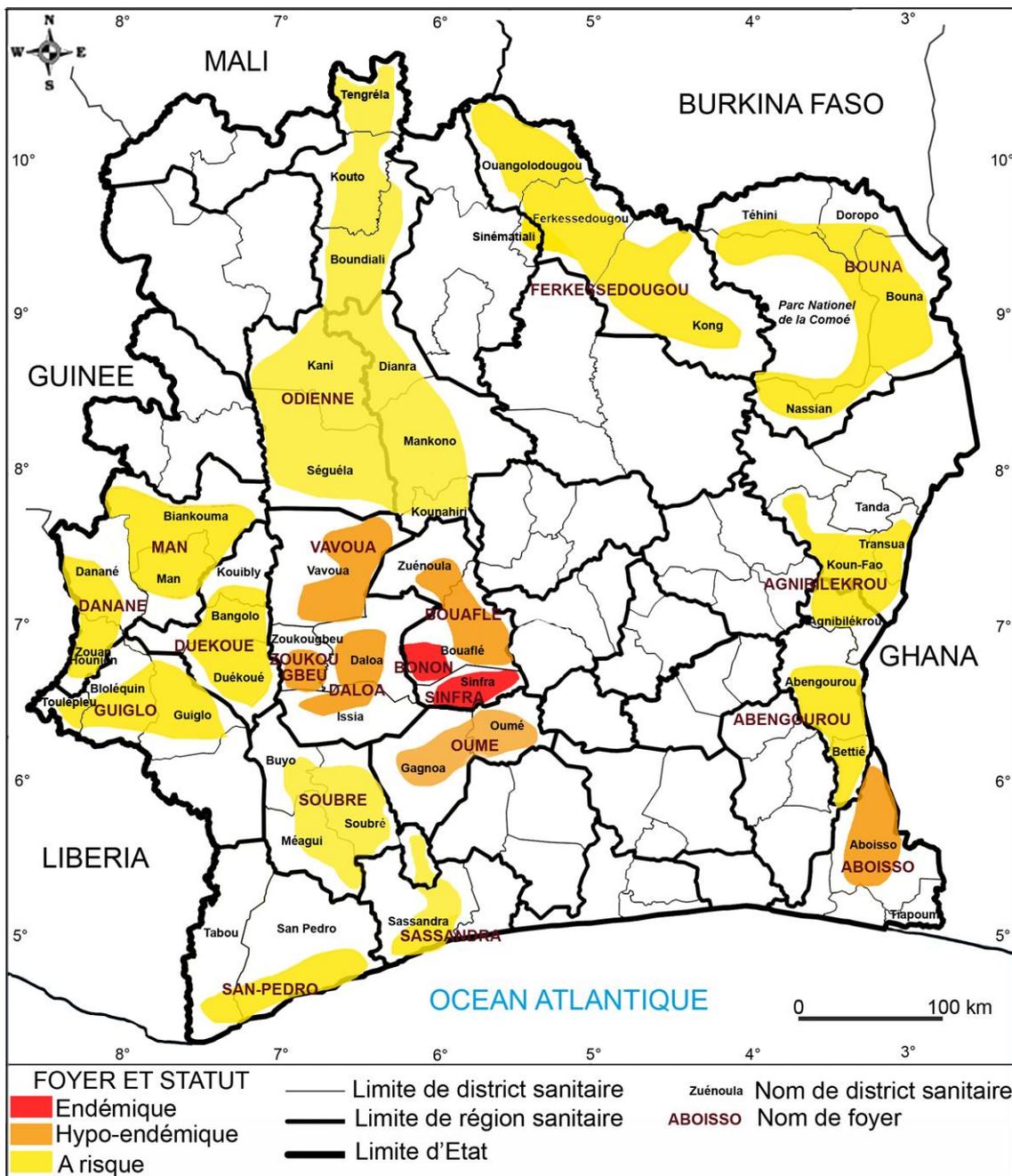


Figure 13: Statut épidémiologique de la trypanosomiase humaine africaine dans des districts sanitaires de Côte d'Ivoire

Source : Institut Pierre Richet (IPR) de Bouaké, 2020.

Tableau II: Nombre de cas de trypanosomiase humaine africaine dépistés par an et par foyer entre 2000 et 2019 en Côte d'Ivoire

Foyer	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total
Aboisso	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Bonon	108	31	54	19	50	12	15	6	3	3	5	5	5	5	2	2	0	2	2	0	329
Bouaflé	8	9	3	3	3	5	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	37
Daloa	14	9	10	3	2	3	1	2	2	0	1	2	0	0	2	0	0	0	0	0	51
Oumé	11	8	4	4	1	5	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	37
Sinfra	31	22	23	37	16	16	12	5	7	4	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	179
Vavoua	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	6
Zoukougbeu	7	5	2	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
Autres	7	5	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
Total	188	92	97	68	74	42	29	13	14	8	8	10	9	7	6	3	0	3	2	1	674

Source : Programme National d'Elimination de la THA (PNETHA), 2020 (données non publiées).

Les données épidémiologiques ont permis d'identifier 10 centres de santé à raison de cinq centres de santé retenus par foyer et ceux-ci ont été scindés en deux niveaux (figure 14) :

- ✓ les sites de screening sérologiques (SSS) ;

Il s'agit de Centres de Santé Urbains (CSU) ou de Centres de Santé Ruraux (CSR), qui exécutent les tests sérologiques (TDR) sur des suspects cliniques. Ils sont au nombre de quatre par foyer et ils font référence de tous les suspects sérologiques dépistés.

- ✓ les Centres de Diagnostic et Traitement (CDT).

Ces centres plus équipés, ont un statut central et assurent en plus des tâches effectuées dans les SSS, la confirmation parasitologique ainsi que le traitement des cas de THA confirmés.

Il s'agit de deux hôpitaux généraux (Sinfra et Bonon) implantés dans chacun des deux foyers endémiques. Ce sont des centres de référence pour les SSS qui leur sont associés.

II.1.2. Description de la zone de Bonon

Bonon est une ville située à 6°55 de latitude Nord et à 6°02 de longitude Ouest dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. Le département de Bonon appartient à la région de la Marahoué. Chef-lieu de commune, cette ville est située à 92 km à l'Ouest de Yamoussoukro, capitale politique du pays et à 325 km au Nord-Ouest d'Abidjan, capitale économique du pays. La commune de Bonon couvre une superficie de 520 km², pour une population totale de 112 629 habitants (RGPH-CI, 2014). Cette zone évolue sous l'influence d'un climat de type équatorial à deux saisons de pluies (de mai à mi-juillet et d'août à octobre) et une grande saison sèche (de Novembre à mi-avril). La pluviométrie annuelle oscille autour de 1300 mm prônant un couvert forestier important, mais qui a été remplacé progressivement par les cultures de rentes surtout le binôme café-cacao. De nos jours, seules des reliques de forêts humides subsistent sous forme d'aires protégées à l'instar du Parc National de la Marahoué et de forêts sacrées (Coulibaly *et al.*, 2019).

Bonon a connu, dès le début des années 1970, une arrivée massive de migrants agricoles à partir des pays voisins comme le Mali (Malinké, Sénoufo) et Burkina Faso ((Mossi, Sénoufo, Lobi, etc.). Mais également, des peuples locaux à l'instar des Baoulé, Lobi, Sénoufo et Malinké de Côte d'Ivoire se sont déplacés vers cette zone (Fauret *et al.*, 2018). Cette immigration a été principalement liée à la recherche d'une parcelle de forêt pour la culture de café-cacao, faisant de Bonon une zone cosmopolite composée d'une cinquantaine d'ethnies (Courtin, 2007).

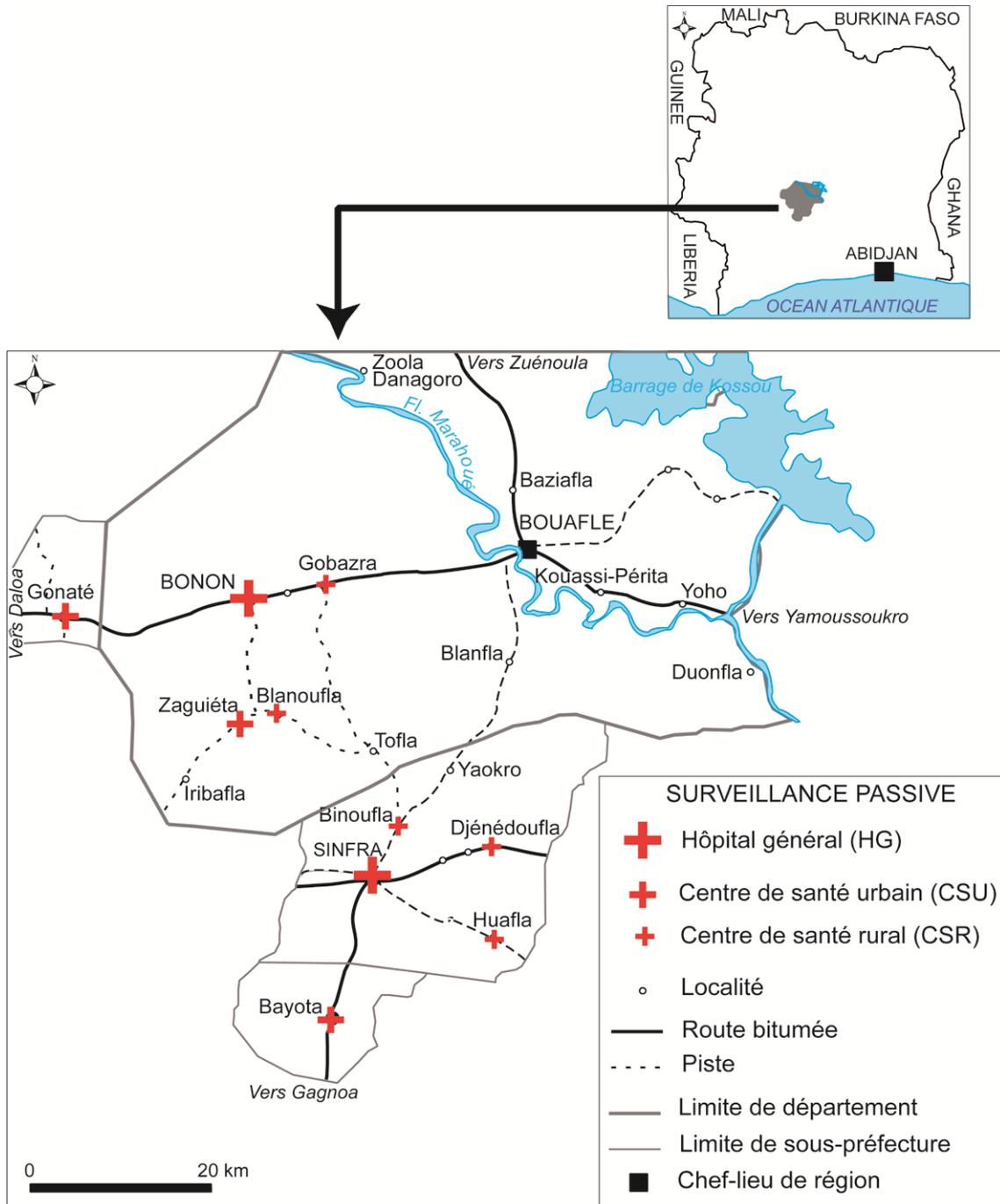


Figure 14: Localisation des différents sites d'échantillonnage

Source : Institut Pierre Richet (IPR) / équipe de cartographie, 2022

II.1.3. Description de la zone de Sinfra

La localité de Sinfra est située à 6°37' de latitude Nord et à 5°54' de longitude Ouest. Département depuis 1985, Sinfra fait partie de la région de la Marahoué. Avec une superficie de 1618 km², elle a une population estimée à 130 277 habitants selon le recensement général de la population et de l'habitat (RGPH-CI, 2014). La commune de Sinfra est située sur l'axe Yamoussoukro-Issia à 82 km de Yamoussoukro et à 315 km d'Abidjan. La sous-préfecture de Sinfra est localisée en zone de forêt mésophile non loin du contact forêt-savane. Sinfra évolue sous l'influence d'un climat de type équatorial à deux saisons de pluies (de mai à mi-juillet et d'août à octobre), même si cet équilibre est quelque peu perturbé ces dernières années. La pluviométrie est d'environ 1 300 mm/an (Fauret *et al.*, 2018). La saison sèche débute en novembre et s'achève en mars.

Tout comme Bonon, la sous-préfecture de Sinfra est située en pays Gouro. Elle a connu une immigration massive de travailleurs nationaux (Baoulé, Sénoufo, etc.) et étrangers originaires du Mali (Malinké, Sénoufo, etc.) et du Burkina-Faso (Mossi, Sénoufo, Lobi, etc.). Cette immigration s'est faite à partir des années 1960, avec pour intérêt capital d'acquiescer une parcelle de forêt servant à la mise en place d'une plantation de café-cacao (Courtin, 2007).

II.2. MATERIEL

II.2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué d'échantillons de sang (sang frais et sang séché sur du papier filtre) prélevés chez des suspects cliniques. Des extractions d'ADN ont été réalisées à partir des échantillons de sang séché sur du papier filtre (Whatman N° 4 et Whatman N° 1001).

II.2.2. Matériel technique

L'étude s'est déroulée dans les centres de santé existants et dans un laboratoire de référence, alors plusieurs matériels techniques ont été nécessaires pour sa réalisation.

Concernant la sérologie dans les centres de santé, trois différents tests de diagnostic rapides (TDR) ont été utilisés dont les TDR HAT Sero-K-Set, SD Bioline HAT 1.0 et rHAT Sero-Strip. Pour la parasitologie, d'abord, des tubes de prélèvement contenant de l'héparine et des Aiguilles de prélèvement de sang veineux ont servi à la collecte de l'échantillon de sang veineux prélevé au pli du coude. Ensuite, des kits de tests de la minicolonne (kit INRB), un microscope

binoculaire et une centrifugeuse ont permis de faire l'investigation parasitologique dans l'échantillon du sang. Des aiguilles pour ponction ganglionnaire, des lames et lamelles ont également été utilisées en cas de l'examen du suc ganglionnaire. Enfin, des micropipettes ajustables (P1000 et P100) ainsi que leurs cônes respectifs ont servi au prélèvement des échantillons et solutions utilisés.

Des papiers filtres qualitatifs Whatman™ de grade N° 1001 et N° 1004, des enveloppes A4 et A6, des sacs en plastique de type zip-lock, du gel de silice orange (désiccant) et du dodécylsulfate de sodium (SDS 5%) ont été utilisés pour la conservation et le transport des échantillons de sang au laboratoire.

Au laboratoire, le QIAmp DNA Micro kit et l'eau de grade moléculaire ont été utiles pour extraire l'ADN génomique pour la réalisation des tests moléculaires. L'amplification de l'ADN du parasite a été réalisée à partir de deux machines dont la machine de type Agilent-AriaMx pour la PCR quantitative à temps réel (qPCR) et la machine de type incubateur Génie III pour l'amplification isotherme à boucle médiée (LAMP).

Quant aux tests sérologiques de laboratoire, des microplaques en polystyrène de 96 puits et avec un fond plat, une plaque chauffante, un agitateur de microplaque, un vortex, une bonbonne d'azote liquide, des solutions de sérum de cobaye et une micropipette multicanaux ont permis de réaliser les tests de la trypanolyse (TL) et de l'ELISA/*T. b. gambiense*.

II.3. METHODES

II.3.1. Aspects éthiques de l'étude

L'étude a été menée dans le cadre d'un essai diagnostic DiTECT-HAT (en anglais "Diagnostic Tools for Human African Trypanosomiasis Elimination and Clinical Trials" et en français "Outils de diagnostic pour l'élimination de la trypanosomiase humaine africaine et essais cliniques"). L'essai diagnostic a également été conduit dans plusieurs pays notamment au Burkina Faso, en Guinée et en République Démocratique du Congo (RDC). En Côte d'Ivoire, l'étude se déclinait en deux protocoles à savoir le work package 2 (WP2) et le work package 3 (WP3). Cette étude, avant sa mise en œuvre en Côte d'Ivoire, a reçu l'aval éthique (i) du Comité Consultatif de Déontologie et d'Ethique de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), (ii) de l'Institutional Review Board de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (référence 1133/16), (iii) du Comité d'éthique de l'Université d'Anvers (numéro

d'enregistrement belge B300201730927) et (iv) du Comité National d'Ethique des Sciences de la Vie et de la Santé (CNESVS) du Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique en Côte d'Ivoire (référence 076//MSHP/CNER-kp) (Annexe I).

L'étude a également été conduite conformément au protocole selon la déclaration d'Helsinki, la réglementation locale en vigueur et les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC).

L'ensemble des données a été répertorié de manière à garantir l'anonymat des personnes participant à l'étude, dans une base informatisée, développée et hébergée par le site de l'Institut de Médecine Tropicale (IMT) à Anvers avec accès sécurisé selon les normes en vigueur. Cette étude a été également menée sous les normes de la Bonne Pratique Clinique de Laboratoire (BPCL) et conformément aux conditions légales et de normalisation du pays. Tous les individus inclus dans cette étude ont été informés par les investigateurs et par note d'information écrite des conditions de l'étude, conformément à la réglementation en vigueur (Annexe II). Le consentement écrit (daté et signé) a été obtenu pour chaque sujet avant toute évaluation liée à l'étude (Annexe III). Pour les mineurs, l'assentiment est demandé en plus du consentement d'un représentant légal ou d'un témoin indépendant (annexe IV). Les directives sur l'éthique exigent que le consentement des personnes illettrées soit confirmé par un témoin instruit et indépendant, qui assiste à la demande de consentement et garantit que la décision du participant a été prise dans la pleine autonomie et en l'absence de coercition. Les ICH GCP (International Conference on Harmonisation-Good Clinical Practice) exigent, également, que si quelqu'un ne peut pas lire, "un témoin impartial" soit présent pendant la discussion. Le patient signe personnellement le formulaire, pour certifier que le consentement a été librement donné. Le témoin qui est une personne instruite de confiance est choisi librement par le participant lui-même. Par exemple un ami ou un parent à qui une sensibilisation est faite sur l'importance de son rôle en protégeant le participant et sa confidentialité pourrait jouer ce rôle. La présence du témoin doit être explicitement acceptée par l'individu. La demande de consentement est effectuée par un agent de santé chez qui le patient va en consultation médicale. En effet, les agents de santé ont été formés en GCP, à l'éthique de la recherche et averti de la supériorité de l'intérêt du patient au-dessus de l'intérêt de la recherche. Il a également été mentionné dans la demande de consentement que la participation est volontaire et que la décision de décliner sa participation ou de se retirer ultérieurement n'a aucune conséquence sur la qualité du soin médical.

II.3.2. Surveillance passive de la maladie du sommeil dans les foyers endémiques

La surveillance passive est une stratégie de lutte médicale qui permet de détecter des malades de la trypanosomiase humaine africaine (THA) dans les établissements fixes de santé. Le dépistage est effectué lorsque des patients se présentent dans l'un des centres de santé équipés, à la recherche de soins. Dans cette étude, le dépistage était effectué lorsque le patient rempli les conditions de sa participation. L'étude a duré 29 mois (Août 2017 à Décembre 2019) et a été menée sans interruption dans les 10 centres de santé de la zone d'endémie suivant le protocole de la surveillance passive de la maladie.

II.3.2.1. Critères d'inclusion et d'exclusion

Les critères de participation à l'étude étaient basés sur deux points majeurs chez des patients venus en consultation dans l'un des centres de santé identifiés. Les patients remplissant les critères suivants étaient éligibles à cette étude :

a) Critères d'inclusion

- Visiteurs ou résidents dans une région endémique de THA
- Suspicion clinique de THA basée sur les symptômes et signes cliniques suivants :
 - fièvre de longue durée, rebelle aux traitements antipaludéens ;
 - maux de tête pendant une longue durée (> 14 jours) ;
 - présence de ganglions au niveau du cou (adénopathies cervicales) ;
 - grand amaigrissement ;
 - affaiblissement général ;
 - prurit intense ;
 - aménorrhée, avortement(s) spontané(s), ou stérilité ;
 - coma, convulsion ;
 - problèmes psychiatriques (agressivité, apathie, confusion mentale, hilarité croissante inhabituelle) ;
 - troubles du sommeil (insomnie nocturne et somnolence diurne excessive) ;
 - troubles moteur (mouvements anormaux, tremblement, difficulté à la marche) ;
 - difficulté à s'exprimer.

b) Critères d'exclusion

Les patients chez qui l'un des critères ci-dessous est vérifié n'ont pas participé à l'étude :

- patient précédemment traité pour cas de trypanosomiase humaine africaine (THA) quel que soit le temps écoulé depuis le traitement;
- patient non volontaire refusant ou n'ayant pas signé le consentement éclairé ;
- patient dont l'âge est inférieur à 4 ans.

II.3.2.2. Procédure de diagnostic

L'algorithme de diagnostic (figure 15) a nécessité la formation du personnel des centres de santé. En effet, le personnel soignant n'était pas familiarisé au diagnostic de la THA. Cependant, la zone d'étude étant également endémique au paludisme (Fakih, 2014), les agents de santé étaient déjà habitués à réaliser des tests de diagnostic rapides (TDR) du paludisme. Ces tests sont effectués de la même manière que les TDR de la THA à *Trypanosoma brucei gambiense*. Malgré cette familiarité des agents de santé avec le format TDR, il était nécessaire de les former à nouveau et les sensibiliser pour la prise en compte de la THA dans leur diagnostic quotidien. Des supervisions mensuelles ont permis de faire un suivi continu du déroulement des activités sur le terrain ainsi que de la sensibilisation auprès de la population d'étude. Il a également été essentiel de former le personnel de santé sur la manière d'interpréter les résultats des différents TDR et de les communiquer aux patients. De façon pratique, les agents de santé formés aux divers protocoles de l'étude, ont posé un diagnostic clinique chez des patients venus d'eux-mêmes au centre de santé pour une consultation. Le diagnostic clinique avait pour objectif de rechercher chez le patient un ou plusieurs signes cliniques évocateurs de la maladie du sommeil.

Parmi les centres de santé identifiés, les sites de screening sérologique (SSS) avaient juste la capacité de soulever une suspicion clinique et sérologique de cas de THA. Les suspects sérologiques diagnostiqués dans les SSS ont été automatiquement référés dans les centres de diagnostic et traitement (CDT) pour la prise en charge des tests plus poussés voire pour le traitement en cas de confirmation parasitologique. Au CDT, des échantillons de sang sur papier filtre ont été collectés à partir du sang des suspects sérologiques pour la réalisation des tests de laboratoire, à effectuer ultérieurement au Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES) de Bobo-Dioulasso.

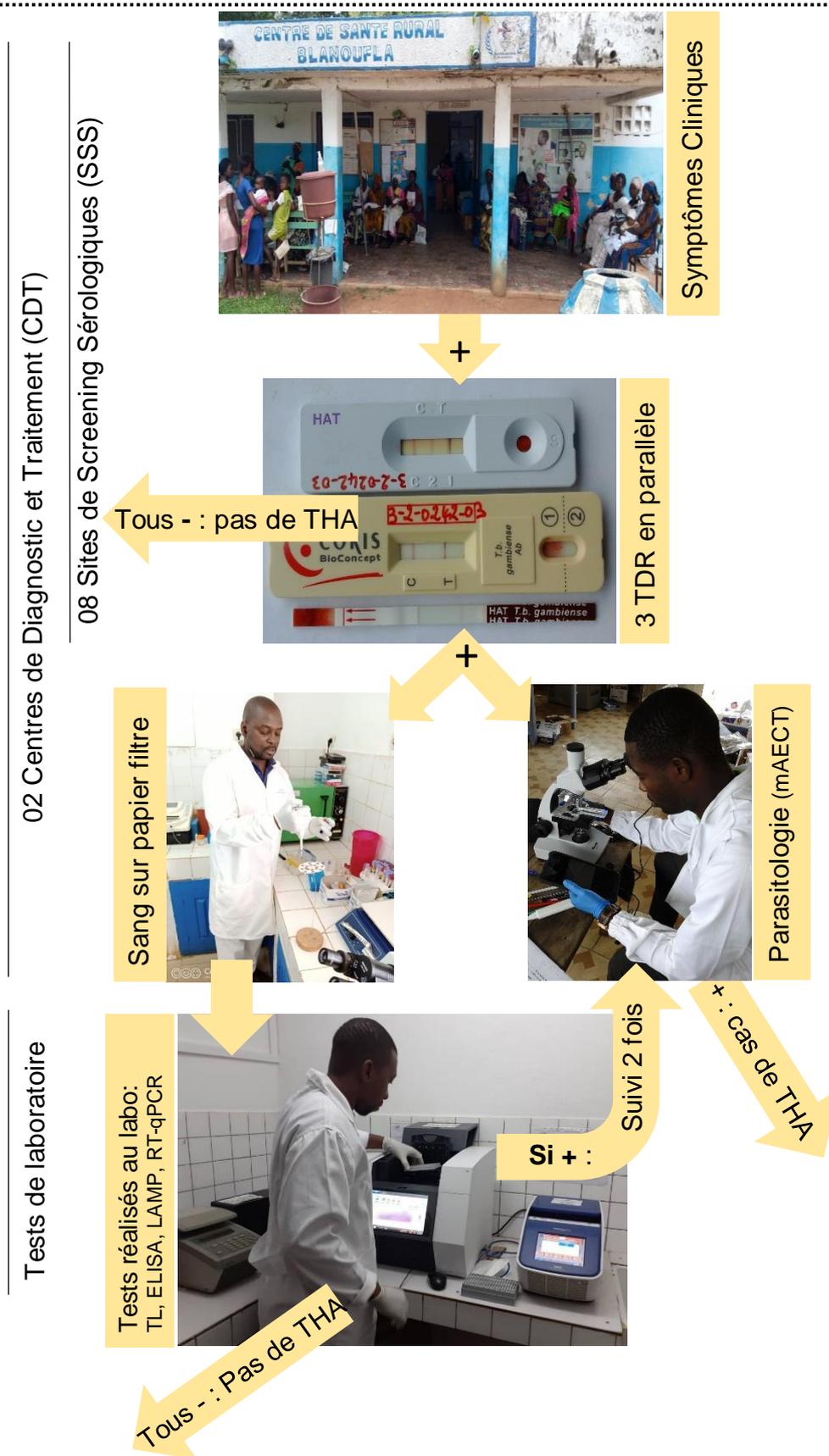


Figure 15: Algorithme diagnostique de la surveillance passive de la trypanosomiase humaine africaine + : positif ; - : négatif

Les résultats des tests réalisés au laboratoire ont été communiqués aux agents de santé dans un délai de un mois. Le rôle de ces tests a été de confirmer ou non la suspicion de la trypanosomiase humaine africaine (THA) chez les suspects sérologiques non encore confirmés en parasitologie afin de refaire les investigations parasitologiques. En résumé, les patients suspectés cliniquement d'être atteints de la THA et remplissant les critères d'inclusion ont été examinés avec trois tests de diagnostic rapides (TDR) simultanément à partir d'un échantillon de sang frais obtenu par une ponction digitale. Les patients ayant au moins un résultat positif à l'un des TDR, ont subi un prélèvement au pli du coude, pour la réalisation des tests parasitologiques (mAECT/sang total). Le même échantillon de sang a été utilisé afin de réaliser des spots sur papier filtre pour des tests au laboratoire. Un examen du suc ganglionnaire était envisageable en cas de présence de ganglions. Dans ce cas, le ganglion au bas du cou est ponctionné avec une seringue et le suc ganglionnaire est déposé entre lame et lamelle puis examiné au microscope au grandissement (X400). Les sujets positifs à la parasitologie ont été aussitôt traités au CDT.

II.3.3. Evaluation des tests diagnostiques

II.3.3.1. Réalisation des tests de diagnostic rapide

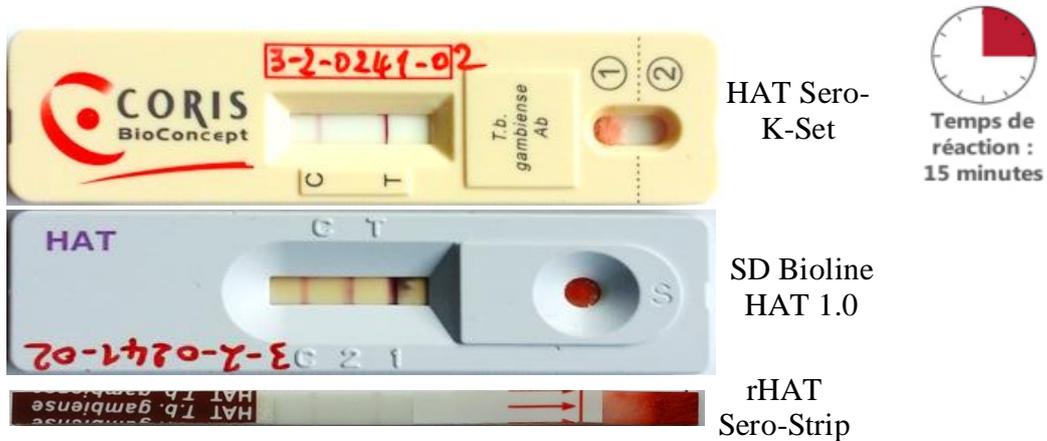
Dans cette étude, trois TDR développés récemment et commercialisés ont été utilisés. Il s'agit de SD Bioline HAT (Abbott Diagnostics, Corée du Sud) (Sternberg *et al.*, 2014 ; Lumbala *et al.*, 2018) ; HAT Sero-K-Set (Coris BioConcept, Belgique) (Büscher *et al.*, 2014) et rHAT Sero-Strip (Coris BioConcept, Belgique) (Büscher *et al.*, 2013). Avant toute procédure le code de l'échantillon a été inscrit sur chacun des TDR. Pour le test rHAT Sero Strip, le code de l'échantillon a été inscrit sur le tube à essai. Les TDR ont été effectués avec du sang frais obtenu par une ponction digitale et les résultats des tests ont été interprétés après 15 minutes avec un délai de lecture allant jusqu'à 5 minutes. Les trois TDR ont été réalisés simultanément en suivant les instructions de procédure d'opération standardisée de chacun des TDR. D'abord, un volume de 70 μ L de sang prélevé a été nécessaire pour la réalisation des trois (3) TDR. Pour les tests HAT Sero-K-Set et rHAT sero-Strip, 25 μ L de sang ont respectivement été introduits dans la fenêtre de dépôt tandis que 20 μ L de sang ont été utilisés pour le test SD Bioline HAT. Ensuite, une solution de tampon de migration a été ajoutée dans la fenêtre de dépôt de chacun des tests permettant l'écoulement ou l'ascension de l'échantillon le long de la membrane par capillarité. Ainsi deux (2) gouttes de tampon ont été ajoutées pour le test HAT Sero K-Set tandis

.....

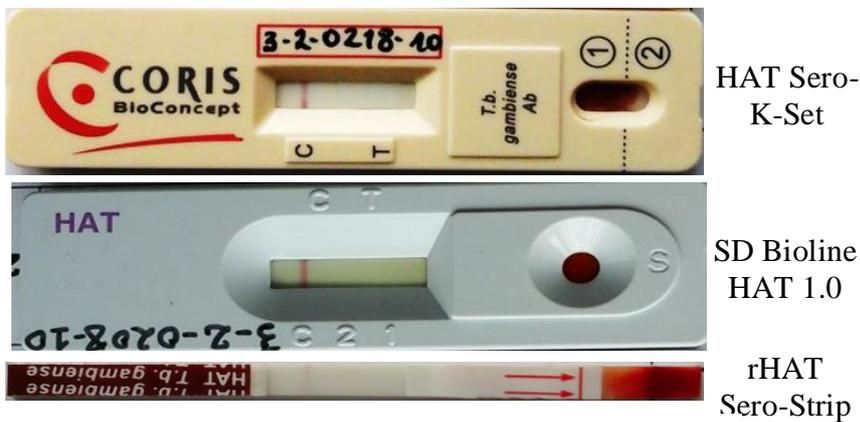
que quatre (4) gouttes ont été utilisées respectivement pour les tests SD Bioline et rHAT Sero-Strip. L'échantillon traverse la zone de deux lignes appelées ligne de test (T) et ligne de contrôle (C) pour les tests HAT Sero-K-Set et rHAT Sero-Strip. Alors que pour le test SD Bioline HAT, l'échantillon traverse trois (3) lignes dont 2 lignes de tests (notées T1 et T2) et une ligne de contrôle. L'interprétation des résultats des différents tests est basée sur la présence ou l'absence de lignes (Figure 16). Un résultat est considéré positif avec les tests Coris lorsque la ligne de contrôle (C) et la ligne de test sont toutes deux visibles. Pour le test SD Bioline HAT, il est positif si la ligne de contrôle (C) et l'une ou les deux lignes de test T1 et T2 sont visibles (Figure 16A). Tout signal positif au niveau des lignes de test doit être considéré comme tel, quelle que soit l'intensité de la ligne de test car celle-ci peut être extrêmement faible. Dans le cas où seule la ligne de contrôle (C) est visible alors le test est négatif (Figure 16B). Si aucune des lignes n'est observée ou seules les lignes de tests sont visibles alors le test est non valide (Figure 16C).

II.3.3.2. Réalisation des tests parasitologiques

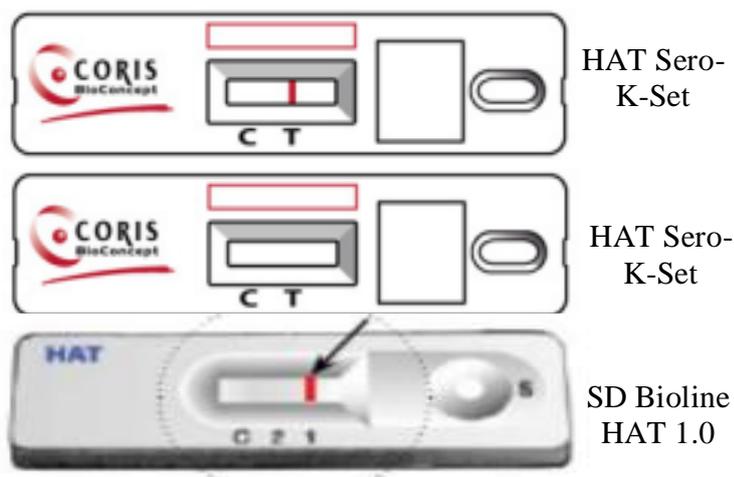
Les tests parasitologiques préconisés dans cette étude ont été la minicolonne ou mAECT (Lanham et Godfrey, 1970 ; Lumsden *et al.*, 1979) et l'examen microscopique du suc ganglionnaire (au grossissement X400) collecté par ponction ganglionnaire (PG) en cas de présence d'adénopathies cervicales. La trousse de mAECT utilisée, provenait de l'Institut national de recherche biomédicale (INRB) de Kinshasa en RDC (modèle INRB/IMT) et le test a été effectué de façon systématique.. Un prélèvement au pli du coude d'un volume de 3 mL environ a été fait dans un tube hépariné (Figure 17A). Le code de l'échantillon a été inscrit sur la mini-colonne avant d'ouvrir le tube collecteur. Le tampon surnageant de la colonne a été transvasé dans le tube de centrifugation contenu dans le kit mAECT. Un volume de 500 µL a été prélevé à l'aide d'une pipette puis déposé délicatement au milieu du filtre de la colonne (Figure 17B). Une fois que le sang a bien pénétré dans le filtre de la colonne, le tampon a été ajouté dans la colonne (Figure 17C). Le tube collecteur a été immédiatement posé en dessous de la colonne afin de recueillir l'éluât. Après quelques minutes d'éluât, le tube collecteur a été refermé puis centrifugé pendant 15 min à 3000 rpm (Figure 17D). Le tube collecteur a été monté dans une chambre de lecture (Figure 17E) puis examiné sous un microscope au grossissement (X200) (Figure 17F). Le test est considéré positif lorsque des trypanosomes sont observés au microscope (Büscher *et al.*, 2009) (Figure 17G).



A. Test de diagnostic rapide avec un résultat positif



B. Test de diagnostic rapide avec un résultat négatif

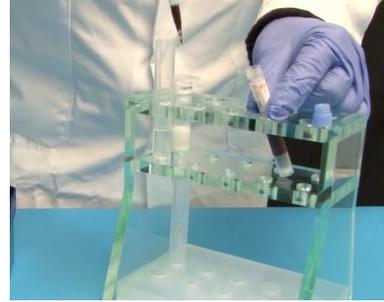


C. Test de diagnostic rapide avec des résultats invalides

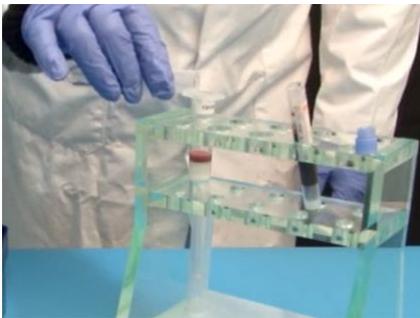
Figure 16: Interprétation du résultat des tests de diagnostic rapides



A. Prélèvement au pli du coude



B. Dépôt de sang dans la minicolonne du test



C. Ajout du reste de tampon dans la minicolonne



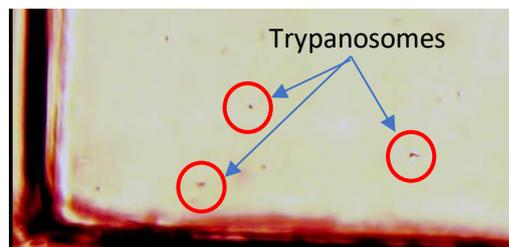
D. Centrifugation de l'éluât du tube collecteur



E. Montage du tube collecteur sous le microscope



F. examen du fond du tube collecteur



G. Observation des trypanosomes si test positif

Figure 17: Les étapes de réalisation du test parasitologique mAECT

II.3.3.3. Réalisation des tests de laboratoire

II.3.3.3.1. Préparation des papiers filtres

Une partie de l'échantillon de sang prélevé au pli du coude a été utilisée pour préparer des papiers filtres. Deux catégories de papiers filtres ont été préparées en fonction du test à réaliser au laboratoire. Le papier filtre Whatman No.4 (11 cm de diamètre) a été préparé pour la réalisation des tests de l'ELISA *T. b. gambiense*, la trypanolyse (TL) et la qPCR. La catégorie du papier filtre Whatman No. 1001 (47 mm de diamètre) a été préparée pour la réalisation du test LAMP (Figure 18A). Pour chaque échantillon de suspect sérologique, la réalisation des deux papiers filtres (Whatman 1001 et Whatman No.4), les indications comme le code du participant, la date et la nature du papier filtre (W1 pour Whatman 1001) et (W4 pour Whatman No.4) ont été inscrites sur le bord de chacun des papiers filtres réalisés. Les papiers filtres ont été ensuite montés sur des tiges de fer pour permettre leur séchage à l'air ambiant (Figure 18B). L'échantillon étalé sur le W1 a subi un traitement dans du dodécylsulfate de sodium (SDS 5%) qui a permis de lyser les cellules sanguines avant d'être étalé sur le papier filtre. A l'aide d'une micropipette, 20 µL de solution SDS 5% ont été déposés dans un tube Eppendorf et un volume de 180 µL de sang hépariné y a été ajouté. La solution obtenue est homogénéisée, puis laissée incuber avec le SDS 5% pendant 5 minutes entraînant la lyse des globules rouges. Un volume de 40 µL de sang traité avec le SDS 5% a ensuite été étalé en 2 tâches sur le papier filtre puis séché pendant 1 heure à l'air ambiant et à l'abri du soleil et des insectes. Quant au W4, le papier a d'abord été divisé à l'aide d'un crayon en huit zones d'aire égale puis 30 µL de sang ont directement été déposés en 16 tâches sur le papier filtre à raison de 2 tâches de sang par zone. Les tâches de sang ont été disposées de sorte qu'ils ne se touchent pas (Figure 18C). Après séchage des papiers filtres, les codes des participants ont également été recopiés sur des petites enveloppes en papier (enveloppes de type A6) dans lesquelles chaque papier filtre correspondant a été placé (Figure 18D). Pour la conservation des échantillons de papiers filtres, les enveloppes ont été placées par lot de 10 au maximum dans un sachet en plastique à fermeture hermétique (sachet de type Zip-Lock) et 35g de gel de silice ont été ajoutés (Figure 18E). Les sachets zip-lock ont été ensuite placés dans des grandes enveloppes (enveloppes de type A4) bien emballés et conservés à température ambiante. Le sang séché sur du papier filtre permettra de réaliser des tests au laboratoire.



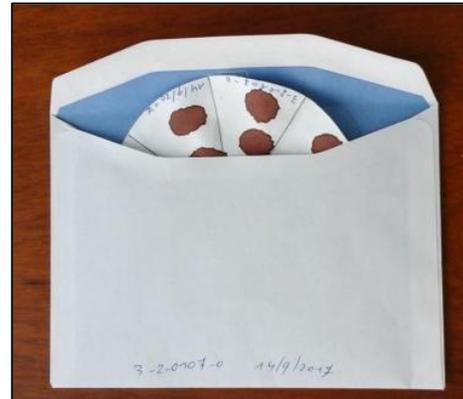
A. Papier filtres (Whatman 1 & 4)



B. Tige de séchage



C. dépôt de sang sur papier filtre W4



D. Papier filtre placé dans une enveloppe



E. Echantillon dans un sachet zip-lock contenant du gel de silice

Figure 18: Etapes de réalisation d'échantillon sur papier filtre

II.3.3.3.2. Réalisation de la trypanolyse (TL)

Pour réaliser la trypanolyse (TL) (Van Meirvenne *et al.*, 1995), des trypanosomes vivants ont été incubés avec l'échantillon à tester et du sérum de cobaye (complément). Dans le but d'obtenir des trypanosomes vivants, des souris ont été inoculées (3 souris /variant antigénique) avec les souches de *T. b. gambiense* portant les variants antigéniques LiTat 1.3 et LiTat 1.5. Après avoir atteint une parasitémie de niveau d'antilog de 8.1 ou 8.4 trypanosomes par millilitre de sang en trois ou quatre jours, les souris ont été tuées afin de récolter le sang contenant les trypanosomes. Du sérum de cobaye collecté grâce à une ponction cardiaque chez des cobayes puis conservé au congélateur, a été utilisé comme complément dans la réaction anticorps-antigène. Ainsi, un volume nécessaire de sérum de cobaye (80 μ L par échantillon ou environ 8 mL par microplaque) a été décongelé pendant 30 minutes à température ambiante.

Pour chacune des souches, un volume de sang ayant une parasitémie de 10^7 trypanosomes/mL a été utilisé. Des dilutions ont été faites avec du sérum de cobaye préalablement récolté afin d'ajuster la parasitémie du sang récolté à 5 trypanosomes par champ (grossissement X400). Les papiers filtres ont été découpés en petits cercles ou confettis à raison de 2 confettis par papier filtre à l'aide de perforateur de 6 mm. Les confettis ont été déposés au fond des puits de la plaque selon un ordre bien défini. Le premier et le second puits contiennent respectivement le témoin positif (sérum humain de malade de la THA) et le témoin négatif (papier filtre vierge). Ensuite, un volume de 40 μ L de sérum de cobaye (complément) a été distribué dans chaque puits et la plaque a été agitée à une vitesse maximum pendant 1 heure.

Après l'incubation, 10 μ L de la solution de sang parasité préparée à 5 trypanosomes par champ ont été ajoutés dans chaque puits pour un volume total de 50 μ L. La plaque a été agitée à vitesse maximum pendant 10 secondes puis incubée pendant 90 minutes à température ambiante. Dans la phase d'incubation, la plaque a été agitée pendant 10 secondes à vitesse maximum toutes les 15 min. Le surnageant (8 μ L) de chaque puits a été observée au microscope (au grossissement X400) en commençant par les témoins (positif et négatif). Au moins 10 champs ont été lus en notant le pourcentage de lyse. Le test a été interprété positif si son pourcentage de lyse $\geq 50\%$. L'échantillon est positif à la TL lorsque le test d'un des deux variants antigéniques a été positif.

II.3.3.3.3. Réalisation du test ELISA/*T. b. gambiense*

Pour cette étude, le principe de l'ELISA/ *T. b. gambiense* (Voller *et al.*, 1975 ; Liu *et al.*, 1989) consistait à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon de sang séché sur papier filtre W4. Les réactifs majeurs utilisés ont été les antigènes (GVS LiTat 1.3 et LiTat 1.5 de *T. b. gambiense*, lyophilisés en quantités de 1 mg, produits par l'Institut de Médecine Tropicale, Anvers), le conjugué : chèvre anti-IgG humain (H+L)-peroxidase (Jackson, 109-035-003), du chromogène ABTS (Sigma-Aldrich, réf. 11112422001) et le tampon substrat ABTS (Sigma-Aldrich, réf. 11112597001). Les résultats du test ont été validés en présence de contrôle positif (sérum humain de patient THA) et de contrôle négatif (sérum humain négatif pour THA). Le test a été réalisé en plusieurs étapes à savoir de la préparation des tampons jusqu'à la lecture du test.

Plusieurs réactifs comme $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (137,99 g/mol), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (177,99 g/mol), NaCl (58,44 g/mol), NaN_3 (6,01 g/mol), lait écrémé (Sigma-Aldrich, réf. 70166-500G), Sacrose 1 kg (VWR, 1076511000), Glycérol 87%(VWR, réf. 1.04094.1000) ont servi à la préparation des différents tampons (Annexe VI).

La procédure de réalisation du test a débuté par la préparation des antigènes qui sont conditionnés sous la forme lyophilisée. Ils ont été reconstitués avec 1 mL d'eau distillée pour obtenir une concentration de 1 mg/mL. La solution obtenue avec l'antigène dissout a été répartie en volumes de 100 μL dans des microtubes de 0,5 mL et le tube marqué a été conservé à -80°C . Plus tard, les antigènes ont été utilisés pour préparer plusieurs microplaques ELISA afin de les rendre sensibles aux anticorps de *T. b. gambiense* puis elles ont été conservées au congélateur avant usage. Un tube de 100 μL de chaque antigène a été décongelé. Pour rendre sensible une microplaque, un volume de 8 mL de PB 0,01M, pH 6,5 a été mesuré avec un tube Falcon de 15 mL. Une dilution de 1/1000 de chaque antigène a été faite dans du tampon PB (8 μL de LiTat 1.3 (solution 1 mg/mL) et 8 μL de LiTat 1.5 (solution 1 mg/mL) dans 8 mL de tampon PB). Avec un marqueur, la microplaque a été divisée en deux en traçant une ligne verticale entre les colonnes 6 et 7 (Figure 19). Seul le côté gauche a été rendu sensible et chacun des côtés de la plaque a été marqué (le contenu et la date de sensibilisation (LiTat 1.3 + 1.5 jj/mm/aaaa)). A l'aide d'une micropipette multicanaux, 150 μL de la solution d'antigènes LiTat 1.3 et LiTat 1.5 ont été déposés dans chacun des puits des colonnes 1 à 6 de la microplaque.

	Antigènes = LiTat 1.3 + LiTat 1.5 VSG						Sans antigènes					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C+	5	5	13	13	C+	C+	5	5	13	13
B	C+	C+	6	6	14	14	C+	C+	6	6	14	14
C	C-	C-	7	7	15	15	C-	C-	7	7	15	15
D	CC	CC	8	8	16	16	CC	CC	8	8	16	16
E	1	1	9	9	17	17	1	1	9	9	17	17
F	2	2	10	10	18	18	2	2	10	10	18	18
G	3	3	11	11	19	19	3	3	11	11	19	19
H	4	4	12	12	20	20	4	4	12	12	20	20

C +: Contrôle positif, C : Contrôle négatif, CC : Contrôle conjugué

Figure 19: Exemple de plan d'utilisation de la microplaque pour le test ELISA/*T. b. gambiense*

Les colonnes 7 à 12 ont été laissées vides (sans antigène). La microplaque a été couverte et laissée pour incubation pendant toute une nuit à 4°C. Pour cette étape de sensibilisation, le but est de permettre que l'antigène se fixe de manière électrostatique au fond des puits. Le lendemain, la microplaque a été retirée du frigo et la solution d'antigènes a été vidée par retournement de la plaque. Chaque puits de la microplaque a été de nouveau rempli avec 350 µL de PBS-Blotto et la plaque a été laissée incuber pendant une heure à température ambiante. Cette étape est la saturation de la microplaque.

Suite à cette étape, les échantillons ont été préparés dans des tubes d'élution suivant le numéro d'ordre de série. A l'aide d'un perforateur, un confetti de 6 mm de chaque échantillon de sang séché sur papier filtre a été coupé et mis dans le tube d'élution. Puis, 720 µL de tampon PBS-Blotto-Tween ont été ajoutés dans les tubes d'élution et l'élution a été faite pendant toute une nuit à 4°C.

Le test ELISA/T. *b. gambiense* proprement dit a été réalisé en plusieurs phases de lavage et d'incubation de la microplaque. Tout d'abord, les échantillons ont été retirés du réfrigérateur ainsi que la microplaque du congélateur. Les échantillons ont été mélangés à l'aide d'un vortex, ensuite, les sérums de contrôles positif et négatif ont été dilués avec du PBS-Blotto-Tween (une dilution de 1/150 c.-à-d. 10 µL de sérum de contrôle dans 1,5 mL de PBS-Blotto-Tween).

La microplaque a subi un premier lavage (rincer 3 fois avec 350 µL PBS-Tween par puits de la microplaque pendant minimum 1 seconde) ensuite, les échantillons et les contrôles ont été déposés dans les puits selon le plan suivant:

- i) 150 µL de contrôle positif ont été déposés dans les puits A1, A2, B1, B2, A7, A8, B7 et B8 ;
- ii) 150 µL de contrôle négatif ont également été déposés dans les puits C1, C2, C7 et C8; ainsi que 150 µL de PBS-Blotto-Tween (contrôle conjugué) dans les puits D1, D2, D7 et D8 (Figure 19) ;
- iii) 150 µL d'éluât du premier échantillon ont été déposés dans les puits E1 et E2 (avec antigène) et les puits E7 et E8 (sans antigène).

Cette technique a été répétée pour les autres échantillons selon le schéma de la figure 19 puis la microplaque a été laissée pour incubation pendant 30 minutes.

Un second lavage de la microplaque a été réalisé à raison de 3 fois pendant une seconde avec 350 µL PBS-Tween et vidée après le dernier lavage. Pour l'incubation du conjugué à la

peroxydase (AffiniPure Goat (Anti-Human IgG, Jackson Immuno Research)), il a d'abord été dilué (dilution 1:40000) dans du PBS-Tween en deux étapes à savoir 5 μ L dans 0,5 mL et puis 100 μ L de cette dilution dans 40 mL. Ensuite 150 μ L du conjugué dilué ont été déposés dans chaque puits de la microplaque et elle a été laissée pour incubation pendant 30 minutes. Après cette incubation du conjugué, la plaque a été lavée à nouveau 5 fois pendant une seconde avec 350 μ L de PBS-Tween par puits et vidée après le dernier lavage.

Dans chaque puits de la microplaque, 150 μ L de solution substrat/chromogène (ABTS) ont été déposés et la plaque a été laissée pour incubation pendant 1 heure dans l'obscurité. L'incubation de ce substrat/chromogène est spécifique à l'enzyme et permet de transformer et induire une coloration bleue de la réaction s'il y a présence de l'anticorps recherché (Figure 20).

L'intensité de la coloration a été proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés. Les densités optiques (DO) ont été lues à 415 nm et le fichier a été sauvegardé avec les données brutes. Les résultats de la réaction ELISA/*T. b. gambiense* ont été interprétés comme suit :

- le test était négatif si la DO de l'échantillon se situe entre 0-30 d'après le pourcentage de positivité du contrôle positif ;
- le test était positif lorsque la DO de l'échantillon est supérieur à 30 selon le pourcentage de positivité du contrôle positif.

Des cas de rejet de résultats ont été observés lorsque la différence entre deux répétitions d'un échantillon ou d'un sérum de contrôle était trop grande.

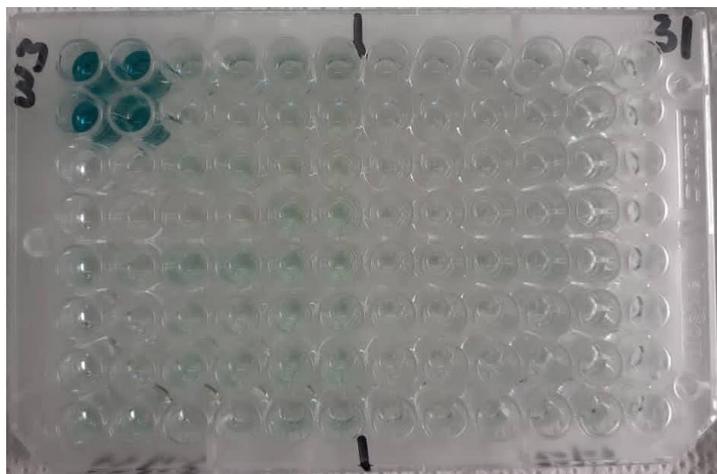


Figure 20: Microplaque ELISA/*T.b.gambiense* avec révélateur chromogène

II.3.3.3.4. Réalisation du test PCR en temps réel (qPCR)

Pour la réalisation de la qPCR en temps réel (Mumba *et al.*, 2014 ; Compaoré *et al.*, 2020a), une extraction d'ADN à partir du sang séché sur du papier filtre Watman N°4 (W4) a été effectuée.

II.3.3.3.4.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique qui a été extrait à partir du sang séché sur du papier filtre est un mélange d'ADN génomique de l'hôte et celui des trypanosomes si le sujet est infecté. Ce processus a été réalisé en utilisant le QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Le principe d'extraction s'est fait en plusieurs étapes successives (lyse, fixation, lavage et élution). Les tampons contenus dans le kit d'extraction ont été tout d'abord vérifiés et certains ont été reconstitués pour leur premier usage.

Les papiers filtres ont été sortis de leur enveloppe et à l'aide de perforateur, trois confettis de 6 mm de diamètre ont été découpés sur chaque échantillon (Figure 21A) et mis dans un tube Eppendorf. Du tampon ATL (180 µL) (Figure 21B) puis de la protéinase K (20 µL) ont été ajoutés dans les tubes et ont été mixés à l'aide d'un vortex. L'incubation des tubes a été faite à 56°C pendant 1 heure et chaque 10 minutes les tubes ont été retirés et mixés pendant 10 secondes avec le vortex. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 5 secondes à vitesse maximale dans une micro centrifugeuse pour faire descendre des gouttes qui peuvent se former dans les bouchons des tubes Eppendorf. A ce stade, du tampon AL (200 µL) a été ajouté et les tubes ont été mixés pendant 10 secondes puis incubés pendant 10 minutes à 70°C. Au cours de cette incubation, chaque 3 minutes, les tubes étaient mixés pendant 10 secondes sur le vortex. Les tubes ont été centrifugés de nouveau pendant 5 secondes à vitesse maximale et à l'aide d'une micropipette, tout le contenu a été soigneusement transféré dans des colonnes (QIAamp MinElute) marquées, sans toucher la paroi de la colonne. Les colonnes ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 1 minute et montées sur de nouveaux tubes collecteurs (2 mL). Du tampon AW1 (500 µL) a été ajouté dans les colonnes et elles ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 1 minute. Les colonnes ont été placées sur de nouveaux tubes collecteurs, un volume de 500 µL de Tampon AW2 y a été ajouté. Les colonnes ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 1 minute. Ensuite, les mêmes colonnes ont été posées sur de nouveaux tubes collecteurs puis centrifugées à vitesse maximale (14000 rpm) pendant 3 minutes pour sécher la membrane des colonnes.



A. Découpage des taches de sang du papier filtre en confettis



B. Ajout du tampon ATL dans les tubes contenant les confettis

Figure 21: Extraction de l'ADN génomique à l'aide de QIAamp DNA Micro Kit

.....

Chaque colonne a été placée sur un tube Eppendorf propre et marqué avec les codes et la date de prélèvement des échantillons. Le tampon d'éluion (50 µL de tampon EA) a été ajouté dans les colonnes au milieu de la membrane, elles ont été incubées pendant 1 minute à température ambiante puis centrifugées pendant 1 minute à vitesse maximale (14000 rpm). L'ADN génomique des échantillons (un précipité blanchâtre) a été conservé dans des tubes Eppendorf à -20°C.

II.3.3.3.4.2. Procédure de la PCR en temps réel (qPCR)

a) Principe de la qPCR

Une machine de type **Agilent-AriaMx, Version 1.0** a été utilisée pour la réalisation de la qPCR. Le principe de la qPCR a été réalisé en 3 étapes à savoir la préparation d'un mix pour la réaction PCR et sa distribution dans les puits d'une plaque à 96 puits. Ensuite l'ajout des échantillons d'ADN et des contrôles positif et négatif dans les puits. Enfin, la mise en route de la machine Agilent-AriaMx pour la réaction de qPCR.

b) Protocole de réalisation de la qPCR

Un premier test (qPCR m18S) a été réalisé sur tous les échantillons en utilisant des amorces permettant la détection du sous-genre *Trypanozoon*. Le deuxième test de la qPCR ciblant le gène TgsGP spécifique à *T. b. gambiense* a été appliqué uniquement sur les échantillons positifs en qPCR m18S.

Des amorces spécifiques pour l'amplification de l'ADN et une sonde TaqMan pour la détection d'amplicons en temps réel ont été utilisées. Pour réaliser les deux tests, le matériel, les réactifs et le mode opératoire ont été les mêmes sauf les séquences des amorces et sondes:

- Séquences d'amorces et sonde pour la qPCR ciblant le gène 18S (qPCR m18S)

Amorce sens: **m18S-II-F-Tb** 5'-CGTAGTTGAACTGTGGGCCACGT-3'

Amorce anti-sens: **m18S-II-R-Tb** 5'-ATGCATGACATGCGTGAAAGTGAG-3'

Sonde taqman: **m18S-II-probe** 5'-FAM-TCGGACGTGTTTTGACCCACGC-BHQ1-3'

- Séquences d'amorces et sonde pour la qPCR ciblant le gène TgsGP (qPCR TgsGP)

Amorce sens: **Tgs-F** 5'-GGCTGTACGGACTTGCTCA-3'

Amorce anti-sens: **Tgs-R** 5'-CTTGCAGATGCCTCGCACAC-3'

Sonde taqman: **Tgs-probe** 5'-FAM-ACGGCGGTATCGACGGCGGCAGTGA-BHQ1-3'

c) Préparation du mix qPCR et préparation de la plaque

Les amorces ou sonde étant lyophilisées, elles ont été reconstituées avec du tampon TE à la concentration 1X à 100 μM afin d'obtenir des solutions mères. Des aliquots de 100 μL ont été préparés dans des tubes Eppendorf (1,5 mL) marqué avec le nom de l'amorce/sonde ainsi que la concentration (100 μM) et la date de préparation. Les tubes contenant la sonde ont été protégés avec du papier aluminium contre la lumière. Des solutions de travail ont été préparées pour chaque amorces et sondes par dilution de la première solution (solution mère) avec de l'eau grade biologie moléculaire pour obtenir une concentration de 20 μM (une dilution de 5 fois à partir de la solution mère 100 μM). Le mix de la réaction de qPCR a été préparé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et les volumes à ajouter au Master Mix ont été calculés en tenant compte du témoin positif et négatif (Figure 22A). Le tableau III illustre le mode de calcul de ces réactifs. Dans chaque puits de la microplaque, 20 μL du mix PCR ont été déposés sauf le puits correspondant au témoin négatif de la PCR (NTC) dans lequel le mix PCR a été remplacé par de l'eau grade biologie moléculaire. Hors de la hotte, 5 μL d'ADN de l'échantillon ont été ajoutés dans les puits correspondants et l'ensemble a été mélangé avec la pipette (en faisant des va et vient). Enfin, un volume de 5 μL du contrôle positif de PCR a été ajouté dans le puits correspondant (ADN *T.b. gambiense*). Le volume final de la réaction était de 25 μL par puits. La plaque a été scellée avec du plastique optique afin d'éviter l'évaporation pendant la PCR. La plaque a été centrifugée à 2700 rpm pendant une minute à 4°C.

Ensuite, la plaque a été introduite dans la machine Agilent-AriaMx (Figure 22B) et le plan de plaque a été vérifié au niveau de l'ordinateur et les conditions d'amplification ont été les suivantes : une dénaturation initiale (deshydrider l'ADN double brin) à 95°C pendant 5 min, ensuite l'hybridation des amorces à 60°C pendant 30s, enfin l'élongation à 72°C pendant 30s. A la fin du programme, les données ont été automatiquement sauvées dans le dossier "expérience" de l'ordinateur et l'interprétation des résultats s'est faite en fonction des valeurs de quantification de cycle (Cq) obtenues (Figure 22C). Les échantillons présentant un Cq <40 étaient positifs.

Tableau III: Composition du mix pour la qPCR

	Concentration initiale	Concentration Finale	Réaction dans 25µL	
			1 échantillon (µL)	M échantillons (µL)
Master Mix	2X	1X	12,5	M x 12,5
Amorce F	20 µM	0.2 µM	0,25	M x 0,25
Amorce R	20 µM	0.2 µM	0,25	M x 0,25
Sonde	20 µM	0.2 µM	0,25	M x 0,25
Eau			6,75	M x 6,75

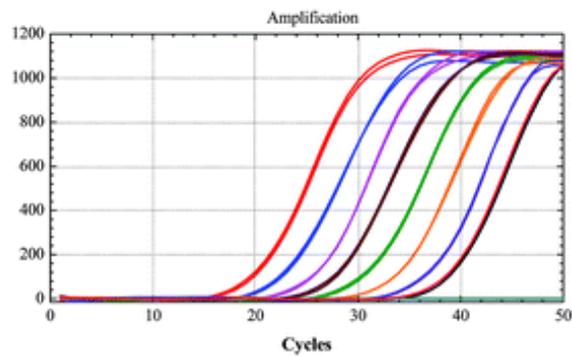
Master Mix = dNTPs + Taq polymérase + tampon + MgCl₂



A. Préparation du mix de la réaction qPCR



B. Insertion de la microplaque dans la machine qPCR



C. Interprétation des résultats sauvegardés sous forme de Courbes d'amplification

Figure 22: Etapes de réalisation de la qPCR

II.3.3.3.5. Réalisation de la LAMP

Le présent protocole pour la LAMP (Kuboki *et al.*, 2003 ; Njiru *et al.*, 2008; Matovu *et al.*, 2020) cible une séquence répétitive (RIME) qui est spécifique pour le sous-genre *Trypanozoon*. Deux grandes étapes ont été considérées dans l'application du test LAMP.

II.3.3.3.5.1. Extraction de l'ADN

A l'aide d'un perforateur, deux confettis de 6 mm de diamètre ont été coupés sur chacun des papiers filtres Whatman N°1 (W1) et mis dans les tubes Eppendorf stériles correspondants aux numéros inscrits sur les différents échantillons. Pour le témoin négatif d'extraction, deux confettis de papier filtre W1 vierge ont été également coupés puis 100 µL de l'eau biomoléculaire ont été ajoutés dans tous les tubes. Les tubes ont été mixés au Vortex puis centrifugés à vitesse maximale (14 000 rpm). Ils ont été incubés à 90°C pendant 10 minutes puis centrifugés pendant 3 minutes à vitesse maximale. Les cellules sanguines étant lysées avec du SDS lors de la préparation du papier filtre sur le terrain alors le surnageant contient l'ADN extrait prêt à être utilisé pour la réaction LAMP.

II.3.3.3.5.2. Réaction LAMP

La méthode de la LAMP a été réalisée avec une machine de type incubateur LAMP Génie III (OptiGene Ltd). Cette méthodologie s'est déroulée en trois étapes à savoir la préparation d'un strip LAMP pour obtenir les solutions avec le mix LAMP, suivi de l'ajout des échantillons d'ADN et de contrôles positif et négatif puis de la mise en route de la machine Genie III de OptiGene et de la lecture du résultat (Figure 23). Le kit LAMP (Loopamp *Trypanosoma brucei* assay; Eiken Chemical Co Ltd, Japan) composé de huit (8) tubes ou strips a été utilisé pour préparer le mix réactionnel. Les tubes du kit ont été marqués et le tampon contrôle négatif contenu dans le kit a été déposé dans chacun des tubes (25 µL pour le témoin négatif et 20 µL pour le reste des tubes à tester). Hors de la paillasse de préparation du mix réactionnel, 5 µL de chaque échantillon (solution d'extraction) ont été ajoutés dans les tubes correspondants. Pour le tube du contrôle positif, 25 µL du tampon contrôle positif ont été ajoutés. Dans un premier temps, les tubes ont été tournés à l'envers et secoués fermement afin que la solution se déplace dans l'intérieur des capuchons des tubes où les réactifs sont présents. Ce processus a permis de

reconstituer le réactif LAMP (Figure 23A). Dans un second temps, les tubes ont été placés à l'envers sur la paillasse pendant 2 minutes.

Ces rotations de tubes ont été effectués 5 fois et à chaque inversion, les tubes ont été agités afin d'obtenir un mélange homogène pour la réaction LAMP. Ensuite, les tubes ont été immédiatement placés dans l'incubateur LAMP à 65°C pendant 40 minutes (Figure 23B). A la fin de la réaction, les résultats ont été visualisés sur l'écran de la machine et sauvés automatiquement dans le dossier Log de la machine Génie III. Pour la lecture avec la méthode de fluorescence, le strip a été retiré de l'incubateur LAMP et a été placé dans l'unité de fluorescence (Figure 23C). L'échantillon est positif si la fluorescence est présente (l'échantillon brille), cela signifie que l'échantillon contient de l'ADN des trypanosomes. Dans le cas contraire, l'échantillon est négatif (pas de fluorescence et l'échantillon ne brille pas). Ce résultat signifie que l'échantillon ne contient pas d'ADN des trypanosomes (Figure 23D).

II.3.3.4. Evaluation de la performance des tests diagnostiques

L'étude d'outils d'aide à la prise de décision sanitaire comme les tests de dépistage ou de diagnostic nécessite entre autres, d'estimer l'incertitude liée à la détection de la maladie. Dans une situation idéale, la détection de la maladie serait réalisable de manière directe et immédiate, sur la base de signes cliniques pathognomoniques exprimés de manière constante chez tous les individus atteints. En réalité, la détection d'une maladie n'est pas aussi simple. Les individus infectés peuvent exprimer les signes cliniques de manière variable selon l'évolution de la maladie et l'ancienneté de l'infection et ces signes peuvent être plus ou moins spécifiques. Il est alors nécessaire de recourir à l'utilisation de tests de dépistage ou de diagnostic afin d'apporter un appui au clinicien, mais là encore, les résultats obtenus nécessitent une interprétation selon les indices disponibles (fiabilité du test, contexte épidémiologique, profil de l'individu testé, ...). Comme vu précédemment, les plans de lutte collective contre la THA reposent en partie sur l'utilisation de tests fournissant des informations sur le statut des individus vis-à-vis de la maladie. La connaissance de leurs limites est indispensable à la rationalisation des décisions sanitaires prises sur la base des résultats qu'ils fournissent.

En somme, l'interprétation des résultats fournis par un test de diagnostic nécessite de connaître à la fois les caractéristiques du test utilisés mais également le contexte épidémiologique dans lequel le diagnostic ou le dépistage est réalisé.



Figure 23: Réalisation de la LAMP avec la machine de type incubateur LAMP Génie III (OptiGene)

A. Préparation du strip LAMP ; B. Insertion du strip dans l'incubateur LAMP ; C. Unité de visualisation à la lumière fluorescente des résultats de la LAMP ; D. résultats lus à la lumière fluorescente.

En pratique, l'évaluation des tests disponibles pour la conception d'un algorithme de dépistage nécessite en premier lieu la comparaison de leurs caractéristiques intrinsèques, qui doivent être déterminées par rapport à une référence fournissant une information sur le statut de l'individu vis-à-vis de l'agent pathogène dépisté (infecté ou indemne). Le « gold standard » utilisé étant la minicolonne avec une spécificité de 100%, il est qualifié d'un « gold standard » négatif.

Dans cette étude, l'estimation de la performance des tests a été faite de façon directe et les résultats des tests étudiés ont tous été comparés au même test de référence.

II.3.3.5. Analyses des données

Les données récoltées sur le terrain ont été consignées dans le tableau Excel du logiciel Microsoft Office Excel (Version 2016). Ce fichier Excel a permis d'organiser les données récoltées afin de constituer les bases de données de l'étude. L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R et ses interfaces (Core R Team R; 2018). Les données quantitatives ont été exprimées en médiane et les variables catégorielles ont été exprimées en fréquence.

II.3.3.5.1. Détermination des caractéristiques de la population d'étude

a) Test binomial

Le test binomial, également appelé test exact binomial, est une approche non paramétrique qui a permis de tester si la répartition des signes cliniques observés au niveau du genre était aléatoire. A l'instar du test exact de Fisher, le test binomial est connu comme une alternative au test du χ^2 de Pearson lorsque la configuration des effectifs ne permet pas son application.

b) Test de χ^2 d'indépendance de Pearson

Ce test a permis d'apprécier l'existence ou non d'une relation entre deux variables nominales. La répartition des symptômes et signes cliniques a été comparée dans les foyers prospectés au moyen de ce test. En d'autres termes, les fréquences d'observation des différents signes cliniques dépendent-elles du foyer? Le test a également été utilisé pour établir une relation entre la séroprévalence et l'âge ainsi qu'entre les symptômes et signes et le genre.

c) Test exact de Fisher

Considéré comme alternatif au test de Chi^2 lorsque les effectifs théoriques sont inférieurs à 5, le test exact de Fisher a été utilisé pour les analyses de variables nominales telles que le sexe en fonction du statut des individus. Aussi, ce test a été utilisé pour les signes cliniques en fonction du foyer et du statut de l'individu. Comme le test de Chi^2 , il est réalisé à partir d'un tableau de contingence.

II.3.3.5.2. Détermination des paramètres épidémiologiques de la THA

II.3.3.5.2.1. Calcul des prévalences de la THA

La prévalence de la THA et la séroprévalence ont été calculées dans la population d'étude en relation avec le test appliqué à cette population. La prévalence (P) de la THA dans la population a été calculée comme étant le rapport entre le nombre (n) de cas confirmés par les tests parasitologiques et le nombre de sujets examinés (N). Cette valeur peut être rapportée en pourcentage.

$$P = \frac{n}{N} \times 100$$

La séroprévalence (p) est une expression de la prévalence apparente (Pa) obtenue sur le terrain suite à un dépistage sérologique. Elle a été calculée comme étant le rapport entre le nombre (x) de sujets positifs à chacun des tests sérologiques de terrain et le nombre de sujets examinés (N) et exprimée en pourcentage. La formule de calcul est la suivante:

$$p = \frac{x}{N} \times 100$$

L'intervalle de confiance des estimations de la prévalence et la séroprévalence peut être calculé avec la formule ci-dessous (Daniel, 1991), basée sur la loi binomiale normale (p étant la séroprévalence et n le nombre total de prélèvements testés).

$$P \pm 1,96 \sqrt{\frac{(1 - P)P}{n}} \times 100\%$$

La séroprévalence a également été calculée pour les combinaisons de TDR en se basant sur une interprétation des résultats en parallèle (c'est-à-dire tous les résultats des tests ont été lus simultanément) ou en série (en considérant certains résultats avant d'autres). La formule suivante a été utilisée:

$$p = \frac{Z}{N} \times 100$$

Le nombre d'individus positifs à la combinaison (en série ou en parallèle) des tests est noté Z et N le nombre de patient examinés.

Par ailleurs, pour une maladie identifiée à l'aide d'un test de dépistage, la valeur de la prévalence apparente est plus ou moins éloignée de celle de la prévalence réelle. La distance est fonction de la sensibilité et de la spécificité du test utilisé pour l'identification de la maladie ainsi que de sa prévalence réelle. Un test peu sensible sous-estime la prévalence réelle de la maladie (beaucoup de malades ou infectés ne sont pas détectés par le test) tandis qu'un test peu spécifique surestime la prévalence réelle de la maladie (beaucoup de patients sains ou non-infectés ont un résultat positif). La figure 24 traduit la relation entre la prévalence réelle et la prévalence apparente. Quand on connaît la sensibilité et la spécificité d'un test, on peut calculer l'erreur inhérente au test et donner une estimation de la prévalence réelle de la maladie en utilisant le calcul suivant:

$$\text{Prévalence réelle (Pr)} = \frac{\text{Prévalence apparente (Pa)} + \text{Spécificité (Sp)} - 1}{\text{Sensibilité (Se)} + \text{Spécificité (Sp)} - 1}$$

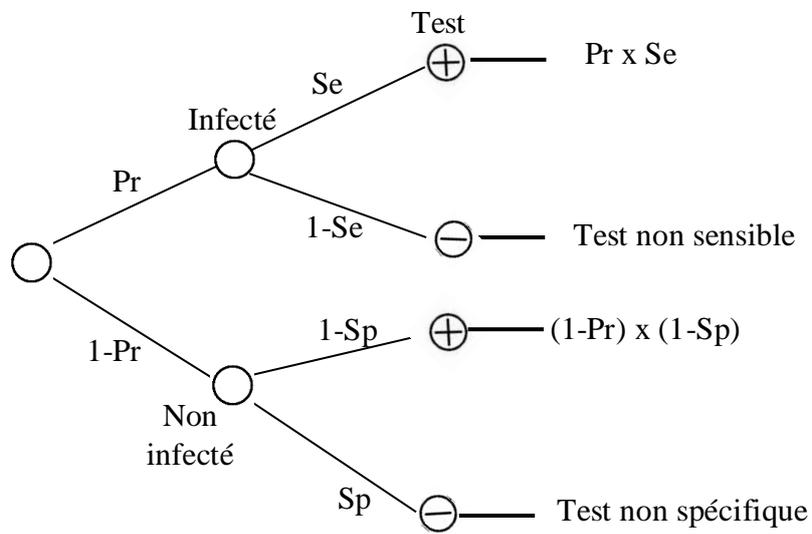


Figure 24: Relation entre la prévalence réelle et la prévalence apparente

II.3.3.5.2.2. Calcul des *odds ratio* et leurs intervalles de confiance

L'*odds ratio* (*OR*), également appelé rapport des chances, rapport des côtes ou risque relatif rapproché, est une mesure statistique utilisée en épidémiologie exprimant l'association entre une exposition et un résultat. Il représente les chances qu'un résultat se produise compte tenu d'une exposition particulière, par rapport aux chances que le résultat se produise en l'absence de cette exposition. En d'autres termes il quantifie la force de l'association entre la survenue de la maladie représentée par la variable dichotomique et les variables explicatives ou facteurs (Daniel, 1969). La formule de l'*Odds Ratio* est:

$$OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{ad}{bc}$$

- a: nombre des individus exposés et atteints de la maladie
- b: nombre des individus exposés et non atteints de la maladie
- c: nombre des individus non exposés et atteints de la maladie
- d: nombre des individus non exposés et non atteints de la maladie

L'intervalle de confiance pour l'*odds ratio* est calculé en utilisant la formule suivante:

$$IC(95\%) = e^x [\ln(OR) \pm 1.96 \sqrt{(1/a + 1/b + 1/c + 1/d)}] \text{ ou}$$

$$IC(95\%) = e^x \ln(OR) [1 \pm 1.96 / \sqrt{(Khi - deux)}]$$

Même si les valeurs des *odds ratio* et leurs intervalles de confiance peuvent être calculées à partir des relations ci-dessus, le package «*questionr*» exécuté avec le logiciel R a permis d'obtenir les différentes valeurs.

L'*odds ratio* s'interprète comme suit:

- $OR = 1$: signifie que le facteur étudié n'a pas d'effet sur la survenue de la maladie
- $OR > 1$: l'association est positive: le risque de maladie est plus fort chez les sujets exposés que chez les sujets non exposés ; le facteur étudié est un facteur de Risque de la maladie
- $OR < 1$: l'association est inverse: le risque de maladie est moins fort chez les sujets exposés que chez les sujets non exposés ; le facteur étudié est un facteur de protection contre la maladie.

Les variables explicatives considérées étaient les signes cliniques, le genre, l'âge, le foyer. La variable à expliquer était le résultat aux tests de diagnostic rapides.

II.3.3.5.3. Détermination des caractéristiques des tests de diagnostic

Les caractéristiques des tests de diagnostic sont dépendantes de différents facteurs, en particulier des caractéristiques de la population étudiée et de la prévalence de la maladie. Dans cette étude, l'ensemble des caractéristiques des différents tests de diagnostic ainsi que la valeur *Kappa* ont été calculées en utilisant comme "gold standard" le test parasitologique de confirmation (mAECT).

II.3.3.5.3.1. Performance intrinsèque des tests diagnostiques

Elle se définit comme étant la capacité informative propre du test, ne dépendant pas de la prévalence de la maladie. On l'estime grâce à la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp). Les caractéristiques intrinsèques du test permettent de déterminer si le test a une bonne capacité discriminante. Ces indicateurs sont assez théoriques car on ne prend pas en compte le contexte de la prévalence. Pour les évaluer, un tableau de contingence a été établi permettant d'estimer la dépendance entre les 2 caractères (le statut de l'individu et le résultat du test).

Le statut de l'individu a été marqué M+ pour une personne malade ou M- pour une personne saine et le résultat du test a été noté T+ pour positif ou T- pour négatif.

Lorsqu'un test de diagnostic ou de dépistage est réalisé, différents cas de figures possibles sont observés à l'issue du résultat. L'individu peut être cas de THA M+ ou non M-. Son résultat au test peut être positif (T+) ou négatif (T-). Les combinaisons présentées dans le tableau IV ci-dessous permettent de calculer les caractéristiques diagnostiques du test.

Ces informations fournies ont permis d'étudier la relation entre ces quatre catégories grâce au calcul de différents paramètres définis ci-dessous.

- **Sensibilité (Se)**

La sensibilité se définit comme étant l'aptitude du test à donner un résultat positif chez un cas de THA. Elle est le rapport entre le nombre de vrais positifs et le nombre total des positifs donné par le test gold standard. La valeur de Se est obtenue en pourcentage lorsqu'elle est multipliée par 100.

$$Se (\%) = P(T^+|M^+) = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

- **Spécificité (Sp)**

La spécificité est l'aptitude du test à donner un résultat négatif chez un individu sain. Elle est la probabilité (présentée en pourcentage) que les sujets indemnes de THA (tel que déterminé par le test gold standard) aient un résultat négatif lorsqu'ils sont testés avec le test diagnostic en cours d'évaluation. Elle a été calculée en divisant les vrais négatifs par le total des négatifs donné par le test gold standard. Elle s'exprime également en pourcentage et elle est multipliée par 100.

$$Sp(\%) = P(T^-|M^-) = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

Dans un langage probabiliste, la sensibilité est la probabilité d'avoir un test positif lorsque l'on est malade et la spécificité est la probabilité d'avoir un test négatif lorsqu'on est sain.

La sensibilité et la spécificité étant des valeurs dites « intrinsèques » elles sont censées demeurer constantes quelle que soit la prévalence de la maladie dans la population d'individus soumis au test (Toma *et al.*, 2010).

Tableau IV: Combinaisons possibles à l'issue d'un test de diagnostic, selon le résultat au test et le statut du sujet vis-à-vis de la maladie

	Résultat positif (T+)	Résultat négatif (T-)	Total
Cas de THA (M+)	Vrai positif (VP)	Faux positif (FP)	VP + FP
Indemne de THA (M-)	Faux négatif (FN)	Vrai négatif (VN)	VN + FN
Total	VP + FN	VN + FP	VP + FP + VN + FN

- VP: Vrai Positif, cas de THA ayant un test positif
- FN: Faux Négatif, cas de THA ayant un test négatif
- FP: Faux Positif, sujet indemne de THA ayant un test positif
- VN: Vrai Négatif, sujet indemne de THA ayant un test négatif

II.3.3.5.3.2. Performance extrinsèque des tests de diagnostic

Les caractéristiques extrinsèques du test diagnostique sont les plus instructives pour les cliniciens. Elles sont déterminées en prenant en compte la prévalence de la maladie que le test va explorer. Un même test peut avoir des qualités extrinsèques différentes vis à vis de la pathologie et de la population étudiée. Le calcul de ces indicateurs exige la prise en compte des paramètres intrinsèques du test (Se, Sp) et de la prévalence apparente.

- **Prévalence apparente (Pa)**

La prévalence apparente correspond à la probabilité pré-test ou la probabilité d'avoir la maladie avant d'avoir fait le test. Elle se calcule selon la formule suivante:

$$Pa (\%) = \frac{VP + FN}{VP + VN + FP + FN} \times 100$$

- **Valeurs prédictives**

Les caractéristiques intrinsèques du test comme la Se et la Sp donnent essentiellement des informations selon lesquelles si le patient est atteint ou non de la maladie, quelles sont les chances que le test index soit en mesure de détecter ou non, respectivement. Bien que ces concepts soient importants du point de vue épidémiologique, le clinicien veut en fait connaître l'inverse; autrement dit, si le patient a été testé positif ou négatif, quelles sont les chances qu'il ait réellement la maladie ou non. La valeur prédictive positive est la capacité du test de distinguer les personnes malades (vrais positifs) de l'ensemble des personnes dont le résultat au test est positif (vrais positifs + faux positifs). C'est également la probabilité d'être malade (M+) si on a un test positif (T+). La VPP a été calculée selon la formule suivante:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} = P(M^+|T^+) = \frac{Se * Pr}{Se * Pr + (1 - Sp)(1 - Pr)}$$

La valeur prédictive négative est la capacité du test à distinguer les personnes saines (vrais négatifs) de l'ensemble des personnes dont le résultat au test est négatif (vrais négatifs + faux négatifs). La VPN peut être traduite comme étant la probabilité de ne pas être malade (M^-) si on a un test négatif (T^-). La formule suivante a permis de calculer la VPN.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} = P(M^-|T^-) = \frac{Sp * (1 - Pr)}{(1 - Se) * Pr + Sp * (1 - Pr)}$$

II.3.3.5.4. Détermination des différentes combinaisons de tests diagnostiques

Sur le terrain, le clinicien ou le « décideur » est amené à statuer sur la confiance qu'il est possible d'accorder au résultat d'un test, qu'il soit positif ou négatif. Ainsi, il est possible, pour pallier les imperfections, de concevoir des protocoles de diagnostic associant plusieurs tests. On distingue usuellement deux grands types d'associations de tests dits « en série » ou « en parallèle ». Lorsque deux tests sont associés en série, la réalisation du second test dépend des résultats du premier. Le second test n'est effectué que si le premier a fourni un résultat positif. En règle générale, le résultat global de la séquence est positif lorsque le résultat est positif au premier test ET au second (schéma décisionnel « ET »; Figure 25). Lorsque les tests sont associés en parallèle, chaque individu est soumis de manière systématique aux différents tests. On considère habituellement que le résultat global de la séquence est positif lorsque le résultat est positif à l'un OU l'autre des tests (schéma décisionnel « OU »; Figure 26). La sensibilité et la spécificité des associations de tests sont déductibles des arbres décisionnels présentés ci-dessous (Figure 25 et Figure 26). Vu le contexte épidémiologique, les deux schémas ont été utilisés pour l'évaluation des caractéristiques intrinsèques des tests. Dans la séquence de diagnostic, le schéma décisionnel "OU" privilégie la sensibilité tandis que le schéma décisionnel "ET" est pour la spécificité.

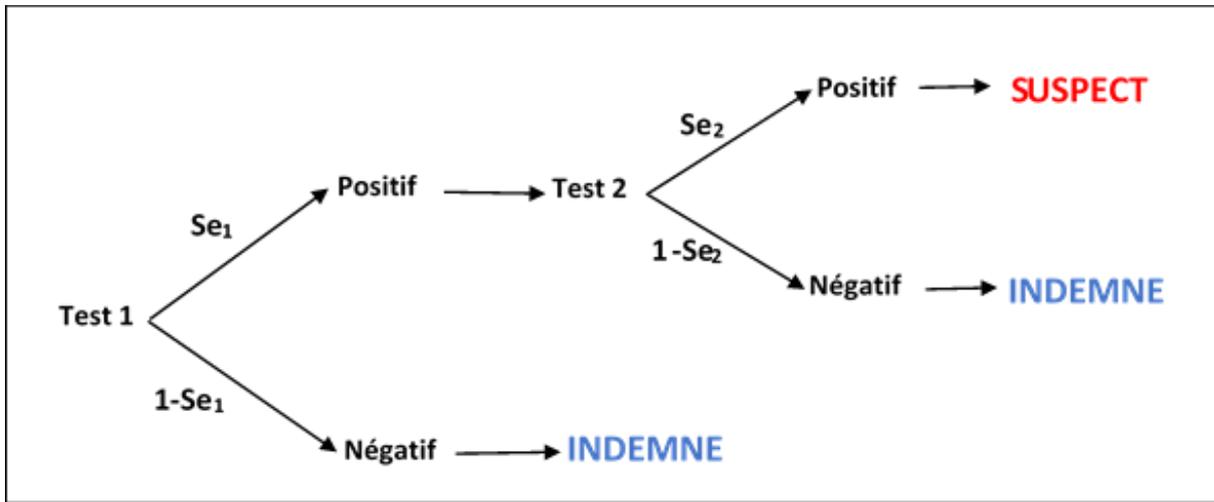


Figure 25: Association de deux tests diagnostiques interprétés en série (Schéma décisionnel "ET")

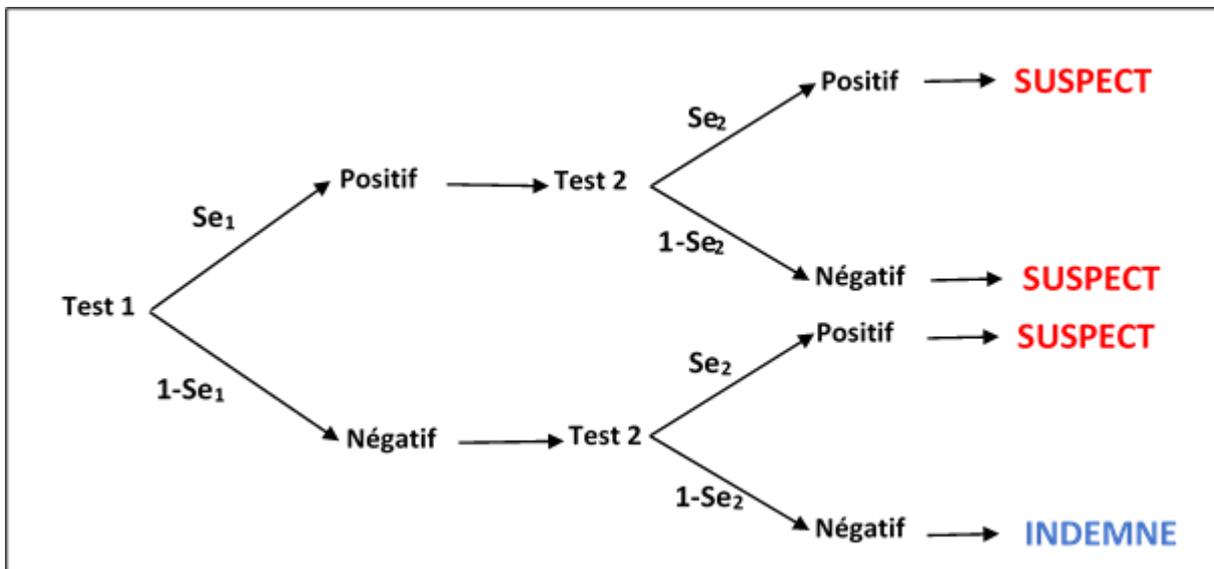


Figure 26: Association de deux tests diagnostiques interprétés en parallèle (schéma décisionnel "OU")

II.3.3.5.5. Calcul du coefficient de corrélation Kappa (K) entre les tests de diagnostic

Le Kappa mesure l'accord entre 2 jugements qualitatifs, en tenant compte de la part de concordance due au hasard. La concordance peut être présentée comme un « pourcentage de concordance », c'est-à-dire la proportion d'échantillons totaux qui ont les mêmes résultats pour les deux tests et le nombre total d'échantillons présenté en pourcentage (Tableau V). Le pourcentage de concordance peut varier de 0% à 100%. Le Kappa a été exprimé comme un rapport entre l'amélioration observée sur l'accord du hasard et l'amélioration maximale possible sur l'accord du hasard. Il a été calculé comme suit:

$$Kappa (K) = \frac{(\text{concordance observée} - \text{concordance due au hasard})}{(1 - \text{concordance due au hasard})} = \frac{Po - Pe}{1 - pe}$$

Po: Proportion de l'accord observé

Pe: proportion d'un accord aléatoire

Les valeurs de Kappa ont été obtenues en remplissant correctement le tableau V dans le logiciel Epitools. Les valeurs obtenues ont été interprétées comme présenté dans le Tableau VI (Landis et Koch, 1977). Le seuil de significativité retenu a été de 5%. Les intervalles de confiance ont tous été calculés à 95%.

II.3.3.5.6. Régression logistique

La régression logistique ou modèle logit est un modèle de régression binomiale. Cette analyse décante les variables pour ne retenir au final que celles qui suffisent à expliquer sans redondance le modèle. Elle a permis de trouver les signes cliniques qui caractérisent le groupe de sujets positifs aux TDR par rapport aux sujets sains. D'abord, des analyses univariées ont permis de préciser la relation entre la variable à prédire (Positivité aux TDR) et les variables explicatives (les différents signes cliniques). La régression a permis non seulement de désigner les variables indépendantes entre elles et de fournir la force des liaisons sous forme d'*odds-ratio*, mais aussi d'établir des scores dits prédictifs. Cette analyse a été implémentée avec le logiciel R en utilisant le package lme4.

Tableau V: Cadre général dans le cas de deux modalités de réponse

		Test A		
		Résultats	Positif	Négatif
Test B	Positif	a	B	nB ₁
	Négatif	c	D	nB ₂
	Total	n A ₁	nA ₂	n

Tableau VI: Degré d'accord et valeurs de Kappa proposés par Landis et Koch en 1977

K	Interprétation
< 0	Désaccord
0,0 - 0,20	Accord très faible
0,21 - 0,40	Accord faible
0,41 - 0,60	Accord modéré
0,61 - 0,80	Accord fort
0,81 – 1,00	Accord presque parfait

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Evaluation des tests de diagnostic rapides de terrain

III.1.1.1. Inclusions et caractéristiques des patients inclus

Entre août 2017 et décembre 2019, un effectif de 3433 suspects cliniques a été examiné dans les 10 centres de santé. Le tableau VII montre le nombre de patients inclus dans chacun des centres de santé par année. Au total, 1606 (46,8%) et 1827 (53,2 %) patients ont été enregistrés respectivement dans les foyers de Bonon et de Sinfra. L'effectif des femmes et celui des hommes ont été respectivement de 1681 (49%) et de 1752 (51%), soit un *sex-ratio* (F/H) de 0,96. L'âge médian des patients inclus était de 37 ans (EI : 26-50). Sur l'ensemble des centres de santé, le nombre de patients inclus a été homogène et une moyenne de 118 inclusions a été observée par mois soit environ 12 inclusions par centre et par mois.

Les symptômes et signes cliniques présentés par les patients inclus sont décrits dans le tableau VIII. Les cas d'affaiblissement général (57,1 %), les cas de fièvre de longue durée (50,4 %) et les cas de maux de tête de durée supérieure à 14 jours (48,9 %) ont été les symptômes et signes cliniques les plus fréquemment observés chez les patients inclus. Par contre, les cas de coma (0,3 %), de convulsions (0,87 %) et de difficulté à s'exprimer (0,96 %) ont été les symptômes les moins rencontrés chez les patients inclus dans l'étude. Parmi les patientes incluses, 9,25 % de cas d'aménorrhées ont été observés.

Aucune différence significative ($p = 0,53$; test binomial) entre la fréquence d'apparition des symptômes et signes cliniques n'a été observée au niveau du genre chez les patients (Tableau IX). En d'autres termes, le genre n'a pas influencé l'apparition des symptômes et signes cliniques.

Par ailleurs, la fièvre de longue durée (858/1678 cas), les maux de tête (906/1730 cas), la présence de ganglions (65/123 cas), le prurit intense (147/283 cas) et le coma (6/11 cas) ont été les symptômes et signes cliniques les plus observés chez les femmes. En revanche, les symptômes et signes cliniques comme le grand amaigrissement (277/550 cas), l'affaiblissement général (1003/1960 cas), les problèmes psychiatriques (52/85 cas), les troubles de sommeil (476/900 cas), les troubles moteurs (103/200 cas) et la difficulté à s'exprimer (18/33 cas) ont été majoritaires chez les hommes.

Tableau VII: Nombre des inclusions dans les différents centres de santé par année

	Nombre des inclusions			
	2017	2018	2019	Total
Foyer de Bonon				
CSR Blanoufla	25	167	200	392
CSR Gobazra	20	121	129	270
CSU Zaguiéta	30	149	207	386
HG Bonon	55	147	79	281
CSU Gonaté	44	111	121	276
Total	174	695	736	1606 (46,8%)
Foyer de Sinfra				
CSR Binoufla	73	121	129	323
CSR Djénédoufla	37	158	163	358
CSR Huafla	33	157	90	280
CSU Bayota	25	133	149	307
HG Sinfra	13	106	441	560
Total	181	675	972	1827 (53,2%)
Total général	355	1370	1708	3433 (100%)

Tableau VIII: Fréquence d'apparition des signes cliniques et symptômes chez les patients inclus

Signes cliniques	Nombre de cas	Fréquence (%)
Affaiblissement général	1960	57,1
Maux de tête (> 14 jours)	1730	50,4
Fièvre de longue durée	1678	48,9
Troubles de sommeil	900	26,2
Grand amaigrissement	550	16
Aménorrhées	165	9,25 ^a
Prurit intense	283	8,2
Troubles moteurs	200	5,8
Présence de ganglions	123	3,6
Problèmes psychiatriques	85	2,5
Difficulté à s'exprimer	33	0,96
Convulsions	30	0,87
Coma	11	0,3

La fréquence ayant l'exposant correspond uniquement dans la proportion de femmes

Les fréquences n'ayant pas d'exposant correspondent à la proportion de femmes et des hommes

Tableau IX: Répartition des symptômes et signes cliniques en fonction du genre

Signes cliniques	N	Genre		p-value
		Femmes (%)	Hommes (%)	
Fièvre de longue durée	1678	858 (51,13)	820 (48,87)	0,35
Maux de tête >14 jours	1730	906 (52,37)	824 (47,63)	0,05
Présence de ganglions	123	65 (52,85)	58 (47,15)	0,59
Grand amaigrissement	550	273 (49,64)	277 (50,36)	0,89
Affaiblissement général	1960	957 (48,83)	1003 (51,17)	0,31
Prurit intense	283	147 (51,94)	136 (48,06)	0,55
Aménorrhées	165	165 (100)	-----	-----
Problèmes psychiatriques	85	33 (38,82)	52 (61,18)	0,05
Troubles du sommeil	900	424 (47,11)	476 (52,89)	0,08
Troubles moteurs	200	97 (48,50)	103 (51,50)	0,72
Convulsions	30	15 (50)	15(50)	1
Difficulté à s'exprimer	33	15 (45,45)	18 (54,55)	0,73
Coma	11	6 (54,55)	5 (45,45)	1
Total	7748	3961	3787	0,53

N : nombre de cas d'apparition des symptômes et signes cliniques

P-value: Probabilités associées au test binomial

III.1.1.2. Tests de diagnostic réalisés sur terrain

Sur un total de 3433 sujets inclus et analysés avec les trois (3) tests de diagnostic rapides (TDR), 3336 patients soit 97,17% ont présenté des résultats négatifs aux trois TDR. Le taux de positivité au moins à un des trois TDR obtenu était de 2,83% dont 97 suspects sérologiques sur 3433 patients inclus (Tableau X). Parmi les suspects sérologiques, 38 ont été détectés dans un Centre de Diagnostic et Traitement (CDT) et 59 dans un Site de Screening Sérologique (SSS). Sur l'ensemble des suspects sérologiques détectés dans les SSS, six ne sont pas rendus au CDT pour la confirmation parasitologique et la collecte de sang sur papier filtre. L'âge moyen des suspects sérologiques était de $36 \pm 16,53$ ans. Il n'y avait pas de différence significative dans la proportion de suspects sérologiques entre les foyers de Bonon et de Sinfra ($p = 0,588$). Egalement, aucune différence significative ($p = 0,918$) n'a été observée au niveau de la séroprévalence des TDR entre le genre des patients (Tableau X).

Concernant le test parasitologique (mAECT), 91 sur les 97 suspects sérologiques ont été testés. Les six suspects sérologiques manquants au test de confirmation parasitologique ont été perdus de vue. Chez les 91 suspects sérologiques analysés avec la mAECT, des trypanosomes ont été détectés dans les échantillons de deux suspects (Tableau XI). Ainsi, la prévalence de cas confirmés de trypanosomiase humaine africaine (THA) dans la population recrutée a été de 0,06% (IC 95%:0,02-0,2). La répartition des malades confirmés avec la mAECT s'est faite de façon équitable au niveau des foyers et du genre. Aucun examen microscopique du suc ganglionnaire n'a été réalisé au cours de cette étude. En effet, la majorité des suspects ne présentait pas d'adénopathie cervicale et pour les 123 cas chez lesquels des ganglions ont été observés, ils n'étaient pas ponctionnables.

Tableau X: Caractéristiques de la population d'étude et résultats des tests de diagnostic rapides (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT)

	TDR⁻ (N=3336)	TDR⁺ (N=97)	Séroprévalence (%) (2,83)	P
Foyers				
- Bonon	1558 (46,7%)	48 (49,5%)	2,97	0,588
- Sinfra	1778 (53,3%)	49 (50,5%)	2,68	
Genre				
- Féminin	1702 (51,0%)	50 (51,5%)	2,85	0,918
- Masculin	1634 (49,0%)	47 (48,5%)	2,80	

TDR⁻: les 3 tests de diagnostic rapides négatifs, **TDR⁺**: au moins un des tests de diagnostic rapide positif, **p**: probabilité associée au test exact de Fisher, **N** : effectif,

Tableau XI: Résultats des tests de diagnostic de terrain en fonction du foyer et du genre

Facteurs	N	HAT Sero- K-Set	rHAT Sero-Strip	SD Bioline HAT	mAECT	
		Pos (%)	Pos (%)	Pos (%)	N	Pos (%)
Foyers						
-Bonon	1606	44 (2,74)	8 (0,50)	23 (1,43)	45	1 (2,22)
-Sinfra	1827	41 (2,24)	6 (0,33)	20 (1,09)	46	1 (2,17)
Genre						
-Féminin	1752	46 (2,63)	4 (0,23)	25 (1,43)	47	1 (2,13)
-Masculin	1681	39 (2,32)	10 (0,60)	18 (1,07)	44	1 (2,27)
	3433	85 (2,47%)	14 (0,41)	43 (1,25)	91	2

N: effectif, Pos : Positif

III.1.1.3. Symptômes et signes cliniques prédicteurs de suspicion sérologique

L'analyse univariée des symptômes et signes cliniques présentés par la population étudiée a montré que 6 des 13 symptômes et signes cliniques d'inclusion (troubles du sommeil, grand amaigrissement, troubles moteurs, problèmes psychiatriques, convulsions et difficulté à s'exprimer) ont été significativement associés à la positivité d'au moins un des tests de diagnostic rapides (TDR) (Tableau XII).

La régression logistique réalisée sur l'ensemble des symptômes et signes cliniques en utilisant l'approche de sélection de modèle par étapes a indiqué que le modèle le mieux adapté (AIC = 841,86) a été celui contenant cinq (5) variables dont grand amaigrissement, problèmes psychiatriques, troubles moteurs, troubles du sommeil et convulsions (tableau XIII). Les convulsions ont présenté l'*odds ratio* le plus élevé ($OR = 4,58$). Cette valeur d'*odds ratio* indique qu'un patient présentant des convulsions a 4,6 fois plus de chances ($p = 0,02$) d'être positif au moins à l'un des TDR par rapport à un patient ne souffrant pas de convulsions. Concernant les troubles de sommeil, malgré le risque de 2,5 fois plus susceptible d'être tester positif au moins à un des TDR, la probabilité que ce symptôme soit véritablement lié à la trypanosomiase humaine africaine (THA) a été très élevée ($p < 0,001$). Quant aux symptômes et signes cliniques tels que troubles moteurs, problèmes psychiatriques et grand amaigrissement, ils ont présenté respectivement les valeurs d'*odds ratio* de 2,7, 2,5 et 1,7. La probabilité qu'un patient soit testé positif lorsqu'il ne présente aucun de ces 5 signes cliniques n'a été de 0,015.

L'analyse univariée des trois TDR séparément a indiqué que la positivité à l'un des TDR était très significativement associée ($p < 0,001$) à la positivité à un autre TDR (Tableau XIV). Pour cette même analyse univariée, le symptôme "difficulté à s'exprimer" a été associé à la positivité globale des trois (3) TDR tandis qu'en analyse multivariée ce symptôme a été associé uniquement à la positivité du test rHAT Ser-Strip. Le modèle de régression logistique a indiqué que seuls les symptômes comme les troubles du sommeil et les convulsions ont été significativement associés à la positivité de chacun des trois TDR (Tableau XV). Entre trois et cinq symptômes et de signes cliniques ont été significativement associés à la positivité de chacun des TDR. Ces mêmes symptômes et signes cliniques ont été identifiés comme étant associés à la positivité globale des TDR (Tableau XV).

Tableau XII: Signes cliniques en fonction des 3 tests de diagnostic rapide (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT)

Signes cliniques	TDR ⁻ (N=3336)	TDR ⁺ (N=97)	Total (N=3433)	<i>p</i>
Fièvre de longue durée				
- neg (%)	1703 (51,1)	52 (53,6)	1755 (51,1)	0,220
- pos (%)	1633 (48,9)	45 (46,4)	1678 (48,9)	
Maux de tête > 14 jours				
- neg (%)	1658 (49,7)	45 (46,4)	1703 (49,6)	0,521
- pos (%)	1678 (50,3)	52 (53,6)	1730 (50,4)	
Présence de ganglions				
- neg (%)	3217 (96,4)	93 (95,9)	3310 (96,4)	0,771
- pos (%)	119 (3,6)	4 (4,1)	123 (3,6)	
Grand amaigrissement				
- neg (%)	2813 (84,3)	70 (72,2)	2883 (84,0)	0,001***
- pos (%)	523 (15,7)	27 (27,8)	550 (16,0)	
Affaiblissement général				
- neg (%)	1432 (42,9)	41 (42,3)	1473 (42,9)	0,897
- pos (%)	1904 (57,1)	56 (57,7)	1960 (57,1)	
Purité intense				
- neg (%)	3058 (91,7)	92 (94,8)	3150 (91,8)	0,262
- pos (%)	278 (8,3)	5 (5,2)	283 (8,2)	
Problèmes psychiatriques				
- neg (%)	3259 (97,7)	89 (91,8)	3348 (97,5)	< 0,001***
- pos (%)	77 (2,3)	8 (8,2)	85 (2,5)	
Troubles du sommeil				
- neg (%)	2484 (74,5)	49 (50,5)	2533 (73,8)	< 0,001***
- pos (%)	852 (25,5)	48 (49,5)	900 (26,2)	
Troubles moteurs				
- neg (%)	3151 (94,5)	82 (84,5)	3233 (94,2)	< 0,001***
- pos (%)	185 (5,5)	15 (15,5)	200 (5,8)	
Aménorrhées				
- neg (%)	1538 (90,4)	49 (98,0)	1587(90,6)	0,09 (a)
- pos (%)	164 (9,6)	1 (2,0)	165 (9,4)	
convulsions				
- neg (%)	3310 (99,2)	93 (95,9)	3403 (99,1)	< 0,001***
- pos (%)	26 (0,8)	4 (4,1)	30 (0,87)	
Difficultés à s'exprimer				
- neg (%)	3308 (99,2)	92 (94,8)	3400 (99,0)	< 0,001***
- pos (%)	28 (0,8)	5 (5,2)	33 (0,96)	
coma				
- neg (%)	3326 (99,7)	96 (99,0)	3422 (99,7)	0,209
- pos (%)	10 (0,3)	1 (1,0)	11 (0,3)	

Neg : négatif, **pos**: positif, **N** : effectif, *******: différence significative, **p** : probabilité associée au test exact fisher, **TDR⁻** : les 3 tests de diagnostic rapides négatifs, **TDR⁺**: au moins un des tests de diagnostic rapides positif, (a) : calcul effectué sur la proportion de femmes uniquement

Tableau XIII: Symptômes et signes cliniques associés à la positivité des TDR (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT)

Symptômes et signes cliniques	OR	IC à 95 %	p
Grand amaigrissement	1,7	1,06 - 2,75	0,02 *
problèmes psychiatriques	2,5	0,97 - 95	0,04*
Troubles moteurs	2,7	1,4 - 4, 8	0,002**
Troubles du sommeil	2,8	1,9 - 4,3	1-06 ***
Convulsions	4,6	1,5 - 14	0,02 *
Intercept	0,015	0,01 - 0,02	< 2 ⁻¹⁶ ***

OR : odds ratio, **IC à 95%**: intervalle de confiance, **p** : probabilité associée à la valeur de l'Odds Ratio, ‘***’: différence très significative, ‘**’: différence moyennement significative, ‘*’différence faiblement significative

Tableau XIV: Associations univariables entre les variables explicatives d'intérêt et la positivité de chacun des trois tests de diagnostic rapide (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip et SD Bioline HAT)

	Positivité de SD Bioline HAT (n=43)	Positivité de HAT Sero-K-Set (n=85)	Positivité de rHAT Sero-Strip (n=14)
Caractéristiques de la population			
Age	0,380	0,040**	0,855
Foyer	0,375	0,351	0,436
Genre	0,348	0,565	0,092
Symptômes & signes cliniques			
Affaiblissement général	0,631	0,917	0,997
Maux de tête (>14 jours)	0,837	0,256	0,976
Fièvre de longue durée	0,427	0,215	0,850
Troubles du sommeil	< 0,001***	< 0,001***	< 0,001***
Grand amaigrissement	0,085	0,012**	0,200
Prurit intense	0,389	0,423	0,881
Troubles moteurs	0,022**	< 0,001***	< 0,001***
Présence de ganglions	0,704	0,979	0,473
Problèmes psychiatriques	< 0,001***	< 0,001***	0,004***
Difficultés à s'exprimer	< 0,001***	< 0,001***	< 0,001***
Convulsions	< 0,001***	< 0,001***	< 0,001***
Coma	0,019**	0,597	0,832
Tests de diagnostic rapide			
Positivité de SD Bioline HAT	ND	< 0,001***	< 0,001***
Positivité de HAT Sero-K-Set	< 0,001***	ND	< 0,001***
Positivité de rHAT Sero-Strip	< 0,001***	< 0,001***	ND

p-value* < 0,05; *p-value* < 0,001; ND: non disponible

Tableau XV: Modèle de régression logistique multivariable pour les associations entre les symptômes et signes cliniques et la positivité de chacun des trois tests de diagnostic rapides (SD Bioline HAT, HAT Sero-K-Set et rHAT Sero-Strip)

	<i>OR</i>	<i>IC à 95%</i>	<i>p-value</i>
SD Bioline HAT			
Troubles du sommeil	4,06	2,18 – 7,74	<0,001***
Problèmes psychiatriques	3,62	1,07 – 9,67	0,02**
Convulsions	14,25	3,51 – 45,88	<0,001***
Intercept	0,01	0,003 – 0,01	<0,001 ***
HAT Sero-K-Set			
Age	0,99	0,97 – 1,00	0,05*
Troubles du sommeil	2,89	1,84 – 4,52	<0,001***
Grand amaigrissement	1,56	0,91 – 2,57	0,09
Troubles moteurs	2,89	1,47 – 5,29	0,001**
Problèmes psychiatriques	2,74	1,07 – 6,06	0,02**
Convulsions	3,93	0,94 – 12,50	0,04**
Intercept	0,02	0,01 – 0,04	<0,001***
rHAT Sero-Strip			
Genre	2,93	0,90 – 12,22	0,09
Troubles du sommeil	12,21	3,52 – 61,71	<0,001***
Difficultés à s'exprimer	14,27	2,05 – 67,36	<0,001**
Convulsions	18,88	1,65 – 166,05	0,01**
Intercept	0,0004	0,000055 – 0,0016	<0,001***

OR: Odds ratio; *IC à 95%*: intervalle de confiance à 95%

p-value* = 0,05; *p-value* < 0,05; ****p-value* < 0,001

III.1.1.4. Performance des tests de diagnostic rapides de la trypanosomiase humaine africaine interprétés seuls ou en combinaison

Parmi les trois tests de diagnostic rapides (TDR) de la THA réalisés, le test HAT Sero-K-Set a montré la plus forte séroprévalence avec une valeur de 2,5 % (IC: 2,0-3,1 %) (Tableau XVI). La combinaison en parallèle des trois TDR et la combinaison en parallèle des tests HAT Sero-K-Set - SD Bioline HAT ont présenté une séroprévalence de 2,8% (IC:2,3-3,4%). Cette séroprévalence était la plus élevée parmi celle des TDR individuels ainsi que celle des combinaisons de TDR en parallèle et en série. La plus faible séroprévalence de 0,2% (IC: 0,1 – 0,4%) a été enregistrée avec l'association en série des trois TDR et l'association en série des tests rHAT Sero Strip + SD Bioline HAT.

La spécificité des tests a été calculée en utilisant les résultats du test parasitologique (mAECT) comme "gold standard".

Les six (6) individus perdus de vue (quatre positifs pour le HAT Sero-K-Set uniquement, et deux positifs pour la combinaison HAT Sero-K-Set + SD Bioline HAT) ont été exclus des calculs. Les spécificités des TDR individuels ont varié de 97,8 % (97,2 – 98,2) pour le HAT Sero-K-Set à 99,6 % (99,4 – 99,8) pour le rHAT Sero-Strip. Les combinaisons en série de tous les TDR et de rHAT Sero-Strip + SD Bioline HAT ont présenté la plus grande spécificité (Sp = 99,9 %; IC: 99,7-100 %). Quant à la plus faible spécificité des combinaisons des tests (97,2%, IC : 96,6 – 97,7), elle a été observée au niveau des combinaisons en parallèle de tous les TDR et de HAT Sero-K-Set - SD Bioline HAT. Les associations en série des TDR ont eu une meilleure spécificité par rapport à l'association en parallèle.

La valeur prédictive positive (VPP) des tests a été évaluée comme étant la capacité des tests de distinguer les personnes malades de THA c'est-à-dire les patients positifs à la mAECT de l'ensemble des patients dont les résultats des tests sont positifs. Les VPP estimées pour les TDR interprétés seuls ont été généralement faible (<15%). La VPP la plus élevée a été de 33% (IC: 4-78) pour l'interprétation "en série" des trois TDR et pour l'interprétation "en série" des tests rHAT Sero-Strip + SD Bioline HAT. L'ajout "en série" du test HAT Sero-K-Set n'a pas amélioré la VPP.

Tableau XVI: Performance des différents tests de diagnostic rapide de la trypanosomiase humaine africaine en utilisant le test parasitologique comme "gold standard"

Tests de diagnostic rapide	Nbre de positifs	Séroprévalence (95% IC)	Spécificité (95% IC) ^{a,b}	VPP (95% IC) ^b
Tests individuels				
SD Bioline HAT	43	1,3 (0,9-1,7)	98,9 (98,5-99,2)	4,9 (1-17)
HAT Sero-K-Set	85	2,5 (2,0-3,1)	97,8 (97,2-98,2)	2,5 (0-9)
rHAT Sero-Strip	14	0,4 (0,2-0,7)	99,6 (99,4-99,8)	14,3 (2-43)
Combinaisons de tests				
Tous les TDR (parallèle)	97	2,8 (2,3-3,4)	97,2 (96,6-97,7)	2,2 (0-8)
Tous les TDR (série)	6	0,2 (0,1-0,4)	99,9 (99,7-100)	33,3 (4-78)
HAT Sero-K-Set- rHAT Sero-Strip (parallèle)	85	2,5 (2,0-3,1)	97,8 (97,2-98,2)	2,5 (0-9)
HAT Sero-K-Set- SD Bioline HAT (parallèle)	97	2,8 (2,3-3,4)	97,2 (96,6-97,8)	2,2 (0-8)
rHAT Sero Strip- SD Bioline HAT (parallèle)	51	1,5 (1,2-2,0)	98,6 (98,2-99,0)	4,1 (0-14)
HAT Sero-K-set + rHAT Sero Strip (série)	14	0,4 (0,2-0,7)	99,6 (99,4-99,8)	14,3 (2-43)
HAT Sero-K-set + SD Bioline (série)	31	0,9 (0,6-1,3)	99,2 (98,9-99,5)	6,9 (1-23)
rHAT Sero Strip + SD Bioline HAT (série)	6	0,2 (0,1 – 0,4)	99,9 (99,7-100)	33,3 (4-78)

a : dénominateur de 3425 pour les TDR, b : 6 individus perdus exclus pour ces calculs (4 positifs au HAT Sero-K-Set seulement, et 2 positifs au HAT Sero-K-Set + SD Bioline HAT)

IC: intervalle de confiance, VPP: valeur prédictive positive, Nbre : Nombre

III.1.2. Performances des tests diagnostiques réalisés au laboratoire

III.1.2.1. Echantillons de papiers filtres positifs

Sur 91 échantillons de suspects sérologiques envoyés au laboratoire, 12 échantillons ont été positifs au moins à un des tests réalisés au laboratoire y compris les deux cas confirmés de la trypanosomiase humaine africaine (THA) (Tableau XVII). Sept échantillons de suspects sérologiques ont été positifs avec le test de la trypanolyse (TL), trois à la LAMP et trois à l'ELISA/*T. b. gambiense*. Sur huit échantillons de suspects sérologiques testés positifs avec le test de la qPCR m18S (dont un cas confirmé de THA), aucun de ces échantillons n'a été testé positif avec la qPCR TgsGP. Les échantillons des deux cas confirmés de THA ont été testés positifs avec les tests de la TL, de l'ELISA/*T. b. gambiense* et de la LAMP.

III.1.2.2. Caractéristiques des 12 suspects sérologiques positifs aux tests réalisés au laboratoire

Les statuts des 12 individus suspects sérologiques et positifs au moins à un des tests réalisés au laboratoire sont présentés dans le tableau XVII. Les deux cas confirmés de THA étaient des patients adolescents dont une fille de 11 ans et un garçon de 13 ans. Sur l'ensemble des tests de diagnostic réalisés, sept (7) tests de diagnostic (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip, SD Bioline HAT, TL, ELISA/*T. b. gambiense*, LAMP et qPCR m18S) étaient positifs chez le jeune garçon. Alors que chez la jeune fille, six (6) tests de diagnostic (HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip, SD Bioline HAT, TL, ELISA/*T. b. gambiense* et LAMP) étaient positifs. La jeune fille a été diagnostiquée dans un état de santé très altéré. Les symptômes et signes cliniques observés chez cette patiente étaient : grand amaigrissement, affaiblissement général, problèmes psychiatriques, troubles du sommeil, troubles moteurs, convulsions et difficulté à s'exprimer. Son état physique et son parcours diagnostique ont fait l'objet d'un article dans le cadre de ce travail (Publication 1). Quant au jeune garçon de 13 ans, les symptômes et signes cliniques observés étaient uniquement de la fièvre de longue durée et des troubles de sommeil. Après analyse de leur liquide céphalo-rachidien (LCR), ils ont tous deux été classés comme patients de stade 2. Des trypanosomes ont été observés dans le LCR de la jeune fille ainsi qu'une cytorachie de 160 cellules/mm³. Egalement, une cytorachie de 240 cellules/mm³ a été observée dans le LCR du jeune garçon avec une absence de trypanosomes. Ils ont été traités avec une thérapie combinée au nifurtimox et à l'éflornithine (NECT).

Deux patients décédés au cours de l'étude étaient une jeune femme de 20 ans et un jeune homme de 28 ans. Ils ont tous les deux présenté comme symptômes et signes cliniques la fièvre, les maux de tête, le grand amaigrissement, l'affaiblissement général, les troubles du sommeil, les troubles moteurs et les difficultés à s'exprimer. En plus, l'homme souffrait de prurit et la femme de problèmes psychiatriques et de convulsions. Lors de l'inclusion, l'homme était positif à HAT Sero-K-Set et à rHAT Sero-Strip mais négatif à SD Bioline HAT. Il a également été négatif à la mAECT. Il est décédé deux jours après sa consultation. Le résultat de son échantillon de papier filtre s'est avéré positif à la TL, à la LAMP et à la qPCR m18S. La femme était positive aux trois tests de diagnostic rapides (TDR) mais négative à la mAECT. Comme elle était positive à un des tests réalisés au laboratoire (la TL), on lui a demandé de se présenter à une visite de suivi trois mois plus tard, au cours de laquelle la mAECT a été toujours négative. Compte tenu de son état clinique dégradé, une ponction lombaire a été effectuée mais aucun trypanosome et / ou invasion du LCR n'ont été observés. Les parents de la patiente n'ont pas accepté le prochain suivi, et elle est finalement décédée.

Les huit autres suspects sérologiques sur les 12, ont présenté à l'inclusion de la fièvre de longue durée (n=4), des troubles du sommeil (n=4), des maux de tête (n=3), de l'affaiblissement général (n=3), du grand amaigrissement (n=1), des troubles moteurs (n=1) et des convulsions (n=1). A l'inclusion, les huit patients ont été testés tous positifs avec le test HAT Sero-K-Set, trois avec le test SD Bioline HAT et un seul avec le test rHAT Sero-Strip. Cependant, leurs échantillons de sang ont tous été testés négatifs avec le test de la mAECT. Concernant l'analyse de leurs échantillons de sang séché sur papier filtre au laboratoire, six (6) échantillons de sang séché sur du papier filtre ont été positifs à la qPCR m18S mais négatifs à la qPCR TgsGp. Les tests de l'ELISA/*T. b. gambiense* et de la trypanolyse ont respectivement été positifs pour un (1) échantillon et trois (3) échantillons de ces suspects sérologiques. Aucun échantillon de ces suspects sérologiques n'a été positif à la LAMP. Tous les échantillons de suspects sérologiques positifs au moins à un des tests réalisés au laboratoire sont restés négatifs à la mAECT au cours des suivis à 3 et 6 mois plus tard. Lors du dernier suivi (suivi à 6 mois), quatre (4) des 8 suspects sérologiques ont obtenu une séroconversion au(x) TDR initialement positif(s) tandis que les 4 autres suspects sérologiques ont maintenu leur séropositivité, tous avec le test HAT Sero-K-Set (Tableau XVII).

Tableau XVII: Statuts et résultats des 12 suspects sérologiques positifs à un test de laboratoire

Status final	Sexe/âge	HAT Sero-K-Set	rHAT Sero-Strip	SD Bioline HAT	TL	ELISA/Tbg	LAMP	qPCR m18S	qPCR TgsGP
Cas confirmé THA	M/13	+	+	+	+	+	+	+	-
Cas confirmé THA	F/11	+	+	+	+	+	+	-	NF
Cas décédé, PF+	M/28	+	+	-	+	-	+	+	-
Cas décédé, PF+	F/20	+	+	+	+	-	-	-	NF
Séropositif, PF+	M/27	+	(+)	-	-	-	-	+	-
Séropositif, PF+	M/53	+	(+)	-	+	+	-	-	NF
Séropositif, PF+	F/36	+	(+)	-	+	(-)	-	+	-
Séropositif, PF+	M/71	+	(+)	+	(-)	+	(-)	+	-
Séroconversion, PF+	F/52	+	(-)	-	+	-	-	+	-
Séroconversion, PF+	F/6	+	(-)	-	+	(-)	-	+	-
Séroconversion, PF+	F/35	+	(-)	-	-	-	-	+	-
Séroconversion, PF+	M/38	+	(-)	-	+	-	-	-	NF

THA : atteint de la trypanosomiase humaine africaine ; **PF** : tache de sang séché sur papier filtre ; **M** : mâle ; **F** : femelle ; **NF** : non fait ; **()** : Résultat du TDR après 6 mois ; **+** : positif ; **-** : négatif

III.1.2.3. Performance des tests de diagnostic réalisés de laboratoire

Concernant les 91 échantillons de sang séché sur du papier filtre analysés avec les tests réalisés au laboratoire, les prévalences apparentes ont fluctué entre 0 et 8,8% (Tableau XVIII). La prévalence apparente la plus élevée a été observée avec le test moléculaire qPCR m18S. Les échantillons positifs à la qPCR m18S testés à nouveau avec la qPCR TgsGP ont tous été négatifs entraînant une prévalence apparente nulle de ce test. Les tests de diagnostic de l'ELISA/T. *b. gambiense* et de la LAMP ont présenté une même prévalence apparente de 3,3 % (IC: 1,1-9,3).

Les spécificités de l'ensemble des tests de diagnostic ont varié de 93,3 % à 98,9 %, sans tenir compte de la qPCR TgsGP. La spécificité la plus élevée, soit 98,9 % (IC: 93,9-99,9 %) a été observée avec les tests de la LAMP et de l'ELISA/T. *b. gambiense*. Ces mêmes tests (la LAMP et l'ELISA/T. *b. gambiense*) ont obtenu la VPP la plus élevée (67%, IC: 9-99%).

III.1.3. Algorithme de diagnostic pour la surveillance passive de la trypanosomiase humaine africaine

III.1.3.1. Concordance entre les différents tests de diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine

L'ensemble des résultats de la concordance (coefficient de concordance Kappa et IC à 95%) entre les tests de diagnostic par comparaisons deux à deux est présenté dans le tableau XIX. Le coefficient kappa estimant le taux de concordance entre les TDR a été calculé avec un effectif de 3433. Généralement, les accords entre les 3 TDR ont été faibles pour chaque comparaison deux à deux. La concordance entre les tests HAT Sero-K-Set et SD Bioline HAT a été la plus élevée (K= 0,47, IC: 0,36-0,58) qui témoigne d'un accord modéré entre les deux (2) tests de diagnostic rapides.

Les coefficients Kappa des tests réalisés au laboratoire mais aussi entre les TDR et les tests réalisés au laboratoire ont été calculés sur un effectif de 91 résultats disponibles. La concordance entre les TDR et les tests réalisés au laboratoire a varié d'un accord très faible à un accord faible trouvé entre les tests de diagnostic de la trypanolyse et le rHAT Sero-Strip ainsi qu'entre les tests de la LAMP et le rHAT Sero-Strip (K = 0,29; IC:0,02-0,6). La comparaison deux à deux des tests réalisés au laboratoire ont montré une très faible concordance (0,14 ; -0,17; 0,45) entre les tests de diagnostic de la qPCR m18S et de l'ELISA/T. *b. gambiense*.

Tableau XVIII: Performance des tests de laboratoire effectués sur les patients positifs aux tests de diagnostic rapides (TDR)

Tests diagnostiques	Nbre de positifs	Prévalence apparente (IC à 95%)	Spécificité (IC à 95%) ^a	VPP (IC à 95%)
TL	7	7,7 (3,8-15)	94,4 (87,4-98,1)	29 (4-71)
LAMP	3	3,3 (1,1-9,3)	98,9 (93,9-99,9)	67 (9-99)
ELISA/ <i>T. b. gambiense</i>	3	3,3 (1,1-9,3)	98,9 (93,9-99,9)	67 (9-99)
qPCR m18s	8	8,8 (4,5-16,4)	93,3 (85,7-97,5)	25 (4-89)
qPCR TgsGP-	0	0	1 (0,96-1)	---

a: dénominateur de 89 pour les tests de laboratoire (sauf pour la qPCR TgsGP qui avait pour dénominateur 8); **IC**: intervalle de confiance, **Nbre** : Nombre ; **VPP** : valeur predictive positive ; TL : trypanolyse

Tableau XIX: Concordance entre HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip, SD Bioline HAT, TL, ELISA/*T.b.g*, LAMP et qPCR m18S

	SD Bioline HAT		rHAT Sero-Strip		Trypanolyse (TL)		ELISA/ <i>T.b.g</i>		qPCR m18S		LAMP	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
HAT Sero-K-Set												
Pos	31	54	15	70	7	72	3	76	8	71	3	76
Neg	12	3336	0	3348	0	12	0	12	0	12	0	12
<i>Kappa</i> (IC)	0,47 (0,36; 0,58)		0,27 (0,16; 0,39)		0,02 (0,00; 0,05)		0,01 (-0,03; 0,02)		0,03 (0,00; 0,05)		0,01 (-0,03; 0,02)	
SD Bioline HAT												
Pos			7	36	4	36	2	38	4	36	2	38
Neg			8	3382	3	48	1	50	4	47	1	50
<i>Kappa</i> (IC)			0,20 (0,06; 0,30)		0,04 (-0,08; 0,17)		0,03 (-0,05; 0,12)		0,02 (-0,11; 0,15)		0,03 (-0,05; 0,12)	
rHAT Sero-Strip												
Pos					4	11	2	13	3	12	3	12
Neg					3	73	1	75	5	71	0	76
<i>Kappa</i> (IC)					0,29 (0,02; 0,56)		0,18 (-0,06; 0,42)		0,16 (-0,08; 0,41)		0,29 (0,02; 0,56)	
TL												
Pos							3	4	3	4	3	4
Neg							0	84	5	79	0	84
<i>Kappa</i> (IC)							0,58 (0,22; 0,95)		0,35 (0,02; 0,68)		0,58 (0,22; 0,95)	
ELISA/ <i>T.b.g</i>												
Pos									1	3	2	1
Neg									7	81	1	87
<i>Kappa</i> (IC)									0,14 (-0,17; 0,45)		0,66 (0,21; 1,10)	
qPCR m18S												
Pos											2	6
Neg											1	82
<i>Kappa</i> (IC)											0,33 (-0,03; 0,70)	

Pos : positif ; Neg : négatif ; IC : intervalle de confiance, TL : trypanolyse

Alors que, un bon accord ($K = 0,66$; IC: 0,2-1,1) a été trouvé entre les tests de l'ELISA/*T. b. gambiense* et de la LAMP.

III.1.3.2. Séquence de tests de l'algorithme de diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine

L'algorithme pour diagnostiquer la trypanosomiase humaine africaine (THA) en Côte d'Ivoire dans la zone d'endémie est présenté par la figure 27. Cet algorithme débute par les cinq (5) symptômes et signes cliniques particuliers, évocateurs de la THA et associés à la positivité aux tests de diagnostic rapides (TDR). Le diagnostic sérologique chez les suspects cliniques est effectué dans les centres de santé avec le (s) TDR HAT Sero-K-Set et/ou SD Bioline HAT. Pour le et/ou les TDR négatif(s), les investigations diagnostiques pour la THA sont stopées.

En cas de positivité de l'échantillon testé au (x) TDR, le diagnostic parasitologique s'effectue avec le test de la minicolonne (mAECT) avec la trousse du PRCT de Daloa ou la trousse INRB/IMT. Si des ganglions cervicaux caractérisés sont observés chez le patient, un examen du suc ganglionnaire (PG) est réalisé.

Lorsque la parasitologie est positive, le statut du suspect clinique et sérologique est confirmé en tant que cas de THA. Le patient est conduit dans un centre de diagnostic et traitement le plus proche pour la prise en charge thérapeutique gratuite.

Les échantillons des suspects cliniques et sérologiques négatifs en parasitologie sont acheminés au laboratoire grâce à la réalisation de papiers filtres. Ces échantillons sont analysés avec le test de la trypanolyse (TL). Pendant l'étude, ce test de laboratoire a été transféré du CIRDES de Bobo-Dioulasso à l'IPR de Bouaké où il est maintenant effectué en routine. La négativité de l'échantillon à la TL engendre l'arrêt des investigations. Les échantillons des suspects cliniques et sérologiques positifs à la TL font l'objet d'un suivi annuel (au moins une fois par an) afin de préciser leur statut vis-à-vis de la maladie. Au cours du suivi, la parasitologie est réalisée de nouveau et se poursuit jusqu'à confirmation du cas. Au troisième suivi, l'échantillon qui est toujours négatif en parasitologie est analysé de nouveau avec le ou les TDR initialement positifs à l'inclusion.

Si le(s) TDR deviennent négatif(s) alors le suspect est déclaré indemne de la THA ; dans le cas contraire les suivis se poursuivent jusqu'à négativation des TDR.

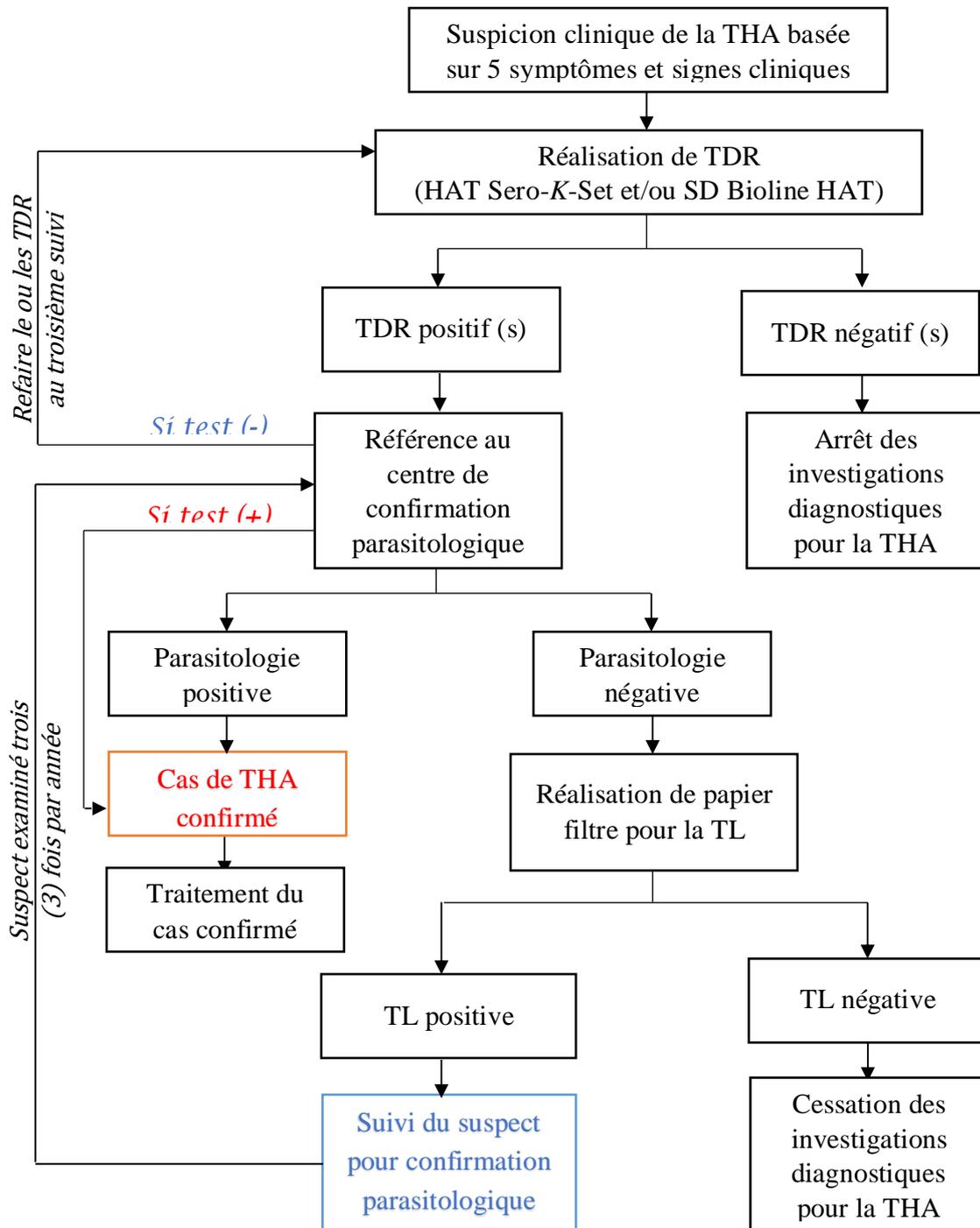


Figure 27: Algorithme de dépistage de la trypanosomiase humaine africaine (THA) dans un service de santé primaire en zone d'endémie en Côte d'Ivoire

PG : Ponction du suc ganglionnaire ; mAECT : mini-Anion Exchange Centrifugation Technique ; TDR : test de diagnostic rapide ; TL : trypanolyse ; THA : trypanosomiase humaine africaine ; (+) : positif ; (-) : négatif.

III.2. DISCUSSION

Les efforts de recherche et de lutte menés en Côte d'Ivoire, notamment la lutte médicale couplée à la lutte antivectorielle, ont engendré une baisse spectaculaire du nombre de cas de trypanosomiase humaine africaine (THA) dans les foyers endémiques (Koffi *et al.*, 2016 ; Kaba *et al.*, 2021). Cette baisse considérable du nombre de cas a permis à la Côte d'Ivoire de valider l'élimination de la THA comme problème de santé publique (WHO, 2021). Le nouvel objectif visé par le pays est l'arrêt de la transmission en 2025. Au cours de cette étude, la faible prévalence (0,06%) de la THA observée dans les foyers endémiques de Bonon et Sinfra peut être interprétée comme un point fort dans le cadre de la lutte contre la maladie en Côte d'Ivoire. Mais, elle paraît comme un point faible de l'étude car les performances des tests pourraient être influencées par cette situation de faible prévalence de la maladie. Bien que la prévalence de la THA observée au cours de cette étude ait été faible, l'apparition sporadique de cas de THA était attendue car le nombre annuel de cas de THA signalés depuis 2009 a toujours été inférieur à 10 (Franco *et al.*, 2020). Les résultats concordent avec ceux de Kambiré *et al.* (2012) et Koffi *et al.* (2016). Ces auteurs ont également signalé une faible prévalence de la THA dans les foyers endémiques de Bonon et de Sinfra avec l'existence de cas résiduels. Ce caractère "résiduel" de la maladie du sommeil dans la zone d'endémie pourrait s'expliquer par la contribution de plusieurs facteurs dont les facteurs socio-écologiques concourant à l'exposition des populations rurales et périurbaines aux piqûres des glossines. Ces facteurs entretiennent les éléments de la chaîne de transmission de l'infection (Desenclos et De Valk, 2005). L'existence d'un réservoir animal potentiel de *T. b. gambiense* (Njiokou *et al.*, 2006 ; Njiokou *et al.*, 2010; N'Djetchi *et al.*, 2017) ou d'un réservoir résiduel humain pourrait jouer un rôle important dans le maintien de la transmission (Büscher *et al.*, 2018). En effet, les suspects sérologiques sans confirmation parasitologique détectés ne sont pas traités alors que certains sont des porteurs asymptomatiques agissant comme un réservoir (Jamonneau *et al.*, 2010; Jamonneau *et al.*, 2012 ; Bucheton *et al.*, 2011).

La Côte d'Ivoire présentait en 2016, les caractéristiques idéales pour évaluer les algorithmes de diagnostic adaptés pour la détection passive des cas et la surveillance de la maladie et tout en tenant compte des défis à relever pour la rendre efficace. Avant la mise en place de cette étude, cette surveillance reposait sur le centre de Projet de Recherches Cliniques

sur les Trypanosomiasés (PRCT), seul centre de dépistage passif et de traitement du pays (Kaba *et al.*, 2006 ; Kambiré *et al.*, 2012 ; Koffi *et al.*, 2016). Cette situation a limité le nombre d'agents de santé ayant le réflexe de penser à la THA et capables de suspecter la maladie. Une grande majorité des agents de santé en Côte d'Ivoire considère la trypanosomiase humaine africaine (THA) comme une maladie du siècle dernier. Aujourd'hui, la THA est abordée de manière très succincte dans la formation du personnel de santé, quel que soit le niveau de formation. Par ailleurs, les communautés à risque ne considèrent plus la maladie comme une menace.

Dans un contexte de faible prévalence de la THA, la mise en œuvre d'une surveillance passive efficace intégrée au système national de santé (Mitashi *et al.*, 2015) contribuera à relever les défis mentionnés ci-dessus et à améliorer la lutte. Premièrement, elle rappelle aux agents de santé, l'existence de la THA et leur donne les moyens de la dépister à l'aide d'un protocole simple basé sur la suspicion clinique et sérologique avec des tests de diagnostic rapides (TDR) (Jamonneau et Bucheton, 2014). Les résultats des inclusions (en moyenne 12 inclusions / mois / par centre) de cette étude indiquent la bonne intégration de la surveillance passive de la THA dans les différents centres de santé périphériques. Cette adoption du dépistage passif est la conséquence d'une formation continue des agents de santé en charge du protocole ainsi que la disponibilité de nouveaux outils de diagnostic (les TDR) réalisables par du personnel non spécialisé et adaptés aux conditions de ces structures de santé (Lumbala *et al.*, 2013 ; Büscher *et al.* 2014). Elle s'explique également par les supervisions rapprochées des activités de terrain et les formations de recyclage du personnel de santé. La projection du film "La maladie du bout de la piste" (<https://www.youtube.com/watch?v=VwDv5uQhyR0>) a permis également de sensibiliser les agents de santé, mais aussi la population cible de la zone d'étude à la capacité diagnostique des centres de santé. L'objectif étant également d'informer la population de l'existence de la maladie dans la zone tout en rappelant son épidémiologie et les symptômes et signes cliniques évocateurs.

Le dépistage passif présente un atout important dans le sens qu'il rend le diagnostic accessible à l'ensemble des populations à risque tout en ciblant les suspects cliniques même s'ils sont venus consulter pour d'autres raisons (Mitashi *et al.*, 2015). Enfin, la localisation géographique des patients confirmés, permet l'identification de zones potentielles de

transmission et une meilleure orientation des efforts de contrôle. Afin d'assainir le réservoir humain de parasites sur le plan national, les cas confirmés de trypanosomiase humaine africaine (THA) sont suivis et un dépistage réactif ciblé est effectué dans leur environnement de vie (Kambiré *et al.*, 2012). Ainsi, les aspects cliniques, diagnostiques, géographiques et financiers du premier cas confirmé de THA dans cette étude ont été décrits par Koné *et al.* (2020). Le parcours global de la patiente a montré clairement les difficultés qui peuvent être rencontrées pour arriver au bon diagnostic dans un contexte d'élimination de la THA. En effet, la patiente a consulté pendant 3 ans au moins une vingtaine de centres de santé des secteurs public et privé. Elle a utilisé les trois niveaux de la pyramide du système national de santé publique et a rencontré plus d'une centaine de médecins, infirmiers, techniciens de laboratoire et agents de santé communautaire. Ce parcours complexe de recherche de santé et de souffrance avant le diagnostic de cette patiente illustre l'enjeu du diagnostic lorsque les agents de santé et la population ne considèrent plus la THA comme une menace dans un contexte d'élimination. De plus, le retard diagnostique a conduit à un traitement tardif de la patiente qui a beaucoup souffert et qui, après le traitement garde encore des séquelles neurologiques. Il est important de mentionner que cette patiente a eu la vie sauve grâce au système de surveillance passive déployé dans la zone d'endémie au cours de cette étude.

Malheureusement, la surveillance passive présente certaines limites. Elle repose sur la suspicion clinique et risque de détecter les patients principalement lorsqu'ils présentent des symptômes neurologiques et sont donc déjà à un stade avancé de la maladie (Kambiré *et al.*, 2012). C'est une contrainte importante, non seulement pour le patient, mais aussi pour la communauté puisque le sujet constitue un réservoir de parasites et une source de contamination pendant longtemps avant d'être détecté et traité. Pour détecter les cas supplémentaires le plus tôt possible, la surveillance passive doit donc être accompagnée de stratégies de dépistage actif réactif adaptées, tels que le dépistage réactif porte à porte, (Koffi *et al.*, 2016), le suivi spatialisé (Courtin *et al.*, 2010), le suivi des sujets séropositifs (Garcia *et al.*, 2000 ; Ilboudo *et al.*, 2011 ; Ilboudo *et al.*, 2016 ; Ahouty *et al.*, 2017) ou l'identification des villages à risque (Courtin *et al.*, 2019). Il est également essentiel d'informer le personnel de santé que, même si la prévalence de la THA a diminué, la maladie existe toujours et comporte un risque de réapparition (Camara *et al.*, 2017). Le personnel de santé doit être formé en permanence et doit recevoir les moyens

pour diagnostiquer la maladie. Il est tout aussi important de sensibiliser le public aux risques de la trypanosomiase humaine africaine (THA), au niveau local dans les zones à risque, mais aussi au niveau national y compris des informations sur la possibilité d'être dépisté dans les centres de santé primaires. Des difficultés de détection passive des cas de THA dans le contexte d'une baisse significative de la prévalence ont également été observées en République Démocratique du Congo (RDC) (Mudji *et al.*, 2019).

Cliniquement, les symptômes et signes de la maladie du sommeil ne sont pas spécifiques (WHO, 2013) mais un tableau clinique peut être établi afin de suspecter et diagnostiquer la THA. En effet, tout algorithme de dépistage passif débute par des symptômes et signes cliniques de la THA. La sélection des 13 symptômes et signes cliniques d'inclusion était basée sur les lignes directrices de l'OMS pour la surveillance passive, complétées par l'expérience d'experts. Pour tous les participants à l'étude, la présence de ces symptômes et signes cliniques a permis une inclusion systématique. L'analyse détaillée des aspects cliniques des patients inclus dans l'étude a permis de mettre en évidence que parmi les 13 symptômes et signes cliniques recherchés, trois (maux de tête pendant une longue durée, fièvre de longue durée et affaiblissement général) étaient les plus représentés. La fréquence élevée de ces trois symptômes et signes cliniques pourrait être due au paludisme qui est également endémique en Côte d'Ivoire (Fakih, 2014) et toute la population est exposée à la maladie (WHO, 2020). En effet, la clinique de la THA peut souvent prêter à confusion avec d'autres pathologies comme le paludisme qui sévit également dans les pays endémiques de la THA (Mukadi *et al.*, 2016).

Bien que la fréquence des symptômes et signes cliniques chez les patients atteints de THA ait été décrite précédemment (Boa *et al.*, 1988 ; Pepin *et al.*, 1989 ; Jannin *et al.*, 1993 ; Blum *et al.*, 2006 ; WHO, 2013), les critères cliniques qui augmentent la probabilité d'obtenir un TDR positif ou de contracter le THA dans une population visitant l'hôpital n'avaient jamais été étudiés. L'application d'algorithmes cliniques simples facilite la sélection des personnes à tester pour la THA. Les troubles du sommeil, les troubles moteurs, les convulsions, le grand amaigrissement ou les problèmes psychiatriques ont été identifiés comme ayant une probabilité élevée d'être positifs aux tests de diagnostic rapides (TDR) de la THA. Les personnes ne souffrant d'aucun de ces symptômes et signes cliniques avaient une faible probabilité d'être testées positives. Il reste à confirmer si les mêmes critères cliniques de sélection des suspects

sérologiques par les tests de diagnostic rapides (TDR) seraient appropriés dans d'autres pays où la trypanosomiase humaine africaine (THA) est endémique. Au Soudan du Sud, l'algorithme de référence syndromique consistant en des troubles de sommeil, des problèmes neurologiques, une perte de poids et/ou des antécédents d'œdème permettait de mieux identifier la THA au sein d'une population en quête de traitement (Palmer *et al.*, 2013).

L'absence de ganglions lymphatiques cervicaux hypertrophiés, notamment chez les 12 personnes fortement suspectées d'être atteintes de la THA (incluant les deux cas confirmés), a été surprenante car ce signe clinique est considéré comme typique de la THA (WHO, 2013). Ce signe clinique a été observé chez 86,3 % des patients atteints de THA dans le foyer voisin de Daloa dans les années 1980 (Boa *et al.*, 1988).

Malheureusement, la conception de cette étude à propos des symptômes et signes cliniques présente certaines limites. Premièrement, les personnes ne présentant pas l'un des 13 signes et symptômes cliniques d'inclusion n'ont pas été incluses. Certains patients atteints de THA pourraient être oubliés, en particulier les patients de première phase présentant des symptômes légers. Cette limitation est inhérente au cadre de détection passive des cas comme mentionné plus haut. D'ailleurs, il n'est pas garanti que toutes les personnes se présentant au centre de santé avec l'un des 13 signes et symptômes cliniques pour l'inclusion aient effectivement été incluses malgré les efforts de sensibilisation.

L'évaluation prospective de tous les TDR disponibles en parallèle pour le diagnostic de la THA mise en route pour la première fois est un atout important de cette étude. Les études prospectives précédentes ont évalué soit des TDR produits par Standard Diagnostics (Bisser *et al.*, 2016 ; Lumbala *et al.*, 2018), soit par Coris BioConcept (Büscher *et al.*, 2014 ; Boelaert *et al.*, 2018). Une seule étude a comparé les TDR des deux firmes de tests sur du plasma stocké provenant de l'Afrique de l'Ouest (Jamonneau *et al.*, 2015). La séroprévalence de 2,83% obtenue au cours de cette surveillance passive est plus élevée que celle observée par Mulenga et collaborateurs dans trois districts sanitaires endémiques de la THA (Kongolo, Bibanga et Yasa Bonga) en RDC avec une moyenne de 2,7% (Mulenga *et al.*, 2019). La séroprévalence des TDR n'a pas varié au niveau des foyers et du genre des suspects sérologiques ce qui pourrait être dû au fait que les deux zones ont présentés les mêmes caractéristiques du point de vue épidémiologique.

Les estimations de spécificité de 98,9 % pour le SD Bioline HAT et de 97,8 % pour le HAT Sero-K-Set en Côte d'Ivoire approchent les spécificités précédemment rapportées pour ces tests dans des essais prospectifs en Afrique centrale. Pour le SD Bioline HAT, des spécificités de 94,6 % et 98,8 % ont déjà été rapportées (Bisser *et al.*, 2016 ; Lumbala *et al.*, 2018). Cependant, le SD Bioline HAT présente également une spécificité légèrement inférieure de 96,7 % pour la détection passive des cas. Les valeurs de spécificité signalées précédemment en RDC pour le HAT Sero K-Set étaient de 98,6% et 97,0% (Büscher *et al.*, 2014 ; Boelaert *et al.*, 2018). Des spécificités plus faibles d'environ 88% ont été observées avec le SD Bioline HAT et le HAT Sero-K-Set en utilisant des échantillons stockés de plasma provenant de l'Afrique de l'Ouest (Jamonneau *et al.*, 2015). Vue la faible prévalence de la trypanosomiase humaine africaine (THA) dans les deux zones d'étude, une positivité à un test sérologique comme les tests de diagnostic rapides (TDR) pourrait être due à la présence d'autres pathogènes non ciblés par le test car des cas de réactions croisées avec les anticorps d'autres affections comme le VIH ont été mentionnés (Lejon *et al.*, 2010 ; Gillet *et al.*, 2013 ; Bonnet *et al.*, 2018).

Dans l'étude, il a été supposé que les suspects cliniques négatifs aux trois TDR ne souffraient pas de la THA, donc ils n'ont pas été testés ni parasitologiquement ni avec les quatre tests de laboratoire. Bien que la sensibilité de chaque TDR ne soit probablement pas de 100% (Mulenga *et al.*, 2019), il a été supposé qu'une combinaison de trois TDR permettrait de détecter différents profils sérologiques et de ramener la sensibilité à près de 100%, comme décrit par Lumbala *et al.* en 2018. Cette approche pourrait entraîner une surestimation de la spécificité des TDR, mais compte tenu de la très faible prévalence de la THA en Côte d'Ivoire, l'effet sera probablement faible. Les essais prospectifs précédents (Bisser *et al.*, 2016 ; Lumbala *et al.*, 2018) n'ont pas non plus effectué une parasitologie systématique sur tous les négatifs au TDR ou au test d'agglutination sur carte de la trypanosomiase (CATT). Dans la surveillance, les raisons en sont la forte augmentation des coûts diagnostiques, les besoins en infrastructures (8/10 centres de santé de l'étude n'étaient pas équipés pour faire de la parasitologie), et la charge de travail, qui était déjà ressentie comme élevée par le personnel de santé en raison des aspects administratifs et éthiques de l'essai diagnostique. De même, il a été considéré que la probabilité pour qu'un cas réel de THA soit négatif dans l'ensemble des tests sérologiques et moléculaires

de laboratoire était extrêmement faible, et ces patients ont donc été considérés comme de faux positifs aux tests de diagnostic rapides (TDR).

Bien que le dépistage parallèle avec le test d'agglutination sur carte de la trypanosomiase (CATT) ait pu théoriquement être intéressant, également pour la comparaison avec les études diagnostiques précédentes (Büscher *et al.*, 2014 ; Bisser *et al.*, 2016 ; Boelaert *et al.*, 2018 ; Lumbala *et al.*, 2018), il a été considéré comme non pertinent pour le dépistage passif. En effet, 3433 participants dans 10 centres sur 29 mois, soit une moyenne de 12 tests par centre de santé et par mois ont été examinés, ce qui aurait impliqué un gaspillage considérable de réactif de CATT, en particulier dans les centres qui ne peuvent pas stocker le réactif au réfrigérateur. Les taux de fréquentation des centres de santé et d'utilisation des tests dans les centres de santé proposant un diagnostic de la THA dans certaines zones d'endémie de la trypanosomiase humaine africaine (THA° peuvent être extrêmement faibles (Lee et Palmer, 2018).

La sensibilité imparfaite de la mAECT implique que la confirmation parasitologique de vrais positifs aux TDR a pu manquer. Toutefois, les résultats positifs des tests de laboratoire ont été suivis de deux examens parasitologiques supplémentaires dans la mesure du possible. Des efforts importants ont été faits pour confirmer les résultats positifs du TDR. Malheureusement, deux participants séropositifs aux tests de référence sont morts sans avoir bénéficié du suivi parasitologique complet. Il s'agissait peut-être de patients atteints de THA. Comme décrit précédemment, différents examens de la mAECT peuvent être nécessaires pour la confirmation (Wamboga *et al.*, 2017 ; Mulenga *et al.*, 2019).

Pendant la surveillance passive, un taux élevé d'orientation des suspects aux TDR vers les centres de santé capables de faire la parasitologie a été obtenu. En effet, 53/59 (89,8%) des séropositifs aux TDR détectés dans les centres de santé périphériques où l'examen parasitologique n'était pas disponible, ont suivi l'étape de confirmation parasitologique au niveau du centre de diagnostic et traitement (CDT). Lors d'un dépistage passif au Kongo Central en RDC, seuls 39,9 % des séropositifs aux TDR ont pu être correctement référés au CDT pour le test de confirmation (Lumbala *et al.*, 2020). Cette façon d'orienter les séropositifs vers un autre centre capable de faire la confirmation parasitologique est complexe à cause de la faible prévalence de la THA. De plus, la faible valeur prédictive positive des TDR fait que le résultat final est souvent négatif (Wamboga *et al.*, 2017). Egalement, le manquement des

suspects aux tests de diagnostic rapides (TDR) à la confirmation parasitologie pourrait être dû à un manque de moyens financiers. Il est en effet probable que certaines de ces personnes dont l'état de santé est peu altéré ne souhaitent donc pas parcourir de longues distances pour des investigations médicales complémentaires engendrant des dépenses. Les six séropositifs "perdus de vue" ont présenté des symptômes relativement bénins (affaiblissement général, maux de tête et fièvre, troubles du sommeil pour l'un d'entre eux) et ont été testés positifs dans un ou au maximum deux TDR. Certaines études ont montré que la mauvaise communication du personnel de santé aux sujets positifs aux TDR pourrait être une raison de non-achèvement (Lee et Palmer, 2018 ; Mulenga *et al.*, 2019). Dans la présente étude, des réunions régulières entre les coordinateurs nationaux et le personnel de santé auraient pu améliorer la compréhension et créer la motivation, ce qui aurait entraîné de meilleurs efforts de communication envers les participants à l'étude. Un suivi actif des séropositifs aux TDR non parvenus au centre de confirmation parasitologique a été effectué, cette action les a encouragés à se rendre au centre de diagnostic et traitement (CDT).

Un autre point fort de cette étude a été l'examen du sang séché sur papier filtre de quatre tests de laboratoire différents en parallèle : la trypanolyse (TL), l'ELISA/*Trypanosoma brucei gambiense*, la LAMP et la qPCR. Des tests de dépistage utilisant du sang séché sur papier filtre des suspects aux TDR non confirmés afin de sélectionner des individus pour un suivi parasitologique supplémentaire ont déjà été effectués soit par la sérologie (TL et/ou ELISA/*T. b. gambiense*) (Hasker *et al.*, 2010; Camara *et al.*, 2014), soit par des tests moléculaires (Bisser *et al.*, 2016). Jusqu'à présent, la LAMP a été principalement appliqué sur le terrain à des sujets séropositifs et négatifs à la microscopie, pour compenser la sensibilité imparfaite de la microscopie (Wamboga *et al.*, 2017 ; Lumbala *et al.*, 2020). Les tests sérologiques et moléculaires ont rarement été effectués en parallèle (Mumba *et al.*, 2014).

La positivité élevée des échantillons de papier filtre des suspects sérologiques au test moléculaire qPCR m18S pourrait se justifier par la meilleure sensibilité de ce test. En effet, cette technique cible le gène à copie multiple de l'ARN ribosomique 18S du *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum*) (Deborggraeve *et al.*, 2011) ce qui améliorerait sa capacité diagnostique. Des sensibilités élevées de la qPCR m18S ont également été observées dans des études antérieures (Deborggraeve *et al.*, 2011; Mitashi *et al.*, 2013 ; Mumba *et al.*,

2014). Cependant, un échantillon de papier filtre d'un cas confirmé de trypanosomiase humaine africaine (THA) a été négatif à la qPCR ce qui pourrait probablement être dû à la qualité de l'échantillon de sang séché sur papier filtre car une diminution de la sensibilité a déjà été observée lors de l'utilisation de tels spécimens (Mumba *et al.*, 2014 ; Compaoré *et al.*, 2020a). La qPCR TgsGP spécifique à *T. b. gambiense*, qui a été effectué sur l'ensemble des échantillons de papier filtre positifs à la qPCR m18S, a été négative, y compris chez les deux patients atteints de THA confirmée. Des sensibilités limitées de cette technique ont déjà été observées dans des études expérimentales et sur le terrain en RDC (Matovu *et al.*, 2010; Morrison *et al.*, 2007). Ainsi, avec cette sensibilité limitée, ce test ne semble pas approprié au diagnostic de la THA à *T. b. gambiense* selon une étude expérimentale au Burkina Faso (Compaoré *et al.*, 2020a).

L'échantillon de papier filtre d'un cas confirmé de THA diagnostiqué à la phase ultime de la maladie a été négatif à la plupart des tests de laboratoire (trois tests sur quatre). La qualité de l'échantillon du papier filtre ou les conditions de réalisation des tests pourraient causer le manque de sensibilité des tests. Une étude de revue systématique sur la fiabilité des anticorps sur des échantillons de sang séché sur du papier filtre a montré que les anticorps dans les échantillons de papier filtre stockés à 37°C étaient instables (Amini *et al.*, 2021), les concentrations d'anticorps diminuant régulièrement en trois jours seulement (Yel *et al.*, 2015). Par ailleurs, les tests de laboratoire sont tous des méthodes indirectes qui ne peuvent identifier que des cas suspects ou accroître la suspicion de la THA et bien que l'ensemble de ces tests ait une spécificité généralement élevée, on peut avoir des faux positifs en cas de contamination. Dans la présente étude, les spécificités de l'ELISA/*T. b. gambiense* et de la trypanolyse (TL) respectivement de 98,9 % et 94,4 %, ont été probablement sous-estimées, car ces tests ont été effectués sur des personnes présélectionnées avec les tests de diagnostic rapides (TDR) qui s'appuient sur les mêmes antigènes GVS LiTat 1.3 et 1.5 pour la détection des anticorps. Des spécificités rapportées précédemment en RDC étaient de 99,8 % pour l'ELISA/*T. b. gambiense* réalisée sur des échantillons de sang séché sur papier filtre (Hasker *et al.*, 2010) et de 98,0 % pour la trypanolyse (TL) sur sérum (Büscher *et al.*, 2014). Cela ne s'applique pas aux tests moléculaires, pour lesquels la spécificité de 98,9 % de la LAMP observée dans la présente étude pourrait être comparée aux spécificités de 92,8% et 96,4 % observées dans une étude de laboratoire (Mitashi *et al.*, 2013).

La valeur prédictive positive (VPP) et la concordance de la plupart des tests ont été relativement faibles, par rapport aux observations précédentes, en raison de la faible prévalence de la maladie dans les foyers de Bonon et de Sinfra. En RDC, la VPP du test SD Bioline HAT dans la détection passive des cas a été de 14,4% (Lumbala *et al.*, 2020), tandis que chez les patients atteints de troubles neurologiques, la VPP du test HAT Sero-K-Set a été de 50% (Boelaert *et al.*, 2018), pour des prévalences de trypanosomiase humaine africaine (THA) respectives de 0,1-0,8 % et 2,9 %. Il a été observé pour ces précédents TDR des VPP de 4,9 % et 2,5 %, et de 14,3 % pour le rHAT Sero-Strip. Concernant les tests de laboratoire, la VPP a fluctué entre 29 % et 67 %, mais ces tests ont été réalisés sur une population positive aux tests de diagnostic rapides (TDR), donc une population à prévalence plus élevée (2 cas de THA sur 91 séropositifs ou 2,4 %). En raison de la spécificité élevée des combinaisons de tests et à la faible prévalence de la THA, les intervalles de confiance de la VPP ont été larges. De même, la concordance entre les TDR a été plutôt faible. La sensibilité du coefficient kappa à la prévalence se traduit par une valeur Kappa "basse" (Bendahhou *et al.*, 2010). Pareillement, la concordance entre les TDR et les tests de laboratoire varie de faible à modérée, ce qui pourrait être dû au fait que tous les tests ne sont pas basés sur le même principe biologique. Un bon accord a été trouvé entre deux tests de laboratoire (ELISA/*T. b. gambiense* et LAMP), ce qui suggère que ces deux techniques ont des résultats plus concordants et que potentiellement un seul des deux tests pourrait être utilisé dans un futur algorithme de diagnostic.

Les deux cas confirmés de THA diagnostiqués dans les deux foyers endémiques du pays ont été des enfants de 11 ans et 13 ans. Les résultats corroborent ceux d'autres auteurs qui dans leurs études ont mentionné que les enfants ne sont pas indemnes de l'attaque de la THA et le tribut payé est particulièrement lourd (Triolo *et al.*, 1985 ; Boa *et al.*, 1988 ; Kazumba *et al.*, 1993). Ainsi, les deux cas diagnostiqués étaient tous à la deuxième phase de la maladie confirmant le caractère chronique de la THA à *T. b.gambiense* qui peut durer des mois voire des années (Kennedy et Rodgers, 2019). Un autre aspect épidémiologique remarquable dans la surveillance passive est le fait que les deux cas confirmés ont été diagnostiqués plus d'un an après le début des symptômes malgré la présence de centres de santé dans la zone. Des observations similaires ont été faites à Kinshasa, sur 19 malades, aucun diagnostic n'a été posé avant 3 mois d'évolution et 33 % des cas ont été diagnostiqués plus d'un an après le début des

symptômes (Kazumba *et al.*, 1993). Les raisons de ce retard diagnostique sont multiples: le manque de vigilance des parents qui ne s'inquiètent pas assez rapidement des symptômes présentés par l'enfant, la méconnaissance de la trypanosomiase humaine africaine (THA) par le personnel de santé qui évoque d'abord des pathologies plus fréquentes tels que le paludisme, la fièvre typhoïde, la poliomyélite, la tuberculose ou le sida qui se traduit par une errance diagnostique.

Quatre sujets positifs aux tests de diagnostic rapides (TDR) à l'inclusion et aux tests de laboratoire, ont été séroconvertis en négatifs tandis que quatre autres sujets positifs aux TDR et aux tests de laboratoire sont restés positifs au test HAT Sero-K-Set et négatifs à la mAECT à la fin des investigations. Mais pour des raisons de manque de sensibilité de la mAECT, les participants à l'étude qui ont été suivis et positifs aux TDR et aux tests de laboratoire jusqu'à la fin de l'étude pourraient être des cas réels. Ces participants ont donc été orientés vers le programme national d'élimination de la THA (PNETHA) pour poursuivre le suivi.

Ce suivi continu permet d'exclure le risque qu'ils soient des porteurs asymptomatiques (Jamonneau *et al.*, 2010 ; Bucheton *et al.*, 2011 ; Jamonneau *et al.*, 2012). Les porteurs asymptomatiques peuvent agir comme un réservoir de parasites humains et maintenir la transmission de la THA. D'une façon générale, on ne peut pas exclure que des individus positifs aux TDR et aux tests réalisés au laboratoire soient porteurs de trypanosomes. Une hypothèse en cours d'étude, notamment en Côte d'Ivoire, est que *T. b. gambiense* pourrait être présent dans le derme de certains de ces sujets (Camara *et al.*, 2020).

Cependant, la positivité du test pourrait également s'expliquer par une infection transitoire par des trypanosomes animaux. Les taux d'infection par les trypanosomes animaux chez les bovins (5,75%) et les porcs (29,93%) dans les foyers de Bonon et de Sinfra, où la présente étude a eu lieu, sont élevés (N'Djetchi *et al.*, 2017). Les mouches tsé-tsé infectées peuvent également piquer les humains et, pendant la piqûre, injecter des trypanosomes animaux, ce qui peut provoquer une réponse des anticorps et une fausse positivité des tests sérologiques, ou une fausse positivité transitoire des tests moléculaires qui sont spécifiques aux *Trypanozoon*, comme la qPCR m18S ou la LAMP.

Les résultats préliminaires de cette étude ont permis au programme national d'élimination de la THA (PNETHA) d'élaborer deux algorithmes actuellement utilisés en Côte

d'Ivoire. Ces algorithmes dépendent du contexte épidémiologique et des capacités diagnostiques dans les centres de santé. Ils dépendent aussi de la performance et de la disponibilité des tests. Ces algorithmes confirment également le caractère différentiel du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Cette étude a permis de montrer que la THA est toujours présente dans les foyers endémiques de Bonon et Sinfra en Côte d'Ivoire, même si la prévalence est devenue très faible. Egalement, l'étude a donné la possibilité d'élucider un algorithme syndromique basé sur cinq (5) symptômes et signes cliniques clés, capable de discriminer les suspects cliniques à examiner à partir de tests de diagnostic rapides (TDR). L'identification de cinq symptômes et signes cliniques clés permet de simplifier le tri des patients à dépister avec le TDR de la THA.

Les résultats de performance des différents outils de diagnostic ont permis d'élaborer un algorithme diagnostique complet pour la surveillance passive de la THA dans la zone endémique. Concernant les TDR pour le tri des patients, la sensibilité des tests a été un élément capital pour intégrer un quelconque test dans l'algorithme diagnostique de la THA. Ainsi, le dépistage sérologique de la THA peut être effectué en Côte d'Ivoire avec le (s) TDR HAT Sero-*K*-Set et/ou le SD Bioline HAT. Pour les sujets positifs aux TDR, l'algorithme dépend de la disponibilité des tests parasitologiques sur place.

Quant aux tests réalisés au laboratoire, le facteur clé pour retenir un test dans l'algorithme de diagnostic a été la spécificité mais avec une sensibilité acceptable du test afin de confirmer ou infirmer la suspicion à la THA du patient. Outre la trypanolyse, les résultats actuels de cette étude montrent l'intérêt de réaliser le test ELISA / *T. b. gambiense*, qui peut être mis en œuvre dans tous les laboratoires effectuant des tests de l'ELISA. Dans cette étude, le manque de sensibilité du test de la qPCR TgsGP indique que ce test ne semble pas être approprié dans la détection de cas de THA à *T. b. gambiense* surtout en zone de faible prévalence.

Cet algorithme de diagnostic utilisant peu de tests de diagnostic est applicable dans les zones reculées et difficiles d'accès. Le suivi des suspects sérologiques et/ou moléculaires après l'échec des examens parasitologiques de confirmation a été envisagé grâce à la reprise des investigations diagnostiques avec les tests parasitologiques et le(s) TDR initialement positif(s). Le suivi des suspects est une étape cruciale de surveillance de la THA et il peut être réalisé par une petite équipe mobile constituée par les agents du PNETHA et des collaborateurs.

Par ailleurs, l'analyse détaillée des aspects cliniques, diagnostiques, géographiques et financiers de cas de THA, dont le diagnostic a été facilité par cette étude, souligne à la fois la

complexité et l'importance de détecter les derniers cas de THA. La surveillance passive en tant que stratégie de lutte répond mieux au contexte épidémiologique de la maladie en Côte d'Ivoire.

La présente étude a eu des impacts pratiques pour le contrôle de la THA en Côte d'Ivoire. Elle a initié la mise en place d'un réseau de détection passive des cas dans le pays qui pourrait s'étendre à l'ensemble des foyers hypoendémiques et à risque du pays.

L'algorithme diagnostique déterminé au cours de cette étude permettra de pérenniser l'élimination de la THA en tant que problème de santé publique en Côte d'Ivoire, aussi de vérifier l'arrêt de la transmission. Cependant, cet algorithme doit être soutenu par d'autres stratégies adaptées conduisant à lutter contre certaines composantes du triangle épidémiologique de la maladie afin d'éviter des phénomènes de réémergence. Ces efforts multisectoriels conjugués pourraient amener à l'éradication de cette parasitose séculaire.

D'un autre point de vue, les stratégies et les outils de lutte doivent s'adapter continuellement aux nouveaux défis. Mais l'évolution des stratégies et des outils de lutte devra aussi tenir compte des résultats sur les phénomènes biologiques qui pourraient compromettre leur efficacité voire l'avancée vers l'éradication.

PERSPECTIVES

Dans un futur proche, ce travail ayant fourni des axes de recherche pertinents sera à poursuivre et à améliorer dans une étude beaucoup plus approfondie permettant de mettre en place une lutte inclusive et durable de la trypanosomiase humaine africaine (THA).

- 1) Il serait par exemple nécessaire d'évaluer à nouveau les performances des tests de diagnostic en absence de gold standard grâce à l'analyse de classes latentes.
- 2) Il faudrait réaliser aussi des analyses de coût-efficacité concernant la stratégie de lutte utilisée dans le cadre de ce travail.
- 3) Il serait également nécessaire d'évaluer dans les conditions de terrain de nouveaux outils diagnostiques prometteurs comme le TDR SD Bioline HAT 2.0 et le test de l'iELISA (Geerts *et al.*, 2021). Un projet visant à comparer le test SD Bioline HAT 2.0 au test HAT Sero-K-Set dans les 10 centres de santé pour la surveillance de la THA dans les zones endémiques de Bonon et Sinfra sera mis en place. Egalement, un projet d'évaluation de l'iELISA est en élaboration.

Des analyses sont en cours pour le protocole de la surveillance post-élimination qui est le deuxième paquet d'activités réalisé en Côte d'Ivoire dans le cadre de cette étude. L'objectif étant de proposer un système de surveillance de la THA dans les conditions de post-élimination qui permettra de détecter précocement des cas de réémergences dans des foyers considérés comme éteints. Les résultats de cette sous-étude permettront de déterminer la performance, la faisabilité et le coût de la surveillance des foyers de THA à *T. b. gambiense* éteints et de proposer un algorithme de tests que pourra utiliser les équipes mobiles spécialisées pour limiter les risques de réémergence de la THA.

RECOMMANDATIONS

Cette étude s'inscrit dans les objectifs de développement durable (ODD) visant dans son objectif 3 à « permettre à tous de vivre en bonne santé et à promouvoir le bien-être de tous à tout âge ». Ainsi, la lutte contre les maladies tropicales négligées (MTN) comme la trypanosomiase humaine africaine (THA) contribue à alléger le poids qu'elle fait peser au niveau humain et économique sur les communautés les plus pauvres du monde. A l'égard des résultats obtenus au cours de cette étude, nous recommandons :

- ❖ aux pays endémiques en particulier à la Côte d'Ivoire d'intégrer en priorité la lutte contre la THA dans le plan sanitaire national et y consacrer une ligne budgétaire adéquate ;
- ❖ Au programme national d'élimination de la THA (PNETHA) d'accroître son management en mettant en place une action multisectorielle planifiée très en amont afin de faire naître la volonté politique pour soutenir les activités de lutte contre la THA ;
- ❖ Aussi, au PNETHA, de faire de la sensibilisation, une stratégie de lutte à part entière qui aidera le personnel sanitaire ainsi que l'ensemble des populations à une prise de conscience considérable vis-à-vis de cette parasitose ;
- ❖ Aux populations de s'approprier des activités de lutte contre la THA tout en facilitant leur mise en œuvre.

REFERENCES

- Acosta-Serrano A., Vassella E., Liniger M., Kunz Renggli C., Brun R., Roditi I. & Englund P.T. (2001). The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: Programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4): 1513-1518.
- Adams E. & Hamilton P. (2008). New molecular tools for the identification of trypanosome species. *Future Microbiology*, 3(2): 167-176.
- Ahmed H.A., MacLeod E.T., Hide G., Welburn S.C. & Picozzi K. (2011). The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasites & Vectors*, 4(1): 1-7.
- Ahouty B., Koffi M., Ilboudo H., Simo G., Matovu E., Mulindwa J., Hertz-Fowler C., Bucheton B., Sidibé I., Jamonneau V., MacLeod A., Noyes H. & N'Guetta S.P. (2017) Candidate genes-based investigation of susceptibility to Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11(10): 1-13.
- Alirol E., Schrumpp D., Amici Heradi J., Riedel A., Patoul C., Quere M. & Chappuis F. (2013). Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy for Second-Stage Gambiense Human African Trypanosomiasis: Médecins sans frontières experience in the Democratic Republic of the Congo. *Clinical Infectious Diseases*, 56(2): 195-203.
- Amini F., Auma E., Hsia Y., Bilton S., Hall T., Ramkhelawon L., Heath P.T. & Doare K.L. (2021). Reliability of dried blood spot (DBS) cards in antibody measurement: A systematic review. *PLOS ONE*, 16(3): 1-21.
- Añez N. (1982). Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. IV - A reconsideration of its systematic position. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 77(4): 405-415.
- Aonuma H., Yoshimura A., Kobayashi T., Okado K., Badolo A., Nelson B., Kanuka H. & Fukumoto S. (2010). A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes. *Experimental Parasitology*, 125(2): 179-183.
- Balmer O., Beadell J.S., Gibson W. & Caccone A. (2011). Phylogeography and taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(2): 1-11.
- Barrett M.P., Burchmore R.J., Stich A., Lazzari J.O., Frasch A.C., Cazzulo J.J., Krishna S. (2003). "Les trypanosomoses". *Lancette*, 362(9394): 1469-80.

- Becker S., Franco J.R., Simarro P. P., Stich A., Abel P.M. & Steverding D. (2004). Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50(3): 193-199.
- Bendahhou K., El Fakir S., Obtel M., Abda N., Najdi A. & Nejjar C. (2010). Mesures de l'accord entre 2 ou plusieurs juges: Cas des variables qualitatives. *Journal d'Epidémiologie et de Santé Publique*, 5: 51-55.
- Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., Blandin G., Renault H., Bartholomeu D.C., Lennard N.J., Caler E., Hamlin N.E., Haas B., Böhme U., Hannick L., Aslett M.A., Shallom J., Marcello L., Hou L., Wickstead B., Alsmark U.C.M., Arrowsmith C. & El-Sayed N.M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733): 416-422.
- Bisser S., Lumbala C., Nguertoum E., Kande V., Flevaud L., Vatunga G., Boelaert M., Büscher P., Josenando T., Bessell P.R., Biéler S. & Ndung'u J.M. (2016). Sensitivity and specificity of a prototype rapid diagnostic test for the detection of *Trypanosoma brucei gambiense* infection: A multi-centric prospective study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4): 1-16.
- Boa Y.F., Traore M.A., Doua F., Kouassi-Traore M.T. & Kouassi B.E. (1988). Les différents tableaux cliniques actuels de la trypanosomiase humaine africaine à *T. b. gambiense* analyse de 300 dossiers du foyer de Daloa, Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 81(3): 427-444.
- Boehme C.C., Nabeta P., Henostroza G., Raqib R., Rahim Z., Gerhardt M., Sanga E., Hoelscher M., Notomi T., Hase T. & Perkins M.D. (2007). Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6): 1936-1940.
- Boelaert M., Mukendi D., Bottieau E., Kalo Lilo J.R., Verdonck K., Minikulu L., Barbé B., Gillet P., Yansouni C.P., Chappuis F. & Lutumba P. (2018). A phase III diagnostic accuracy study of a rapid diagnostic test for diagnosis of second-stage human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *EBioMedicine*, 27 (8): 11-17.

-
- Bonnet J., Ducroix-Roubertou S., Rogez S., Ajzenberg D., Courtioux B. & Faucher J. (2018). Faux positifs avec les tests de diagnostic rapide du VIH au cours de la Trypanosomose humaine africaine : Étude rétrospective de cohorte. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 48(4): 68-69.
- Brault J. (1898). Contribution à la géographie médicale des maladies africaines', *Janus*, paris, France, 3 : 36-42.
- Bruce D. et Nabarro D. (1903a). Note on the discovery of a New *Trypanosoma*, *Proceedings of the Royal Physical Society of Edinburgh*, 19 : 483-496.
- Bruce D. & Nabarro D. (1903b). Can the Uganda tsetse fly carry the trypanosome found in sleeping sickness from animal to animal. *Report of the Sleeping Sickness Commission*; 1: 11-88.
- Brun R., Blum J., Chappuis F. & Burri C. (2010). Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, 375(9709): 148-159.
- Bucheton B., MacLeod A. & Jamonneau V. (2011). Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Parasite Immunology*, 33(8): 438-447.
- Büscher P., Bart J-M., Boelaert M., Bucheton B., Cecchi G., Chitnis N., Courtin D., Figueiredo L.M., Franco J.R., Grébaud P., Hasker E., Ilboudo H., Jamonneau V., Koffi M., Lejon V., MacLeod A., Masumu J., Matovu E., Mattioli R., Noyes H., Picado A., Rock K.S., Rotureau B., Simo G., Thévenon S., Trindade S., Truc P. & Reet N.V. (2018). Do cryptic reservoirs threaten gambiense sleeping sickness elimination? *Trends in parasitology*, 34(3): 197-207.
- Büscher P., Cecchi G., Jamonneau V. & Priotto G. (2017). Human African trypanosomiasis *Lancette*, 390: 2397-2409.
- Büscher P. & Deborggraeve S. (2015). How can molecular diagnostics contribute to the elimination of human African trypanosomiasis? *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(5): 607-615.
- Büscher P., Depla E., Magnus E. & Van Meirvenne N. (1995). A serodiagnostic ELISA using variable antigens of *Trypanosoma brucei gambiense*. In KR. Sones (Ed.), *International*

-
- Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control (ISCTRC); twenty second meeting*, 1993, Kampala, Uganda, pp 46-52.
- Büscher P., Gillemann Q. & Lejon V. (2013). Rapid diagnostic test for sleeping sickness. *The New England Journal of Medicine*, 368(11): 1069-1070.
- Büscher P., Mertens P., Leclipteux T., Gillemann Q., Jacquet D., Mumba-Ngoyi D., Pyana P.P., Boelaert M. & Lejon V. (2014). Sensitivity and specificity of HAT Sero-K-SeT, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense* : A case-control study. *The Lancet Global Health*, 2(6): 359-363.
- Büscher P., Ngoyi D.M., Kaboré J., Lejon V., Robays J., Jamonneau V., Bebronne N., Veken W.V. & Biéler S. (2009). Improved models of mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(11): 471-474.
- Camara M., Kaba D., Kagbadouno M., Sanon J.R., Ouendeno F.F. & Solano P. (2005). Human African trypanosomiasis in the mangrove forest in Guinea : Epidemiological and clinical features in two adjacent outbreak areas. *Medecine tropicale: revue du Corps de santé colonial*, 65(2): 155-161.
- Camara M., Ouattara E., Duvignaud A., Migliani R., Camara O., Leno M., Solano P., Bucheton B., Camara M. & Malvy D. (2017). Impact of the Ebola outbreak on *Trypanosoma brucei gambiense* infection medical activities in coastal Guinea, 2014-2015: A retrospective analysis from the Guinean national human African trypanosomiasis control program. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 11(11): 1-15.
- Camara M., Soumah A.M., Ilboudo H., Travaille C., Clucas C., Cooper A., Kuispond Swar N.R., Camara O., Sadissou I., Calvo Alvarez E., Crouzols A., Bart J.M., Jamonneau V., Camara M., MacLeod A., Bucheton B. & Rotureau B. (2020). Extravascular dermal trypanosomes in suspected and confirmed cases of gambiense human African trypanosomiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 73(1): 12-20.
- Camara O., Camara M., Lejon V., Ilboudo H., Sakande H., Leno M., Büscher P., Bucheton B. & Jamonneau V. (2014). Immune trypanolysis test with blood spotted on filter paper for epidemiological surveillance of sleeping sickness. *Tropical Medicine & International Health*, 19(7): 828-831.

- Capewell P., Clucas C., De Jesus E., Kieft R., Hajduk S., Veitch N., Steketee P.C., Cooper A., Weir W. & MacLeod A. (2013). The TgsGP gene is essential for resistance to human serum in *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Pathogens*, 9(10): 1-6.
- Castellani A. (1903). On the discovery of a species of *Trypanosoma* in the cerebro-spinal fluid of cases of sleeping sickness. *Proceedings of the Royal Society*; **71**: 501-508.
- Cattand P., Jannin J. & Lucas P. (2001). Sleeping sickness surveillance : An essential step towards elimination. *Tropical medicine & international health*, 6(5): 348-361.
- Cattand P., Miezán B.T. & De Raadt P. (1988). Human African trypanosomiasis : Use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bulletin of the World Health Organization*, 66(1): 83-86.
- Chappuis F., Loutan L., Simarro P., Lejon V. & Büscher P. (2005). Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. *Clinical microbiology reviews*, 18(1): 133-146.
- Compaoré C.F., Ilboudo H., Kaboré J., Kaboré J.W., Camara O., Bamba M., Sakande H., Koné M., Camara M., Kaba D., Gaston Belem A.M., Deborggraeve S., Büscher P., Bucheton B., Lejon V. & Jamonneau V. (2020a). Analytical sensitivity of loopamp and quantitative real-time PCR on dried blood spots and their potential role in monitoring human African trypanosomiasis elimination. *Experimental Parasitology*, 219(42): 1-6.
- Compaoré C.F., Koné M., Camara O., Courtin F., Kaboré J., Bucheton B., Kaba D., Rotureau B., Camara M., Koffi M., Solano P., Bart J.M., Lejon V., Jannin J. & Jamonneau V. (2020b). Evolution des stratégies de lutte contre la trypanosomiase humaine africaine dans un contexte de transition épidémiologique. *Bulletin de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur*, 240(62): 57-63.
- Coulibaly B., Fauret P., Courtin F. & Assi-kaudjhis J.P. (2019). Approche géographique de la maladie du sommeil en zone forestière : Comparaison des secteurs de Bonon, Sinfra et Méagui. *Revue de géographie du laboratoire Leïdi*, 3(16): 142-158.
- Courtin F. (2007). Les dynamiques de peuplement induites par la crise ivoirienne dans l'espace ivoiro-burkinabè, au regard de la maladie du sommeil. Mémoire de thèse de Montpellier 3, Montpellier, France, 310 p.
- Courtin F., Camara M., Rayaisse J.B., Kagbadouno M., Dama E., Camara O., Traoré I.S., Rouamba J., Peylhard M., Somda M.B., Leno M., Lehane M.J., Torr S.J., Solano P.,

- Jamonneau V. & Bucheton B. (2015). Reducing human-Tsetse contact significantly enhances the efficacy of sleeping sickness active screening campaigns : A promising result in the context of elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8): 1-12.
- Courtin F., Camara O., Camara M., Kagbadouno M., Bucheton B., Solano P. & Jamonneau V. (2019). Sleeping sickness in the historical focus of forested Guinea : Update using a geographically based method. *Parasite*, 26(61): 1-12.
- Courtin F., Dupont S., Zeze D.G., Jamonneau V., Sané B., Coulibaly B., Cuny G. & Solano P. (2005). Human African trypanosomiasis: urban transmission in the focus of Bonon (Côte d'Ivoire). *Tropical Medicine of International Health*, 4(10): 340-346.
- Courtin F., Jamonneau V., Camara M., Camara O., Coulibaly B., Diarra A., Solano P. & Bucheton B. (2010). A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Tropical Medicine & International Health*, 15(8): 881-889.
- Cross G.A.M., Kim H-S. & Wickstead B. (2014). Capturing the variant surface glycoprotein repertoire (the VSGnome) of *Trypanosoma brucei* Lister 427. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(1): 59-73.
- Dama E., Camara O., Kaba D., Koffi M., Camara M., Compaoré C., Ilboudo H., Courtin F., Kaboré J., N'Gouan E.K., Büscher P., Lejon V., Bucheton B. & Jamonneau V. (2019). Immune trypanolysis test as a promising bioassay to monitor the elimination of gambiense human African trypanosomiasis. *Parasite*, 26(68): 1-7.
- Daniel S. (1969). Méthodes statistique à l'usage des médecins et des biologistes. *Médecine-Sciences Flammarion*, 1988(1): 318 p.
- Daniel W.W. (1991). Biostatistics : A foundation for Analysis in the Health Sciences. Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane- Toronto-Singapore, 5th edition. 740 S., softcover f 17,50, cloth E 45.80. *Biometrical Journal*. 34: 644-644.
- Darji A., Lucas R., Magez S., Torreele E., Palacios J., Sileghem M.R., Bajyana S.E., Hamers R. & Baetselier P. (1992). Mechanisms underlying trypanosome-elicited immunosuppression. *Annales de la société Belge de médecine tropicale*, 21p.
- Deborggraeve S. & Büscher P. (2012). Recent progress in molecular diagnosis of sleeping sickness. *Expert review of molecular diagnostics*, 4(12): 719-730.

- Deborggraeve S., Lejon V., Ekangu R. A., Ngoyi D.M., Pyana P.P., Ilunga M., Mulunda J.P., & Büscher P. (2011). Diagnostic Accuracy of PCR in gambiense sleeping sickness diagnosis, staging and post-treatment follow-up: A 2-year longitudinal study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(2): 1-7.
- De Raadt P. (2005). The history of sleeping sickness. *Fourth International Cours on African Trypanosomoses. Tunis : WHO*, 15p. http://www.who.int/trypanosomiasis_african/country/history/en/index.html. Consulté le 06/08/2019.
- Desenclos J.C. & De Valk H. (2005). Les maladies infectieuses émergentes : Importance en santé publique, aspects épidémiologiques, déterminants et prévention. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 35(2): 49-61.
- Desquesnes M. & Davila A.M.R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: A review and perspectives. *Veterinary parasitology*, 109(3-4): 213-231.
- Dje N.N., Miezán T.W., N'guessan P., Brika P., Doua F. & Boa F. (2002). Distribution géographique des trypanosomés pris en charge en Côte d'Ivoire de 1993 à 2000. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 95(5): 359-361.
- DNDi-HAT. (2018). Newer, simpler treatments for sleeping sickness. https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2018/09/DNDi_HAT_2018.pdf. Consulté le 23/06/2019.
- Dutton J.E. (1902). Preliminary note upon a trypanosome occurring in the blood of man. *British medical journal*, 4: 455-468.
- Dyer N.A., Rose C., Ejeh N.O. & Acosta-Serrano A. (2013). Flying tryps: Survival and maturation of trypanosomes in tsetse flies. *Trends in Parasitology*, 29(4): 188-196.
- Ekwanzala M., Pépin J., Khonde N., Molisho S., Bruneel H. & Wals P.D. (1996). In the heart of darkness : Sleeping sickness in Zaire. *The Lancet*, 348(9039): 1427-1430.
- Engstler M., Thilo L., Weise F., Grünfelder C.G., Schwarz H., Boshart M. & Overath P. (2004). Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 117(7): 1105-1115.

-
- Eperon G., Balasegaram M., Potet J., Mowbray C., Valverde O & Chappuis F. (2014). Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*;12 (11) : 1407–1417.
- Ersfeld K., Melville S.E. & Gull K. (1999). Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 15(2): 58-63.
- Fakih C. (2014). Le paludisme en Côte d’Ivoire : État des lieux et stratégies de lutte. *Pharmaceutical sciences. 2014. HAL Id : Dumas-01010221*. Mémoire de thèse de médecine, Université de Bordeaux, Bordeaux, France, 312p.
- Fang X., Liu Y., Kong J. & Jiang X. (2010). Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens. *Analytical Chemistry*, 82(7): 3002-3006.
- Fauret P., Coulibaly B., Ouattara A., Krouba D., Kouakou C., Berté D., Ta Bi Tra D., Adopo R., Gabé A. & Adingra P. (2018). Café-cacao de Côte d’Ivoire et trypanosomiase humaine africaine (2CI-THA) : Un atlas au service de l’élimination de la THA en Côte d’Ivoire, 91p.
- Ferguson M.A.J. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *Journal of Cell Science*, 112 (17): 2799-2809.
- Ferguson M.A.J. (2000). Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20): 10673-10675.
- Fèvre E., Picozzi K., Fyfe J., Waiswa C., Odiit M., Coleman P. & Welburn S. (2005). A burgeoning epidemic of sleeping sickness in Uganda. *The Lancet*, 366(9487): 745-747.
- Forde R.M. (1902). Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosoma was observed. *Journal of tropical Medecine*, 5(6): 261-263.
- Franco J.R., Cecchi G., Priotto G., Paone M., Diarra A., Grout L., Mattioli R. C. & Argaw D. (2017). Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis : Update to 2014. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5): 1-26.

-
- Franco J.R., Cecchi G., Priotto G., Paone M., Diarra A., Grout L., Simarro P.P., Zhao W. & Argaw D. (2018). Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: Update to 2016. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 12(12): 1-16.
- Franco J.R., Cecchi G., Priotto G., Paone M., Diarra A., Grout L., Simarro P.P., Zhao W. & Argaw D. (2020). Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis at continental and country level : Update to 2018. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(5): 1-18.
- Franco J.R., Simarro P.P., Diarra A. & Jannin J.G. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology*, 2014(6): 257-275.
- Franco J.R., Simarro P.P., Diarra A., Ruiz-Postigo J.A., Samo M. & Jannin J.G. (2012). Monitoring the use of nifurtimox-eflornithine combination therapy (NECT) in the treatment of second stage gambiense human African trypanosomiasis. *Research and reports in tropical medicine*. 3(8): 93-101.
- Garcia A., Jamonneau V., Magnus E., Laveissière C., Lejon V., N'guessan P., N'dri L., Meirvenne N.V. & Büscher P. (2000). Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d'Ivoire : Evidence for a complex and heterogeneous population. *Tropical Medicine & International Health*, 5(11): 786-793.
- Gibson W.C. (1989). Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. Brucei*. *Parasitology*, 99(3): 391-402.
- Gibson W.C (2002). Epidemiology and diagnosis of African trypanosomiasis using DNA probes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 9(96): 141-143.
- Gibson W.C., Peacock L., Ferris V., Williams K. & Bailey M. (2006). Analysis of a cross between green and red fluorescent trypanosomes. *Biochemical Society Transactions Portland Press*, 34 (4): 557-559
- Gibson W.C. (2007). Resolution of the species problem in african trypanosomes. *International Journal for parasitology*. 37(8-9) : 829-838.
- Gibson W.C (2009). Species-specific probes for the identification of the African tsetse-transmitted trypanosomes. *Parasitology*, 136(12): 1501-1507.

-
- Gibson W.C (2021). The sexual side of parasitic protists. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 243(111371): 1-7.
- Gillet P., Ngoyi D.M., Lukuka A., Kande V., Atua B., Griensven J. van, Muyembe J.J., Jacobs J. & Lejon V. (2013). False positivity of non-targeted infections in malaria rapid diagnostic tests : The case of human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4): 1-7.
- Gobert A.P., Daulouede S., Lepoivre M., Boucher J.L., Bouteille B., Buguet A., Cespuglio R., Veyret B. & Vincendeau P. (2000). L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infection and Immunity*, 68(8): 4653-4657.
- Grab D.J., Nikolskaia O.V., Courtioux B., Thekiso O.M.M., Magez S., Bogorad M., Dumler J.S. & Bisser S. (2019). Using detergent-enhanced LAMP for African trypanosome detection in human cerebrospinal fluid and implications for disease staging. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(8): 1-15.
- Greenwood B.M. & Whittle H.C. (1973). Cerebrospinal-fluid IgM in patients with sleeping-sickness. *The Lancet*, 302(7828): 525-527.
- Gruby D. (1843). Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, Trypanosoma sanguinis. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences*, paris, France, 17 : 1134-1136.
- Gutiérrez-Corbo C., Domínguez-Asenjo B., Martínez-Valladares M., Pérez-Pertejo Y., García-Estrada C., Balaña-Fouce R. & Reguera R.M. (2021). Reproduction in Trypanosomatids : Past and Present. *Biology*, 10(6): 471.
- Hasker E., Kwete J., Luz R.I., Mpanya A., Bebronne N., Makabuza J., Claeys Y., Ilunga J., Lejon V., Ngoyi D.M., Büscher P., Boelaert M. & Miaka E.M. (2018). Innovative digital technologies for quality assurance of diagnosis of human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9): 1-6.
- Hasker E., Lumbala C., Mbo F., Mpanya A., Kande V., Lutumba P. & Boelaert M. (2011). Health care-seeking behaviour and diagnostic delays for human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo : Diagnosing HAT in DRC. *Tropical Medicine & International Health*, 16(7): 869-874.

- Hasker E. Lumbala C. & Mpanya A. (2015). Alternative strategies for case finding in human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *Tropical Medicine International Health*, 3(20): 2-093.
- Hasker E., Lutumba P., Chappuis F., Kande V., Potet J., Weggheleire A.D., Kambo C., Depoortere E., Pécoul B. & Boelaert M. (2012). Human African Trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo : A Looming emergency? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12): 1-3.
- Hasker E., Lutumba P., Mumba D., Lejon V., Büscher P., Kande V., Muyembe J.J., Menten J., Robays J. & Boelaert M. (2010). Diagnostic accuracy and feasibility of serological tests on filter paper samples for outbreak detection of *T. b. gambiense* human African trypanosomiasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83(2): 374-379.
- Hayashida K., Nambala P., Reet N.V., Büscher P., Kawai N., Mutengo M.M., Musaya J., Namangala B., Sugimoto C. & Yamagishi J. (2020). Development of a bio-inkjet printed LAMP test kit for detecting human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(10): 1-17.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. & Williams P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- Heitman J. (2006). Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Current Biology*, 16(17): 711-725.
- Hervouët J.P., Laffly D. & Cardon L. (2000). La maladie du sommeil en Côte d'Ivoire : À la recherche d'indicateurs de risque. *Espace Populations Sociétés*, 18(2): 209-225.
- Hide G. (1999). History of sleeping sickness in East Africa. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1): 112-125.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G. & Watson R. (1993). Kinetic PCR Analysis : Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11(9): 1026-1030.
- Hoare C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. *A Zoological Monograph*. 749p. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19722902365>. Consulté le 06/05/2021.
- Horn D. (2014). Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(2): 123-129.

- Hovel-Miner G., Mugnier M., Papavasiliou F.N., Pinger J. & Schulz D. (2015). A host-pathogen interaction reduced to first principles : Antigenic variation in *T. brucei*. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 57: 23-46.
- Ibn K. (1927). Histoire des Berbères des dynasties musulmanes de l'Afrique septentrionale (traduit de l'arabe en français par le baron de Slane), *Librairie orientaliste Paul Gueuthne*, Paris, France, 115p.
- Ilboudo H., Jamonneau V., Camara M., Camara O., Dama E., Léo M., Ouendeno F., Courtin F., Sakande H., Sanon R., Kaboré J., Coulibaly B., N'Dri L., Diarra A., N'Goran E. & Bucheton B. (2011). Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forécariah mangrove focus (Guinea) : Perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes and Infection*, 13(11): 943-952.
- Ilboudo H., Jamonneau V., Koffi M., Kaboré J., Amoussa R., Holzmüller P., Garcia A., Bucheton B. & Courtin D. (2016). Trypanosome-induced Interferon- γ production in whole blood stimulation assays is associated with latent *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Microbes and infection*, 2016(18): 436-440.
- Jacobs R.T., Nare B., Wring S.A., Orr M.D., Chen D., Sligar J.M., Jenks M.X., Noe R.A., Bowling T.S., Mercer L.T., Rewerts C., Gaukel E., Owens J., Parham R., Randolph R., Beaudet B., Bacchi C.J., Yarlett N., Plattner J.J. & Don R. (2011). SCYX-7158, an Orally-Active Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6): 1-11.
- Jamonneau V. & Bucheton B. (2014). The challenge of serodiagnosis of sleeping sickness in the context of elimination. *The Lancet Global Health*, 2(6): 306-307.
- Jamonneau V., Bucheton B., Kaboré J., Ilboudo H., Camara O., Courtin F., Solano P., Kaba D., Kambire R. & Lingue K. (2010). Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12): 1-8.
- Jamonneau V., Camara O., Ilboudo H., Peylhard M., Koffi M., Sakande H., N'Dri L., Sanou D., Dama E., Camara M. & Lejon V. (2015). Accuracy of individual rapid tests for serodiagnosis of gambiense sleeping sickness in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2): 1-9.

- Jamonneau V., Ilboudo H., Kaboré J., Kaba D., Koffi M., Solano P., Garcia A., Courtin D., Laveissière C. & Lingue K. (2012). Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6): 1-7.
- Jannin J., Moulia-Pelat J.P., Chanfreau B., Penchenier L., Louis J.P., Nzaba P., Baume F.E., Eozenou P. & Cattand P. (1993). African human trypanosomiasis : Study of a scoring system of presumptive diagnosis in the Congo. *Bulletin of the World Health Organization*, 71(2): 215-222.
- Jensen R.E. & Englund P.T. (2012). Network news: The replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, 5(66): 473-491.
- Johnson P.L.F., Kochin B.F., Ahmed R. & Antia R. (2012). How do antigenically varying pathogens avoid cross-reactive responses to invariant antigens? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1739): 2777-2785.
- Kaba D., Dje N.N., Courtin F., Oke E., Koffi M., Garcia A., Jamonneau V. & Solano P. (2006). L'impact de la guerre sur l'évolution de la THA dans le centre-ouest de la cote d'ivoire. *Tropical Medicine & International Health*, 11(2): 136-143.
- Kaba D., Djohan V., Berté D., Ta B. T.D., Selby R., Kouadio K.A.D.M., Coulibaly B., Traoré G., Rayaisse J.B., Fauret P., Jamonneau V., Lingue K., Solano P., Torr S.J. & Courtin F. (2021). Use of vector control to protect people from sleeping sickness in the focus of Bonon, Côte d'Ivoire. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(6): 1-18.
- Kabiri M., Franco J.R., Simarro P.P., Ruiz J.A., Sarsa M. & Steverding D. (1999). Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Tropical Medicine & International Health*, 4(10): 658-661.
- Kagbadouno M., Camara O., Camara M., Ilboudo H., Camara M., Rayaisse J.B., Diaby A., Traoré B., Leno M., Courtin F., Jamonneau V., Solano P. & Bucheton B. (2018). Ebola outbreak brings to light an unforeseen impact of tsetse control on sleeping sickness transmission in Guinea. *bioRxiv*, 20(27): 44-62.
- Kambiré R., Lingué K., Courtin F., Sidibé I., Kiendrébéogo D., N'gouan K.E., Blé L., Kaba D., Koffi M., Solano P., Bucheton B. & Jamonneau V. (2012). La trypanosomose humaine

- africaine dans l'espace ivoiro-burkinabé : Optimisation des stratégies de surveillance épidémiologique. *Parasite*, 19(4): 389-396.
- Kanmogne G.D., Asonganyi T. & Gibson W.C. (1996). Detection of *Trypanosoma brucei gambiense*, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 90(5): 475-483.
- Kazumba M., Kazadi K. & Mulumba M.P. (1993). Characteristics of trypanosomiasis in children. A propos of 19 case reports at the CNPP (Neuro-Psycho-Pathology Center), University Hospitals of Kinshasa, Zaire. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*, 73(4): 253-259.
- Kennedy P.G.E., Rodgers J. (2019). Clinical and neuropathogenetic aspects of human African trypanosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 10(39): 1664-3224.
- Koffi M., N'Djetchi M., Ilboudo H., Kaba D., Coulibaly B., N'Gouan E., Kouakou L., Bucheton B., Solano P., Courtin F., Ehrhardt S. & Jamonneau V. (2016). A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Côte d'Ivoire. *Parasite*, 10(51): 23-74.
- Koffi M., Solano P., Barnabé C., De Meeûs T., Bucheton B., Cuny G. & Jamonneau V. (2007). Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei s.l.* using microsatellite typing : New perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(6): 675-684.
- Koné M., N'Gouan E.K., Kaba D., Koffi M., Kouakou L., N'Dri L., Kouamé C.M., Nanan V.K., Tapé G.A. & Coulibaly B. (2020). The complex health seeking pathway of a human African trypanosomiasis patient in Côte d'Ivoire underlines the need of setting up passive surveillance systems. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(9): 1-14.
- Kuboki N., Inoue N., Sakurai T., Di Cello F., Grab D.J., Suzuki H., Sugimoto C. & Igarashi I. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12): 5517-5524.
- Kyambadde J.W., Enyaru J.C.K., Matovu E., Odiit M. & Carasco J.F. (2000). Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(6): 119-124.

- Landis J.R. & Koch G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *International Biometric Society*, 33(1): 159-174.
- Langousis G. & Hill K.L. (2014). Motility and more : The flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7): 505-518.
- Lanham S.M. & Godfrey D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, 28(3): 521-534.
- Laura S.M., Förstner K.U., Guizetti J., Wedel C., Kaplan N., Janzen C.J., Arampatzi P., Vogel J., Steinbiss S., Otto T.D., Saliba A.E., Sebra R.P., Siegel T.N. & Müller R.O. (2018). Genome organization and DNA accessibility control antigenic variation in trypanosomes. *Nature*, 563(7729): 121-125.
- Laveissière C., Garcia A. & Sané B. (2003). Lutte contre la maladie du sommeil et soins de santé primaire. *IRD Editions*. Montpellier, France, 236p.
- Laveissière C & Penchenier C. (2005). Manuel de lutte contre la maladie du sommeil. *IRD Editions*; paris, France 4 : 1-359.
- Laveissière C., Sane B., Diallo P.B., Truc P., Meda A.H. (1997). Le risque épidémiologique dans un foyer de maladie du sommeil en Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*; 2(8): 729-732.
- Laveran A. (1902). De l'action du serum humain sur le trypanosome du Nagana (*Trypanosoma brucei*). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences.*, 134: 735-739.
- Lee S.J. & Palmer J.J. (2018). Integrating innovations : A qualitative analysis of referral non-completion among rapid diagnostic test-positive patients in Uganda's human African trypanosomiasis elimination programme. *Infectious Diseases of Poverty*, 7(1): 84-87.
- Lejon V., Bentivoglio M. & Franco J.R. (2013). Human African trypanosomiasis. *Handbook of Clinical Neurology*, 114: 169-181.
- Lejon V., Büscher P., Nzoumbou-Boko R., Bossard G., Jamonneau V., Bucheton B., Truc P., Lemesre J.L., Solano P. & Vincendeau P. (2019). The separation of trypanosomes from blood by anion exchange chromatography : From Sheila Lanham's discovery 50 years ago to a gold standard for sleeping sickness diagnosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2): 1-5.

- Lejon V., Jamonneau V., Solano P., Atchade P., Mumba D., Nkoy N., Bebronne N., Kibonja T., Balharbi F. & Wierckx A. (2006). Detection of trypanosome-specific antibodies in saliva, towards non-invasive serological diagnosis of sleeping sickness. *Tropical Medicine & International Health*, 11(5): 620-627.
- Lejon V., Legros D., Richer M., Ruiz J. A., Jamonneau V., Truc P., Doua F., Djé N., N'Siesi F.X., Bisser S., Magnus E., Wouters I., Konings J., Vervoort T., Sultan F. & Büscher P. (2002). IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. *Tropical Medicine & International Health*, 7(8): 685-692.
- Lejon V., Ngoyi D.M., Boelaert M. & Büscher P. (2010). A CATT negative result after treatment for human African trypanosomiasis is no indication for cure. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(1): 1-4.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom I.J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. & Wallace F.G. (1980). A newly revised classification of the Protozoa*. *The Journal of Protozoology*, 27(1): 37-58.
- Lin R.H., Lai D.H., Zheng L.L., Wu J., Lukeš J., Hide G. & Lun Z.R. (2015). Analysis of the mitochondrial maxicircle of *Trypanosoma lewisi*, a neglected human pathogen. *Parasites & Vectors*, 8(665): 1-11.
- Liu B., Liu Y., Motyka S.A., Agbo E.E.C. & Englund P.T. (2005). Fellowship of the rings : The replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, 21(8): 363-369.
- Liu M.K., Cattand P., Gardiner I.C. & Pearson T.W. (1989). Immunodiagnosis of sleeping sickness due to *Trypanosoma brucei gambiense* by detection of antiprocytic antibodies and trypanosome antigens in patients' sera. *Acta Tropica*, 46(4): 257-266.
- Louis F.J., Buscher P. & Lejon V. (2001). Le diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine en 2001. *Medecine. Tropicale*, 61(4-5): 340-346.
- Louis F.J., Keiser J., Simarro P.P., Schmid C., Jannin J. (2003). L'éflornithine dans le traitement de la maladie du sommeil. *Médecine Tropicale*. 63(6) : 559-63.
- Louis F.J., Simarro P.P., Lucas P. (2002). Maladie du sommeil : cent ans d'évolution des stratégies de lutte : la trypanosomose humaine africaine. *Bulletins de Société de pathologie exotique*; 95(5): 331-336.

-
- Lumbala C., Biéler S., Kayembe S., Makabuza J., Ongarello S., & Ndung'u, J.M. (2018). Prospective evaluation of a rapid diagnostic test for *Trypanosoma brucei gambiense* infection developed using recombinant antigens. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(3): 1-20.
- Lumbala C., Bisser S., Nguertoum C., Flevaud L. & Jacquet D. (2013). Development and evaluation of a rapid screening test for sleeping sickness. *Annales Africaines de Médecine*, 6(49): 1-9.
- Lumbala C., Kayembe S., Makabuza J., Lutumba P., Geertruyden J.P. V., Bessell P.R. & Ndung'u J.M. (2020). Development and implementation of a strategy for intensified screening for gambiense human African trypanosomiasis in Kongo Central province, DRC. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(10):1-18.
- Lumsden W.H.R., Kimber C.D., Evans D.A., Doig S.J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(3): 312–317.
- Lumsden W.H.R., Kimber C.D. & Strange M. (1977). *Trypanosoma brucei* : Detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5): 421-424.
- Lutumba P., Robays J., Miaka C., Kande V., Mumba D., Büscher P., Dujardin B. & Boelaert M. (2006). Validité, coût et faisabilité de la mAECT et CTC comme tests de confirmation dans la détection de la Trypanosomiase Humaine Africaine. *Tropical Medicine and International Health*, 11(4): 470-478.
- Luz R.I., Phanzu D.M., Kiabanzawoko O.N., Miaka E., Verlé P., Weggheleire A.D., Büscher P., Hasker E. & Boelaert M. (2021). Feasibility of a dried blood spot strategy for serological screening and surveillance to monitor elimination of human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(6): 1-16.
- MacGregor P. & Matthews K.R. (2010). New discoveries in the transmission biology of sleeping sickness parasites: Applying the basics. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 88(9): 865-871.

- MacLeod A., Tait A. & Turner C.M. (2001). The population genetics of *Trypanosoma brucei* and the origin of human infectivity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1411): 1035-1044.
- Magnus E., Vervoort T. & Van Meirvenne N. (1978). A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, 6(58): 169-176.
- Mahamat M.H., Peka M., Rayaisse J.B., Rock K.S., Toko M.A., Darnas J., Brahim G.M., Alkatib A.B., Yoni W., Tirados I., Courtin F., Brand S. P.C., Nersy C., Alfaroukh I.O., Torr S.J., Lehane M.J. & Solano P. (2017). Adding tsetse control to medical activities contributes to decreasing transmission of sleeping sickness in the Mandoul focus (Chad). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7): 1-16.
- Malvy D. & Chappuis F. (2011). Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7): 986-995.
- Matemba L.E., Fèvre E.M., Kibona S.N., Picozzi K., Cleaveland S., Shaw A.P. & Welburn S.C. (2010). Quantifying the burden of rhodesiense sleeping sickness in Urambo District, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11): 1-10.
- Matovu E., Katiti D., Kitibwa A., Kazibwe A.J., Kato C.D., Biéler S. & Ndung'u J.M. (2020). Optimisation of template preparation and laboratory evaluation of the Loopamp™ *Trypanosoma brucei* kit for detection of parasite DNA in blood. *Experimental Parasitology*, 14(211): 107-344.
- Matovu E., Mugasa C.M., Ekangu R.A., Deborggraeve S., Lubega G.W., Laurent T., Schoone G.J., Schallig H.D. & Büscher P. (2010). Phase II Evaluation of sensitivity and specificity of PCR and NASBA Followed by oligochromatography for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples from D.R. Congo and Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7): 1-6.
- Mesu V.K.B.K., Kalonji W.M., Bardonneau C., Mordt O.V., Tete D.N. & Blesson S. (2021). Oral fexinidazole for stage 1 or early stage 2 African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a prospective, multicentre, open-label, cohort study. *The Lancet Global Health*, 1(9): 999-1008.

- Miezan T.W., Meda H.A., Doua F., Dje N.N., Lejon V. & Büscher P. (2000). Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed Pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3): 102-114.
- Mitashi P., Hasker E., Mbo F., Van Geertruyden J.P., Kaswa M., Lumbala C., Boelaert M. & Lutumba P. (2015). Integration of diagnosis and treatment of sleeping sickness in primary healthcare facilities in the Democratic Republic of the Congo. *Tropical Medicine & International Health*, 20(1): 98-105.
- Mitashi P., Hasker E., Ngoyi D.M., Pyana P.P., Lejon V., Veken W.V., Lutumba P., Büscher P., Boelaert M. & Deborggraeve S. (2013). Diagnostic accuracy of Loopamp *Trypanosoma brucei* detection kit for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10): 1-5.
- Mori Y., Hirano T. & Notomi T. (2006). Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology*, 6(3): 1-10.
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N. & Notomi T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1): 150-154.
- Morrison L.J., McCormack G., Sweeney L., Likeufack A.C.L., Truc P., Turner C.M., Tait A. & Macleod A. (2007). Use of multiple displacement amplification to increase the detection and genotyping of trypanosoma species samples immobilized on fta filters. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(6): 1132-1137.
- Mpanya A., Hendrickx D., Vuna M., Kanyinda A., Lumbala C., Tshilombo V., Mitashi P., Luboya O., Kande V., Boelaert M., Lefèvre P. & Lutumba P. (2012). Should i get screened for sleeping sickness? A qualitative study in Kasai province, Democratic Republic of Congo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1): 1467-1468.
- Mugasa C.M., Adams E.R., Boer K.R., Dyserinck H.C., Büscher P., Schallig H.D. & Leeflang M.M.G. (2012). Diagnostic accuracy of molecular amplification tests for human African trypanosomiasis—Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1): 1438.
- Mugnier M.R., Cross G.A.M. & Papavasiliou F.N. (2015). The in vivo dynamics of antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229): 1470-1473.

- Mulenga P., Lutumba P., Coppieters Y., Mpanya A., Mwamba-Miaka E., Luboya O. & Chenge F. (2019). Passive screening and diagnosis of sleeping sickness with new tools in primary health services : an operational research. *Infectious Diseases and Therapy*, 8(3): 353-367.
- Mulligan H.W. (1970). The African Trypanosomiasis. Editions Allen & Unwin LTD, London, England, 43 p.
- Mumba D., Bohorquez E., Messina J., Kande V., Taylor S.M., Tshefu A.K., Muwonga J., Kashamuka M.M., Emch M., Tidwell R., Büscher P. & Meshnick S.R. (2011). Prevalence of human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8): 1-5.
- Mumba N.D., Ali E.R., Mumvumba K.M.F., Pyana P.P., Balharbi F., Decq M., Kande Betu V., Van der Veken W., Sese C., Menten J., Büscher P. & Lejon V. (2014). Performance of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and surveillance of gambiense sleeping sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6): 1-10.
- N'Djetchi M.K., Ilboudo H., Koffi M., Kaboré J., Kaboré J.W., Kaba D., Courtin F., Coulibaly B., Fauret P. & Kouakou L. (2017). The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Cote d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(10): 1-16.
- Nekpeni E.B., Dagnogo M. & Eouzan J.P. (1989). Détermination de la limite géographique entre deux sous-espèces de glossines en Côte-d'Ivoire : *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy, 1830) et *G. p. gambiensis* (Vanderplank, 1949). *Tropical medicine and parasitology*, 40(1): 12-15.
- Nieuwenhove S.V., Betu-Ku-Mesu V.K., Diabakana P.M., Declercq J. & Bilenge C.M.M. (2001). Sleeping sickness resurgence in the DRC : The past decade. *Tropical Medicine & International Health*, 6(5): 335-341.
- Nikolskaia O.V., Thekiso O.M.M., Dumler J.S. & Grab D.J. (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification for detection of the 5.8s ribosomal ribonucleic acid internal transcribed spacer 2 gene found in *Trypanosoma brucei gambiense*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(2): 275-279.

-
- Nimitphak T., Kiatpathomchai W. & Flegel T. (2008). Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*, 154(1-2): 56-60.
- Njiokou F., Laveissière C., Simo G., Nkinin S., Grébaud P., Cuny G. & Herder S. (2006). Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infection, genetics and evolution*, 6(2): 147-153.
- Njiokou F., Nimpaye H., Simo G., Njitchouang G.R., Asonganyi T., Cuny G. & Herder S. (2010). Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon. *Parasite*, 17(1): 61-66.
- Njiru Z.K., Mbae C.K. & Mburugu G.N. (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification test for *Trypanosoma gambiense* Group 1 with stem primers : a molecular xenomonitoring test for sleeping sickness. *Journal of Tropical Medicine*, 7(2017): 1-7.
- Njiru Z.K., Mikosza A.S.J., Matovu E., Enyaru J.C.K., Ouma J.O., Kibona S.N., Thompson R.C.A. & Ndung'u J.M. (2008). African trypanosomiasis : Sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *International Journal for Parasitology*, 38(5): 589-599.
- Njiru Z.K., Traub R., Ouma J.O., Enyaru J.C. & Matovu E. (2011). Detection of Group 1 genus-species *Trypanosoma brucei gambiense* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4): 15-30.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. & Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12): 63-63.
- Palmer J.J., Surur E.I., Goch G.W., Mayen M.A., Lindner A.K., Pittet A., Kasparian S., Checchi F. & Whitty C.J. (2013). Syndromic algorithms for detection of gambiense human African trypanosomiasis in South Sudan. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1): 23-29.
- Pays E. & Berberof M. (1995). Antigènes variables et non variables des trypanosomes africains. *M/S. Médecine sciences revue papier*, 2(11): 1-13.

-
- Pays E., Vanhollebeke B., Uzureau P., Lecordier L. & Pérez-Morga D. (2014). The molecular arms race between African trypanosomes and humans. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(8): 575-584.
- Pays E., Vanhollebeke B., Vanhamme L., Paturiaux-Hanocq F., Nolan D.P. & Pérez-Morga D. (2006). The trypanolytic factor of human serum. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(6): 477-486.
- Penchenier L., Simo G., Grébaud P., Nkinin S., Laveissière C. & Herder S. (2000). Diagnosis of human trypanosomiasis, due to *Trypanosoma brucei gambiense* in central Africa, by the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4): 392-394.
- Poitras E. & Houde A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*. 2: 2-11.
- Priotto G., Kasparian S., Mutombo W., Ngouama D., Ghorashian S., Arnold U., Ghabri S., Baudin E., Buard V., Kazadi-Kyanza S., Ilunga M., Mutangala W., Pohlig G., Schmid C., Karunakara U., Torreelle E. & Kande V. (2009). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: A multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet*, 374(9683): 56-64.
- R-Core-Team. R A Language and Environment for Statistical Computing, Ed. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2018. Available: <http://www.R-project.org>. Consulté le 14/01/2019.
- Radwanska M., Chamekh M., Vanhamme L., Claes F., Magez S., Magnus E., De Baetselier P., Büscher P. & Pays E. (2002a). The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67(6): 684-690.
- Radwanska M., Claes F., Magez S., Magnus E., Perez-Morga D., Pays E. & Büscher P. (2002b). Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67(3): 289-295.

- RGPH-CI. (2014). Recensement général de la population et de l’habitat en Côte d’Ivoire. (N° 2), 12 p. <https://www.ins.ci/documents/rgph/ivoirien18plus.pdf>. Consulté le 26/09/2020.
- Robays J., Bilengue M.M.C., Stuyft P.V.D & Boelaert M. (2004). The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Tropical Medicine & International Health*, 9(5): 542-550.
- Rock K.S., Torr S.J., Lumbala C. & Keeling M.J. (2017). Predicting the Impact of Intervention Strategies for Sleeping Sickness in Two High-Endemicity Health Zones of the Democratic Republic of Congo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1): 1-17.
- Rouamba J., Salissou A., Sakandé H., Jamonneau V. & Courtin F. (2019). Identification des Villages à Risque (IVR) : Pour un état des lieux de la Trypanosomiase Humaine Africaine au Niger. *Confins. Revue franco-brésilienne de géographie / Revista franco-brasilera de geografia*, 42(42): 1-18.
- Roubaud E & Bouet G. (1913). Les mouches tsé-tsés: en Afrique occidentale française. *Annales de géographie. JSTOR*; 126 : 427–450.
- Sharma R., Gluenz E., Peacock L., Gibson W., Gull K. & Carrington M. (2009). The heart of darkness : Growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Trends in Parasitology*, 25(11): 517-524.
- Sima N., McLaughlin E.J., Hutchinson S. & Glover L. (2019). Escaping the immune system by DNA repair and recombination in African trypanosomes. *Open Biology*, 9(11): 182-190.
- Simarro P.P., Cecchi G., Franco J.R., Paone M., Diarra A., Priotto G., Mattioli R.C. & Jannin J.G. (2015). Monitoring the progress towards the Elimination of gambiense human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6): 1-14.
- Simarro P.P., Cecchi G., Paone M., Franco J.R., Diarra A., Ruiz J.A., Fèvre E.M., Courtin F., Mattioli R.C. & Jannin J.G. (2010). The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *International Journal of Health Geographics*, 9(1): 1-18.
- Simarro P.P., Franco J.R., Cecchi G., Paone M., Diarra A., Ruiz Postigo J.A. & Jannin J.G. (2012). Human African trypanosomiasis in non-endemic countries (2000–2010). *Journal of Travel Medicine*, 19(1): 44-53.

- Simarro P.P., Franco J.R., Ndongo P., Nguema E., Louis F.J. & Jannin J. (2006). The elimination of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Tropical Medicine & International Health*, 11(5): 636-646.
- Simarro P.P., Jannin J. & Cattand P. (2008). Eliminating human African trypanosomiasis : where do we stand and what comes next? *PLOS Medicine*, 5(2): 1-7.
- Simarro P., Ruiz J., Franco J. & Josenando T. (2000). Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological confirmation in the African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*) focus of Quiçama (Angola). *Tropical medicine & international health*, 4: 858-861.
- Singh B. (1997). Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*, 27(10): 1135-1145.
- Solano P., Kone A., Garcia A., Sane B., Michel V., Michel J.F., Coulibaly B., Jamonneau V., Kaba D., Dupont S. & Fournet F. (2003). Role of patient travel in transmission of human African trypanosomiasis in a highly endemic area of the Ivory Coast. *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial*, 63(6): 577-582.
- Sternberg J.M., Gierliński M., Biéler S., Ferguson M.A. & Ndung'u J.M. (2014). Evaluation of the diagnostic accuracy of prototype rapid tests for human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12): 1-8.
- Stuart K. & Panigrahi A.K. (2002). RNA editing : Complexity and complications. *Molecular Microbiology*, 45(3): 591-596.
- Sullivan L., Wall S.J., Carrington M. & Ferguson M.A.J. (2013). Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2): 1-14.
- Tarral A., Blesson S., Mordt O.V., Torreele E., Sassella D., Bray M.A., Hovsepian L., Evene E., Gualano V. & Felices M. (2014). Determination of an optimal dosing regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis : First-in-human studies. *Clinical pharmacokinetics*, 53(6): 565-580.

-
- Taylor J.E. & Rudenko G. (2006). Switching trypanosome coats : What's in the wardrobe? *Trends in Genetics: TIG*, 22(11): 614-620.
- Tellinghuisen J. & Spiess A.N. (2014). Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency. *Analytical Biochemistry*, 7(449): 76-82.
- Tibayrenc M. & Ayala F.J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms : The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 7(9): 228-232.
- Tibayrenc M., Kjellberg F. & Ayala F. (1990). Une théorie clonale des protozoaires parasites : Structures de la population d'Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas et Trypanosoma et leurs conséquences médicales et taxonomiques. *Proceeding National Academy Sciences, USA*, 87: 2414-2418.
- Tichopad A., Dilger M., Schwarz G. & Pfaffl M.W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, 31(20): 122-142.
- Tirados I., Esterhuizen J., Kovacic V., Mangwiro T.N.C., Vale G.A., Hastings I., Solano P., Lehane M.J. & Torr S.J. (2015). Tsetse Control and Gambian sleeping sickness; implications for control strategy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8): 1-22.
- Toma B., Dufour B., Bénét J., Sanaa M., Shaw A. & Moutou F. (2010). Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 3^{ème} édition. *Maisons-Alfort : AEEMA, volume 2*, Paris, France, 600p.
- Triolo N., Trova P., Fusco C. & Le B.J. (1985). Report on 17 years of studies of human African trypanosomiasis caused by *T. gambiense* in children 0-6 years of age. *Medecine tropicale*, 45(3): 251-257.
- Truc P., Jamonneau V., Cuny G. & Frézil J.L. (1999). Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9): 745-748.
- Truc P., Lejon V., Magnus E., Jamonneau V., Nangouma A., Verloo D., Penchenier L. & Büscher P. (2002). Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei gambiense*, and LATEX/*T. b. gambiense* methods for serodiagnosis and surveillance of

- human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(6): 882-886.
- Uzureau P., Uzureau S., Lecordier L., Fontaine F., Tebabi P., Homblé F., Grélard A., Pays A., Felu C., Poelvoorde P., Vanhollebeke B., Moestrup S.K., Lyngso J., Pedersen J.S., Mottram J.C. & Pays E. (2013). Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* resistance to human serum. *Nature*, 501(7467): 430-434.
- Valentin G.G. (1841). Ueber einen entozoon im blute von Salmo fario. *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin*, Berlin, Allemagne, 435-436.
- Vanhollebeke B., De Muylder G., Nielsen M.J., Pays A., Tebabi P., Dieu M., Raes M., Moestrup S.K. & Pay E. (2008). A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science*, 320(4): 677-681.
- Vanhollebeke B. & Pays E. (2010). The trypanolytic factor of human serum : Many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Molecular Microbiology*, 76(4): 806-814.
- Van Meirvenne N., Magnus E. & Buscher P. (1995). Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Tropica*, 60(3): 189-199.
- Van Meirvenne N., Maginus E. & Janssens P.G. (1976). The effect of normal human serum on trypanosomes of distinct antigenic type (ETat 1 to 12) isolated from a strain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Annales de la société Belge de médecine tropicale*, 56(1): 55-63.
- Van Nieuwenhove L.C., Rogé S., Balharbi F., Dieltjens T., Laurent T., Guisez Y., Büscher P. & Lejon V. (2011). Identification of peptide mimotopes of *Trypanosoma brucei gambiense* variant surface glycoproteins. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6): 1-8.
- Verdi J., Zipkin R., Hillman E., Gertsch R.A., Pangburn S.J., Thomson R., Papavasiliou N., Sternberg J. & Raper J. (2020). Inducible Germline IgMs bridge Trypanosome Lytic Factor Assembly and parasite recognition. *Cell Host & Microbe*, 28(1): 79-88.
- Voller A., Bidwell D. & Bartlett A. (1975). A serological study on human *Trypanosoma rhodesiense* infections using a micro-scale enzyme linked immunosorbent assay. *Tropenmedizin Und Parasitologie*, 26(2): 247-251.

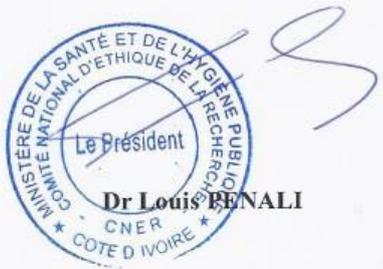
- Wamboga C., Matovu E., Bessell P. R., Picado A., Biéler S. & Ndung'u J.M. (2017). Enhanced passive screening and diagnosis for gambiense human African trypanosomiasis in north-western Uganda – Moving towards elimination. *PLOS ONE*, 12(10): 1-19.
- Weirather J.L., Wilson M.E. & Donelson J.E. (2012). Mapping of VSG similarities in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181(2): 141-152.
- Wenyon C.M. (1926). Protozoology. A manual for medical men, Veterinarians and Zoologists. *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists*, 10(2): 1-9.
- Wheeler R.J. (2010). The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications. *Trends in Parasitology*, 26(9): 457-464.
- Whittle H.C., Greenwood B.M., Bidwell D.E., Bartlett A. & Voller A. (1977). IgM and antibody measurement in the diagnosis and management of Gambian trypanosomiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(6): 1129-1134.
- WHO. (2000). African trypanosomiasis. In WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. Geneva, World Health Organization, (http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_CSR_ISR_2000.1.pdf), Chapter 8. Consulté le 08/05/2021.
- WHO. (2006). Human African trypanosomiasis (sleeping sickness) : Epidemiological update. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 81(08): 71-80. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-8108>
- WHO. (2012). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases. A roadmap for implementation. *Executive Summary*. 14 (6): 1-22. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70809>.
- WHO. (2013). Control and surveillance of human African trypanosomiasis : *Report of a WHO Expert Committee*. World Health Organization, Geneva, Swiss, n°984, 237p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95732>
- WHO. (2018). neglected diseases: News criteria to eliminate sleeping sickness. http://www.who.int/neglected_diseases/news/criteria-eliminate-sleeping-sickness/en/. Consulté le 26/11/2018
- WHO. (2019). WHO launches global consultations for a new Roadmap on neglected tropical diseases. WHO; World Health Organization.

- http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO-launches-global-consultations-for-new-NTD-Roadmap/en/. Consulté le 08/05/2021.
- WHO. (2020). Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)). Consulté le 08/05/2021.
- WHO. (2021). WHO validates Cote d'Ivoire for eliminating sleeping sickness as a public health problem. <https://www.who.int/news/item/25-03-2021-who-validates-cote-d-ivoire-for-eliminating-sleeping-sickness-as-a-public-health-problem>. Consulté 20/6/2021
- Wickstead B., Ersfeld K. & Gull K. (2004). The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes. *Genome Research*, 14(6): 1014-1024.
- Widener J., Nielsen M.J., Shiflett A., Moestrup S.K. & Hajduk S. (2007). Hemoglobin is a co-factor of human trypanosome lytic factor. *PLOS Pathogens*, 3(9): 1-12.
- Woo P.T. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 27(4): 384-386.
- Xong H.V., Vanhamme L., Chamekh M., Chimfwembe C.E., Van Den A.J., Pays A., Van Meirvenne N., Hamers R., De Baetselier P. & Pays E. (1998). A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell*, 95(6): 839-846.
- Yashu S., Hanner R.H., Meng B. (2020) Genome-wide screening of novel RT-qPCR for interactive fluorophore and quencher pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes. *PLoS ONE*, 17 8: 1-20.
- Yel L., Rabbat C.J., Cunningham-Rundles C., Orange J.S., Torgerson T.R., Verbsky J.W., Wang Y., Fu M., Robins T. S., Edwards M. S. & Nymann-Andersen J. (2015). A novel targeted screening tool for hypogammaglobulinemia: measurement of serum Immunoglobulin (IgG, IgM and IgA) levels from dried blood spots (Ig-DBS Assay). *Journal of Clinical Immunology*, 35(6): 573-582.
- Zulantay I., Honores P., Solari A., Apt W., Ortiz S., Osuna A., Rojas A., López B. & Sánchez G. (2004). Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect

Trypanosoma cruzi in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 48(4): 253-257.

ANNEXES

Annexe IA: Approbation du protocole de détection passive des cas dans les foyers endémiques par le CNESVS (anciennement CNER)

	
MINISTRE DE LA SANTE ET DE L'HYGIENE PUBLIQUE	REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL
COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE (CNER)	
US DPT OF HHS REGISTRATION # : IORG00075	
Le Président	
N/Réf : 076//MSHP/CNER-kp	Abidjan, le 27 juin 2017
 Au Docteur KABA Dramane Investigateur Principal DIRECT-HAT / <u>BOUAKE</u>	
 OBJET: Autorisation de mise en œuvre du projet de recherche intitulé : «Protocole pour la détection passive des cas de Trypanosomiase Humaine Africaine».	
 Docteur,	
Le Comité National d’Ethique de la Recherche (CNER) a examiné votre demande d’autorisation de mise en œuvre du projet cité en objet.	
Sous cette perspective, il a été émis un avis favorable à l’utilisation de ce protocole.	
Par conséquent, je vous autorise à mettre en œuvre votre étude telle que soumise au Comité National d’Ethique.	
Toutefois, il faut noter que la validité de cette autorisation est d’un an (1) à compter de la date de signature . Par ailleurs, je vous saurai gré de bien vouloir transmettre au CNER une copie du rapport de cette étude dès la fin de sa mise en œuvre.	
Je vous prie d’agréer, Docteur , l’expression de mes salutations distinguées.	
 Dr Louis BENALI	

Annexe IB : Accord du comité consultatif de déontologie et d'éthique de l'IRD



Marseille, le 16 novembre 2016

A l'attention de madame Veerle
Lejon IRD - UMR 177 - Intertryp
Campus International de Baillarguet TA A-
17/G 34398 Montpellier Cedex 5

Objet : Votre demande d'un avis du CCDE sur l'éthique du projet de recherche
DiTECT-HAT-WP2

Chère Madame,

Vous avez sollicité l'avis du Comité consultatif de déontologie et d'éthique (CCDE) de l'IRD à propos de votre projet de recherche intitulé « Diagnostic Tools for Human African Trypanosomiasis Elimination and Clinical Trials: WP2 Passive case detection, protocol nr DiTECT-HAT-WP2, protocol version 1.0, 28/09/2016 ».

Votre demande a été examinée au cours de la session plénière du CCDE du 17 au 20 octobre 2016.

Ce protocole est une composante du programme de recherche *Diagnostic Tools for Human African Trypanosomiasis Elimination and Clinical Trials*, dont d'autres protocoles ont été déjà examinés par le CCDE.

L'objectif de cette étude est d'évaluer et de comparer la performance et le coût de quatre tests de dépistage rapides (TDR) de la trypanosomiase humaine africaine afin de proposer des algorithmes de détection adaptés aux structures de santé périphériques, dans le cadre d'une intégration de la lutte contre la trypanosomiase dans la pratique médicale de routine des structures de santé périphériques.

Cette évaluation repose sur une comparaison des résultats obtenus par les TDRs avec les méthodes de référence qui ne peuvent être réalisées que dans des structures régionales de référence.

Il s'agit d'une étude non-interventionnelle, conduite dans le cadre des activités de routine des centres de santé, en partenariat avec les Programmes Nationaux de lutte contre la Trypanosomiase, dans trois pays d'Afrique de l'Ouest et du Centre (Côte d'Ivoire, Guinée et République Démocratique du Congo).

Les partenaires de ce programme sont l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), l'Institut de Médecine Tropicale (IMT-Anvers, Belgique), l'université de Liverpool

(Royaume-Uni) l'Institut National de Recherche Biomédicale (INRB, Kinshasa, RD Congo), le Programme National de Lutte contre la Trypanosomiase (PNLTHA) en RD Congo, le PNLTHA en Guinée, l'Institut Pierre Richet (IPR, Bouaké, Côte d'Ivoire) et le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso).

L'IRD est coordonnateur du projet.

Le protocole présenté se réfère explicitement aux principes éthiques de la recherche médicale internationale. Les personnes qui seront dépistées à l'occasion de cette étude sont prises en charge gratuitement dans le cadre des Programmes nationaux de lutte contre la Trypanosomiase, la balance risque/bénéfice est favorable pour les participants.

Les divers aspects d'éthique formelle sont pris en compte de manière satisfaisante.

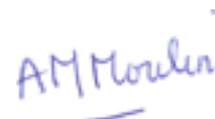
Le CCDE a exprimé diverses remarques :

- Le protocole prévoit de ne pas inclure les enfants de moins de 4 ans, il serait utile que les raisons de cette décision soient exposées, en lien avec les procédures de dépistage et de prise en charge des enfants dans les programmes nationaux.
- Cette recherche doit conduire à identifier les TDR les plus performants, il serait nécessaire d'évoquer les modalités d'accès des pays aux tests qui auront été reconnus les meilleurs.
- Le protocole précise que les personnes identifiées porteuses de la maladie seront traitées gratuitement dans le cadre des soins fournis par les programmes nationaux : est-ce que les frais éventuels de déplacement des participants sont couverts par le programme national ou le programme de recherche ?
- Le protocole mentionne que des formations au GCP (Good Clinical Practices) seront proposées aux membres des équipes (cf. page 22/28), notamment en ce qui concerne l'information des participants et le recueil des consentements éclairés. Le comité serait intéressé de connaître les grandes lignes du contenu de cette formation et son volume horaire.
- La lettre d'information pour les participants (page 3/3) évoque l'usage « d'informations personnelles », pourriez-vous préciser la nature de ces informations ?

En conclusion, le comité souhaiterait être tenu au courant de vos réponses à ses questions.

Le CCDE donne un avis favorable à votre projet de recherche.

Je vous prie d'agréer, chère Madame, l'expression de mes salutations distinguées.



Anne Marie Moulin
Présidente du CCDE

Annexe IC : Approbation du comité d'éthique de l'Université d'Anvers

Traduction document d'approbation Comité d'éthique Université d'Anvers :

Prof. Dr. P. Büscher
Institut de Médecine Tropicale
Parasitologie
Nationalestraat 155
2000 Antwerpen

Université d'Anvers, COMITE ETHIQUE
PRÉSIDENT
Prof. Dr. Patrick Cras

SECRETARIAT
Tel: 03 821 35 44

Outils Diagnostiques pour l'élimination de la trypanosomiase humaine africaine et pour les essais cliniques : WP2 Détection passive des cas (DiTECT-HAT-WP2) (Protocole no ITG 1133/16)

Numéro d'enregistrement en Belgique : B300201730927

Date
16/01/2017

Notre référence
16/49/526

Contacts
Annelies Van Looy
Anniek Leeraert
Marleen Bolens
Ethisch.comite@uza.be

APPROBATION DEFINITIVE

Cher collègue,

Le comité d'éthique de l'Hôpital Universitaire d'Anvers et de l'Université d'Anvers confirme que l'étude susmentionnée satisfait aux critères stipulés par la loi du 7 mai 2004 et donne son approbation en date du 16/01/2017.

Les documents suivants ont été approuvés par le Comité Ethique selon les critères ICH-GCP :

- Attestation d'assurance « no fault » signée le 16/02/2016, Liberty mutual, numéro de contrat AARQF3-004 date d'expiration le 01/01/2017
- CV chercheurs
Lejon Veerle, Kaba Dramane, Mumba Ngoyi Dieudonné, Ilboudo Hamidou, Büscher Philippe
- Formulaire d'information et consentement version FR adaptée du 09/01/2017
Version 1.1
- Protocole adapté du 09/01/2017
Version 1.2

Nous vous prions de nous signaler les dates suivantes :

- Date de début d'inclusion de patients
- Date et motif de clôture de l'étude :
 - Jamais démarrée
 - Clôture précoce
 - Fin de l'étude

Sincèrement

Prof. Dr. P. Cras Président Comité Ethique

Cc : FAGG – Research & Development Department, Victor Hortaplain 40, bus 40 - 1060 Brussel

Annexe ID : Approbation éthique de l'Institut de Medecine Tropicale



UZA / Wilrijkstraat 10 / 2650 Edegem
Parking via Drie Eikenstraat 655
Tel +32 3 821 30 00 / Fax +32 3 829 05 20
www.uza.be / BE0874.619.603



Prof. dr. P. Büscher
Instituut voor Tropische Geneeskunde
Parasitologie
Nationalestraat 155
2000 Antwerpen

VOORZITTER
Prof. dr. Patrick Cras

SECRETARIAAT
tel: 03 821 35 44

***Diagnostic tools for human African Trypanosomiasis elimination and clinical trials: WP2
passive case detection (DiTECT-HAT-WP2) (ProtocolNr: ITG 1133/16)***

Belgisch Registratienummer: B300201730927

datum	ons kenmerk	contactpersoon
16/01/2017	16/49/526	Annelies Van Looy Anniek Leeraert Marleen Bolens ethisch.comite@uza.be

DEFINITIEF GUNSTIG ADVIES

Geachte Collega,

Het Ethisch Comité van het Universitair Ziekenhuis Antwerpen en de Universiteit Antwerpen bevestigt dat bovenvermelde studie voldoet aan de criteria gesteld in de wet van 7 mei 2004 en geeft een gunstig advies dd. 16/01/2017.

De volgende bijlagen werden volgens de ICH-GCP richtlijnen door het Ethisch Comité goedgekeurd:

- Bewijs van "no-fault" verzekering dd. 16/02/2016
Liberty Mutual, polisnr. AARQF3-004, exp date 01/01/2017
- CV onderzoeker
Lejon Veerle, Kaba Dramane, Mumba Ngoyi Dieudonné, Ilboudo Hamidou, Büscher
Philippe
- Informatie- en toestemmingsformulier FR aangepaste versie dd. 9/01/2017
Versie 1.1
- Protocol aangepaste versie dd. 9/01/2017
Versie 1.2

Annexe II: Fiches d'information du participant pour la surveillance passive des cas

Outils Diagnostiques pour l'élimination de la Trypanosomiase Humaine Africaine et les essais cliniques : Dépistage passif des cas (DiTECT-HAT-WP2) Fiche d'information



Le Docteur/Infirmier a trouvé que vous avez des signes cliniques de la maladie du sommeil. La maladie du sommeil, aussi appelée trypanosomiase humaine africaine (THA), est une maladie causée par un parasite appelé trypanosome. Sans traitement la maladie conduit au décès du patient.

Pour confirmer ou exclure que vous souffrez de la maladie du sommeil, votre docteur/infirmier doit faire des tests diagnostiques. Il/elle vous propose de participer à l'étude DiTECT-HAT-WP2. Cette étude a pour but d'évaluer des nouveaux tests rapides et simples pour la détection de la maladie du sommeil. Avec les résultats nous espérons pouvoir proposer une détection plus simple de la maladie, qui pourra alors se faire dans tous les centres de santé. Votre décision d'accepter ou pas n'aura aucune influence sur les soins que vous allez recevoir.

Avant d'accepter de participer à l'étude DiTECT-HAT-WP2, il est nécessaire que vous compreniez bien pourquoi nous voulons faire cette étude et ce que nous allons faire exactement. Prenez donc le temps de bien comprendre les informations données ci-dessous et par le médecin/infirmier. N'ayez pas peur de poser toutes les questions. Si vous voulez, vous pouvez parler de cette étude aux autres membres de votre famille et aux amis.

But de l'étude

Le but de l'étude est de proposer une détection simple de la maladie du sommeil, afin de pouvoir tester facilement des personnes avec des signes cliniques qui se présentent dans un centre de santé.

Combien de personnes vont participer?

Cette étude aura lieu en Côte d'Ivoire, en Guinée et en République Démocratique du Congo (RDC). Environ vingt mille personnes avec des signes cliniques de la maladie de sommeil seront invitées à participer.

Est-ce que je peux participer?

Si vous avez des signes cliniques de la maladie du sommeil, vous pouvez participer à l'étude. Le médecin/infirmier vous prélèvera quelques gouttes de sang par une piqure au doigt, pour faire 4 nouveaux tests simples. Si tous les tests simples restent négatifs, vous ne souffrez pas de la maladie de sommeil et les examens se terminent. Si un des tests simples est positif, vous serez invité à donner du sang et un peu de lymphes pour rechercher le trypanosome avec le microscope afin de confirmer ou exclure l'infection. On déposera aussi un peu de sang sur un papier (papier filtre), pour faire d'autres tests compliqués qu'on ne peut pas faire sur place. Vous recevrez les résultats des tests compliqués dans environ 3 mois. Si les tests compliqués sont négatifs, les examens s'arrêtent. Si un des tests compliqués est positif, on répètera encore 2 fois la microscopie pour la recherche de trypanosomes dans le sang et la lymphes. Si on trouve des trypanosomes, le programme national de lutte contre la trypanosomiase humaine (PNLTHA) vous traitera pour la maladie du sommeil.

Durée de la participation à l'étude

La durée de participation est entre 30 minutes et 6 mois, dépendant des résultats des tests :

- Si tous les tests simples sont négatifs la durée de participation sera d'environ 30 minutes.
- Si un des tests simples est positif, il y aura une recherche initiale de trypanosomes et une visite à 3 mois.
- Si un des tests simples et un des tests compliqués sont positifs, il y aura une recherche initiale de trypanosomes et des visites à 3 et 6 mois avec la microscopie pour la recherche de trypanosomes à chaque visite.

Quelles sont les contraintes de l'étude?

Pour faire des tests simples, une seule piqure au doigt sera faite pour prélever quelques gouttes de sang. Pour la recherche du trypanosome, un prélèvement de 4 ml de sang se fera au pli du coude. Le volume de 4 ml correspond à environ une cuillère. Si un ganglion est présent dans le cou, il sera piqué pour prélever une goutte de lymphes. Si le centre de santé qui fait les tests simples n'est pas équipé pour la recherche de trypanosomes par microscopie, il sera nécessaire d'aller se présenter dans un centre spécialisé ou d'attendre un microscopiste spécialiste.

À quoi serviront les prélèvements et les tests?

Les 4 tests simples détectent des anticorps, des produits fabriqués par le corps pour se défendre contre le trypanosome. La microscopie est faite pour la recherche du trypanosome. Les tests compliqués détectent des

anticorps, et des produits du parasite appelés les ADN. Ces tests compliqués seront faits au Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) à Bobo-Dioulasso au Burkina Faso et à l'Institut de Médecine Tropicale en Belgique. Le sang sur papier filtre sera détruit lorsque le rapport de fin d'étude sera signé et validé. Seulement si vous donnez votre accord explicite (si la case OUI est coché dans le formulaire de consentement), le sang sur papier filtre sera gardé et mis à disposition à d'autres chercheurs, mais seulement pour des fins de recherche médicale, et toujours de façon anonyme.

Quels sont les avantages et les inconvénients de participer à l'étude?

Les tests simples permettent de détecter la maladie du sommeil dans tous les centres de santé. Pour un diagnostic fiable de la maladie du sommeil, il est toujours nécessaire de prendre du sang. Pour cette étude, nous vous demandons de donner un peu plus de sang que d'habitude. Donner un peu plus de sang ne nuira pas à votre santé. Mettre les restes de vos échantillons à disposition de la recherche, ne nuira pas à votre santé.

Quels seront les bénéfices de ma participation pour les malades de la THA?

Les tests simples permettent de détecter la maladie du sommeil dans tous les centres de santé. Ceci permettra à plus de personnes de se faire examiner pour la maladie du sommeil.

Est-ce-que je serai payé? Est-ce-que je vais devoir payer?

Participer à l'étude ne vous coûtera rien. Vous ne serez pas payé pour votre participation.

Est-ce-que je bénéficie d'une assurance pendant l'étude ?

Le promoteur a contracté une assurance qui servira à vous protéger en cas de problème lié à l'étude.

Est-ce-que j'ai le choix de participer? Comment va-t-on me soigner si je refuse de participer à l'étude?

Vous êtes libre de décider de participer ou non à cette étude DiTECT-HAT-WP2. Vous êtes libre de participer à l'étude DiTECT-HAT-WP2, mais de refuser que votre sang sur papier filtre soit utilisé pour d'autres recherches ultérieures à celle-ci. Votre choix n'aura aucune influence sur les soins que vous allez recevoir.

Ma participation peut-elle s'arrêter ?

Votre participation à cette étude peut être interrompue à tout moment par le promoteur ou les autorités de santé, par le médecin de l'étude pour des raisons médicales et par vous-même sans dire pourquoi. Mais il est mieux d'informer le médecin/infirmier de l'étude. Vous serez alors testé et traité selon la routine du programme national de lutte contre la THA. Si vous décidez de ne plus participer à l'étude, vous pourrez demander à ce que votre sang sur papier filtre soit détruit pour ne pas être analysé. Aucune nouvelle information vous concernant ne sera collectée et ajoutée aux données déjà recueillies et vous pourrez discuter avec le médecin de l'étude comment seront utilisées les données déjà collectées. Mais pour que votre participation soit utile, il est important que vous restiez dans l'étude et que vous veniez à toutes les visites de suivi prévues.

Comment seront utilisées mes informations personnelles et médicales?

Personne, autre que le personnel médical impliqué dans l'étude ne pourra vous identifier. L'utilisation des informations collectées et leur transmission par ordinateur se feront dans le respect de l'anonymat et dans le seul but de savoir si les nouveaux tests sont efficaces. Vos échantillons biologiques seront codés pour assurer la confidentialité. Les données seront utilisées pour la recherche médicale uniquement. Vous pourrez demander au médecin/infirmier à voir vos données et demander à les modifier. Les résultats de l'étude vont être publiés mais votre identité restera anonyme à tout moment.

Cette étude respecte-t-elle les lois?

Cette étude sera conduite en accord avec les lois en vigueur dans le monde et dans votre pays. Un comité indépendant a donné son approbation pour la conduite de l'étude.

Qui puis-je contacter si j'ai d'autres questions sur l'étude ?

Si vous avez des questions vous pouvez à tout moment contacter

- Docteur/infirmier Son numéro de téléphone est le
- **Dr Dramane KABA**, Institut Pierre Richet/ Institut National de Santé Publique (IPR/INSP), Bouaké.
Tél: +225 31 63 02 85 ; Cel : +225 59 94 07 17 ; Email: kaba_dramane@yahoo.fr
- **Dr Vincent JAMONNEAU**, Institut de Recherche pour le Développement / Institut Pierre Richet de Bouaké,
Cel : +225 79 32 18 72 Email: vincent.jamonneau@ird.fr
- **M. Minayégninrin KONE**: IPR/INSP, de Bouaké. Cel : +225 08 24 02 82 / 06 33 03 00 ;
Email: konemina85@gmail.com
- **Dr Louis PENALI**, Président du **Comité National d'Ethique de la Recherche (CNER)** de Côte d'Ivoire, Abidjan,
Tel : +225 22 00 58 29. Email : cner_ci@gmail.com

Annexe III : Formulaire de consentement écrit des participants à l'étude
**Outils Diagnostiques pour l'élimination et les essais cliniques
dans la Trypanosomiase Humaine Africaine : Dépistage passif
des cas et surveillance post-élimination (DITECT-HAT)**

Formulaire de consentement éclairé – Page de signature

Je confirme que j'ai lu (ou que je me suis fait lire) et que j'ai compris pourquoi et comment cette étude sera réalisée. J'ai pu poser toutes les questions et j'ai reçu des réponses satisfaisantes.

Je dis que ma participation n'est pas forcée et je comprends que je suis libre de quitter l'étude sans être obligé de dire pourquoi.

Je permets que des informations personnelles, des données et des prélèvements soient recueillis pendant l'étude, et qu'elles puissent être examinées par les personnes impliquées dans l'étude et/ou mandatées par le personnel de l'étude et/ou par les Autorités de Santé, mais de façon confidentielle et anonyme.

- J'accepte de participer à cette étude.
- J'accepte qu'après la fin de l'étude le reste du sang sur papier filtre soit gardé et mis à disposition d'autres chercheurs, pour faire des examens additionnels à des fins de recherche médicale sur des maladies tropicales. Des examens additionnels seront seulement faits après approbation des autorités de santé et si je donne mon accord. Cocher la case de votre choix :

<input type="checkbox"/>	OUI
<input type="checkbox"/>	NON

Nom complet et signature du participant (ou empreinte digitale):

Nom :

Signature :

Pour enfants <18 ans, l'enfant doit signer ou apposer son empreinte digitale à la page suivante pour donner son accord

Pour les participants mineurs, nom complet et signature du représentant légal (ou empreinte digitale):

Nom :

Signature :

Nom complet du témoin (si le participant et/ou son représentant légal ne savent pas lire ou si mineur émancipé):

Nom : Signature :

Nom complet et signature du membre de l'équipe d'étude qui a expliqué le consentement :

Nom : Signature :

Lieu: _____

Date: ____/____/____

DITECT-HAT-WP3, Version 1.2, datée le 19-Fev-2018

Consentement éclairé, fiche pour l'étude

CODE Participant :

Annexes IV : Formulaire d'assentiment pour enfants moins de 18 ans

Outils Diagnostiques pour l'élimination de la Trypanosomiase Humaine Africaine et les essais cliniques : Dépistage passif et surveillance post-élimination (DiTECT-HAT)

Formulaire d'accord pour enfant moins de 18 ans

Informations sur l'étude

Nous voulons faire une étude scientifique sur la maladie du sommeil. C'est pourquoi nous vous demandons de donner un peu de sang pour faire des tests pour la maladie, même si vous vous sentez en bonne santé. Ceci va nous permettre à développer une méthode peu coûteuse pour savoir rapidement si la maladie de sommeil réapparaît dans une région.

Procédures et risques

Si vous et vos parents êtes d'accord, nous allons vous piquer avec une aiguille pour prendre un peu de sang. Une piqûre peut vous faire un peu de mal mais ceci passera vite.

Autres informations

Vos parents sont au courant, mais nous ne dirons à personne d'autre que vous participer à l'étude. Nous ne mettons pas votre nom dans des rapports. Vous n'êtes pas obligé de participer dans l'étude, et vous pouvez arrêter quand vous voulez. Si vous refusez, vous serez soigné de même façon que les enfants qui participent. Nous vous donnons une copie de ce papier que vous devez garder. Sur ce papier vous trouvez les noms des personnes que vous pouvez contacter si vous avez des questions.

Nom complet et signature de l'enfant de moins de 18 ans (ou empreinte digitale):

Nom :

Signature :

L'étude m'a été expliquée et je suis d'accord à participer. J'ai eu l'occasion de poser toutes les questions et je peux toujours contacter le personnel médical quand j'ai d'autres questions.

Nom complet et signature du membre de l'équipe d'étude qui a expliqué l'étude :

Nom : Signature :

Lieu : Date : / /

Qui puis-je contacter si j'ai d'autres questions sur l'étude ?

Vous pouvez demander des questions à vos parents, ou nous contacter :

- Agent de santé Mon numéro de téléphone est le
- **Dr Dramane KABA**, Institut Pierre Richet/ Institut National de Santé Publique (IPR/INSP), Bouaké.
Tél: +225 31 63 02 85 ; Cel : +225 59 94 07 17 ; Email: kaba_dramane@yahoo.fr
- **Dr Vincent JAMONNEAU**, Institut de Recherche pour le Développement / Institut Pierre Richet de Bouaké,
Cel : +225 79 32 18 72, Email: vincent.jamonneau@ird.fr
- **M. Minayégninrin KONE** : IPR/UJLoG Cel : +225 08 24 02 82; Email: konemina85@gmail.com
- **Dr Louis PENALI**, Président du **Comité National d'Ethique des Sciences de la Vie et de la Santé (CNESVS)** de Côte d'Ivoire, Abidjan, Tel : +225 22 00 58 29. Email : cner_ci@gmail.com

 DiTECT-HAT-WP3, Version 1.2, datée le 19-Fev-2018

Formulaire d'assentiment, fiche pour le mineur <18 ans

CODE Participant :

Annexe V: Protocole du test d'immuno-Trypanolyse sur papier filtre

❖ Pour la réaction du test

- Perforer le papier Whatman 4 en 2 confettis contenant le sang sec avec un perforateur de 6 mm
- Prendre un à un les 2 confettis avec une pince et les déposer dans un puits correspondant à l'échantillon découpé
- Ajouter 40 µL de sérum de cobaye dans chaque puits de la plaque de microtitration contenant les confettis et agiter la plaque pendant une heure à la vitesse $\frac{3}{4}$ ou maximum
- Pendant l'incubation, préparer la solution de 5 tryps/chp avec du sérum de cobaye, obtenue par une culture de trypanosomes chez une souris à la parasitémie comprise entre 8.1 et 8.4 (méthode de Lumsden)
- Garder la solution de 5 tryps/chp préparée dans un bain glacial
- Ajouter 10µL de la solution préparée dans chaque puits contenant les confettis
- Agiter à vitesse maximum la plaque pendant 10s et incuber la plaque à température ambiante pendant 90 min tout en l'agitant durant 10s à vitesse maximum toutes les 15 min
- Prendre le liquide surnageant de chaque puits et l'étaler entre lame et lamelle pour une observation microscopique (10x25) de 10 champs minimum et noter le pourcentage de lyse sur le fichier trypanolyse

❖ Pour l'interprétation des résultats de réaction

- Lyse < 50% = test négatif
- Lyse \geq 50% = test positif

NB : Formes intermédiaires de certains trypanosomes dans la réaction :

- Vacuolisée (mais tryps vivants)
- Oponisée (tryps immobiles) ou agglutinée (forme de l'étoile)

Annexe VI: Préparation des solutions tampons pour le test ELISA/T. *b.*
gambiense sur papier filtre

a) PB 0.01 M pH 6.5

Quantité pour une plaque : **8 mL, ne pas conserver**

Substance	Poids Moléculaire	Par Litre	Par 250 mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137,99 g/mol	0,95 g	238 mg
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	177,99 g/mol	0,55 g	138

b) PBS-Blotto 0.01 M, pH 7.4

Quantité pour 1 plaque : **40 mL**

Substance	Poids Moléculaire	Par Litre	Par 250 mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137,99 g/mol	0.2 g	50 mg
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	177,99 g/mol	1,44 g	360 mg
NaCl	58,44 g/mol	11,7 g	2930 mg
NaN ₃	65,01 g/mol	0,5 g	125 mg
Lait écrémé		10 g	2500 mg

Mélanger 30 min, laisser sédimenter pendant une nuit à 4°C. Décantier. Conserver à 4°C dans une bouteille Duran.

c) PBS-sucrose 0.01M, pH 7.4

Quantité pour une plaque : **40 mL, ne pas conserver**

Substance	Poids Moléculaire	Par Litre	Par 250 mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137,99 g/mol	0.2 g	50 mg
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	177,99 g/mol	1,44 g	360 mg
NaCl	58,44 g/mol	8,2 g	2050 mg
Sucrose	342,30 g/mol	50 g	12500 mg

d) PBS-Tween 0.01 M, pH 7.4

Quantité pour une plaque : **500 mL, conserver jusqu'à une semaine**

Substance	Poids moléculaire	Par 5 Litre	Par Litre
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137,99 g/mol	1,0 g	200 mg
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	177,99 g/mol	7,2 g	1440 mg
NaCl	58,44 g/mol	41,0 g	8200 mg
Tween-20		2,5 g	0,5 mg

e) PBS-Blotto-Tween

Quantité pour une plaque : **20 mL, conserver jusqu'à une semaine**

PBS-Blotto + Tween 2

Substance	Poids moléculaire	Par Litre	Par 250 mL
PBS-Blotto		1 L	250 mL
Tween-20		500 µL	125 µL

f) Tampon substrat ABTS

Dissoudre 16.7 g poudre (Roche 12604400) dans 1 litre d'eau distillée. Conserver à 4°C pour maximum 3 mois

g) Solution chromogène

Dissoudre 1 comprimé ABTS (Roche 12740000, 50 mg/comprimé) dans 100 ml de tampon ABTS. Utiliser un cylindre gradué. Fermer avec du Parafilm et emballer avec une feuille d'aluminium pour protéger contre la lumière. Conserver à 4°C pour maximum une semaine

Quelques définitions :

- ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
- PB : Phosphate buffer (Tampon Phosphate)
- PBS: Phosphate buffered saline (Tampon Phosphate Saline)

CODE Participant: | 2 | - | 2 | - | | | | - | | | | | | | |

Initiales participant : | | | | |

1b. Signes cliniques à l'inclusion dans WP2

Cochez les signes cliniques observés dans le participant (plusieurs choix possible):

- Fièvre de longue durée, rebelle au traitement antipaludéen
- Maux de tête pendant une longue durée (> 14 jours)
- Présence de ganglions au niveau du cou
- Grand amaigrissement
- Faiblesse
- Prurit intense
- Aménorrhée, avortement(s), ou stérilité
- Problèmes psychiatriques (agressivité, apathie, confusion mentale, hilarité inhabituelle ...)
- Troubles du sommeil (insomnie nocturne et sommeil diurne excessif)
- Troubles moteur (mouvements anormaux, tremblement, difficulté à marcher)
- Convulsions
- Difficultés à s'exprimer
- Coma

4. Tests diagnostiques à l'inclusion dans WP2

Date TDR :-.....-.....
 Jour Mois Année

Nom laborantin :

HAT Sero-K-Set : Positif Négatif non fait

rHAT Sero strip : Positif Négatif non fait

SD Bioline HAT 1.0 : positif Négatif non fait

SD bioline HAT 2.0 : positif Négatif non fait

-**Si tous les tests rapides négatifs** : le participant ne souffre pas de la THA. Aucune autre action à faire. Garder l'original de la fiche avec vous.

-**Si un ou plusieurs des tests rapides positif(s)** :

-pour les centres de diagnostic et de traitement : faite la parasitologie et prélevez du sang sur papier wathman (page 1d)

-pour les sites de dépistage sérologique (pas de parasitologie disponible) : réferez le participant pour l'examen parasitologique et **donnez-lui une copie des pages 1a-1c à emmener au centre de diagnostic et traitement. Garder l'original avec vous.** Le participant gardera son code initial.

-pour Bonon :
 Blanoufla, Gobazra, Gonaté, Zaguiéta _____ réferez au CSU Bonon

-pour Sinfra :
 Bayota, Binoufla, Djénédoufla, Huafla _____ réferez à HG Sinfra

Annexe VIII : Liste et statut des centres de santé ayant participé aux activités du dépistage passif

CENTRE DE SANTÉ	STATUT
❖ District sanitaire de Bouaflé (Région de la Marahoué)	
1 CSU de Zaguiéta	SSS
2 CSR de Blanoufla	SSS
3 CSR de Gobazra	SSS
4 Hôpital Général de Bonon	CDT
❖ District sanitaire de Daloa (Région du Haut Sassandra)	
5 CSU de Gonaté	SSS
❖ District sanitaire de Sinfra (Région de la Marahoué)	
6 CSR de Huafla	SSS
7 CSR de Binoufla	SSS
8 CSR de Djénédoufla	SSS
9 Hopital Général de Sinfra	CDT
❖ District sanitaire de Gagnoa (Région du Gôh)	
10 CSU de Bayota	SSS

CDT: centre de diagnostic et traitement

SSS: site de screening sérologique

CSU : centre de santé urbain

CSR: centre de santé rural

Annexe IX : Malade de la trypanosomiase humaine africaine (THA) traité à l'Hôpital général de Bonon



Annexe X : Formation des agents de santé aux divers protocoles de l'étude



PUBLICATION 1

RESEARCH ARTICLE

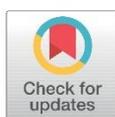
The complex health seeking pathway of a human African trypanosomiasis patient in Côte d'Ivoire underlines the need of setting up passive surveillance systems

Minayégninrin Koné^{1,2}, Emmanuel Kouassi N'Gouan³, Dramane Kaba¹, Mathurin Koffi², Lingué Kouakou⁴, Louis N'Dri¹, Cyrille Mambo Kouamé¹, Valentin Kouassi Nanan⁵, Gossé Apollinaire Tapé⁶, Bamoro Coulibaly¹, Fabrice Courtin^{1,7}, Bernardin Ahouty², Vincent Djohan¹, Bruno Bucheton⁷, Philippe Solano⁷, Philippe Büscher⁸, Veerle Lejon⁷, Vincent Jamonneau^{1,7*}

1 Unité de Recherche « Trypanosomoses », Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire, **2** Laboratoire de Biodiversité et Gestion des Ecosystèmes Tropicaux, Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire, Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Environnement, Daloa, Côte d'Ivoire, **3** Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase (PRCT), Daloa, Côte d'Ivoire, **4** Programme National d'Élimination de la Trypanosomose Humaine Africaine, Abidjan, Côte d'Ivoire, **5** Direction Départementale de la Marahoué, District sanitaire de Sinfra, Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique, Abidjan, Côte d'Ivoire, **6** Direction départementale de la santé de la Marahoué, Centre de Santé Urbain de Bonon, Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique, Abidjan Côte d'Ivoire, **7** Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, INTERTRYP, Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Université de Montpellier, Montpellier, France, **8** Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

* These authors contributed equally to this work.

* vincent.jamonneau@ird.fr



OPEN ACCESS

Citation: Koné M, N'Gouan EK, Kaba D, Koffi M, Kouakou L, N'Dri L, et al. (2020) The complex health seeking pathway of a human African trypanosomiasis patient in Côte d'Ivoire underlines the need of setting up passive surveillance systems. *PLoS Negl Trop Dis* 14(9): e0008588. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008588>

Editor: Enock Matovu, Makerere University, UGANDA

Received: March 23, 2020

Accepted: July 13, 2020

Published: September 14, 2020

Copyright: © 2020 Koné et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by the EDCTP2 programme supported by the European Union (grant number DRIA-2014-306-DITECT-HAT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

Significant efforts to control human African trypanosomiasis (HAT) over the two past decades have resulted in drastic decrease of its prevalence in Côte d'Ivoire. In this context, passive surveillance, integrated in the national health system and based on clinical suspicion, was reinforced. We describe here the health-seeking pathway of a girl who was the first HAT patient diagnosed through this strategy in August 2017.

Methods

After definitive diagnosis of this patient, epidemiological investigations were carried out into the clinical evolution and the health and therapeutic itinerary of the patient before diagnosis.

Results

At the time of diagnosis, the patient was positive in both serological and molecular tests and trypanosomes were detected in blood and cerebrospinal fluid. She suffered from important neurological disorders. The first disease symptoms had appeared three years earlier, and the patient had visited several public and private peripheral health care centres and

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

hospitals in different cities. The failure to diagnose HAT for such a long time caused significant health deterioration and was an important financial burden for the family.

Conclusion

This description illustrates the complexity of detecting the last HAT cases due to complex diagnosis and the progressive disinterest and unawareness by both health professionals and the population. It confirms the need of implementing passive surveillance in combination with continued sensitization and health staff training.

Author summary

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a parasitic disease caused by *Trypanosoma brucei* that is transmitted by tsetse flies. In 2012, HAT was included in the World Health Organization roadmap for the control of neglected tropical diseases with the objective of elimination as a public health problem by 2020. In Côte d'Ivoire, HAT prevalence has dropped sharply the last decade. A passive HAT surveillance was therefore integrated in the national health system, which allowed to detect a first patient in 2017. This article describes the complex health seeking pathway and suffering before diagnosis of this patient, an 11 years old girl, and illustrates the challenge when health agents and population no longer consider HAT as a threat in an elimination context. Our results show the need to install a solid surveillance system, in combination with continued sensitization and repeated health staff training.

Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasites *Trypanosoma brucei gambiense* (*Tbg*) and *Tb rhodesiense* (*Tbr*) which are transmitted by tsetse fly (*Glossina spp*) bites. The disease occurs in Sub-Saharan Africa, within the limits of its vector distribution [1]. Thanks to the intensive control efforts deployed since the early 2000s, the number of HAT cases has evolved from 26550 in the year 2000 to 977 in 2018. However, still 57 million people are at risk for infection. As defined in its roadmap, WHO has targeted HAT elimination as a public health problem by the year 2020, and interruption of transmission by 2030 [2].

Côte d'Ivoire is at present the second HAT affected country in West-Africa, with endemic foci in Central-Western forest areas [3,4]. Rural populations living from handwork in cash (cocoa, coffee) and subsistence (banana, rice) agriculture are the most affected. For a long time, the HAT control strategy in Côte d'Ivoire has been based on active case detection by mass screening using the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) [5], followed by parasitological examination of seropositive individuals [6]. This strategy, implemented by mobile teams who travel from village to village, has allowed to drastically reduce the number of detected HAT cases, with less than 10 yearly cases since 2009 [2,4,7].

However, in a low prevalence context, this strategy is not cost effective. The population does not consider HAT as a threat anymore and refuses to participate to mass screening activities [8,9]. The fact that in 2010 and 2011 not a single case of HAT was found during active screening, while 12 HAT patients were diagnosed in only one national treatment centre [7], demonstrates well the need of implementing a passive HAT surveillance based on clinical

suspicion integrated in the national health system [10,11,12]. This need is also confirmed by the itinerary of a HAT patient that we describe here, illustrating the progressive disinterest and unawareness by both health professionals and the population as HAT is being eliminated.

Materials and methods

Study area

The national health system in Côte d'Ivoire is organized as a classical three level pyramid, with health centres that serve as an entry point at the basis, general hospitals at the secondary level and university hospitals and specialized institutes at the tertiary level. These public health structures are complemented by private clinics and hospitals as well as a network of traditional medicine officially recognized by the Ministry of Health [13]. Until 2017, passive HAT surveillance in Côte d'Ivoire relied on two HAT treatment centres: the Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase in Daloa (PRCT) and the Base de Santé Rurale in Bouaflé (closed in 2006) (Fig 1). In August 2017, passive surveillance was extended to the two last endemic foci of the country, Bonon and Sinfra, within the framework of a diagnostic clinical trial (DiTECT-HAT) evaluating the performance of diagnostic tools and algorithm. Ten health

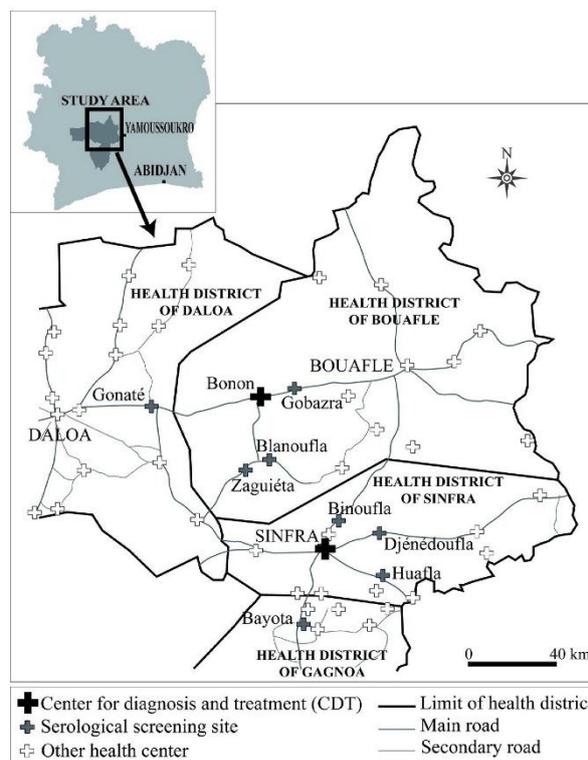


Fig 1. Map showing the localisation of the passive surveillance sites implemented in the Bonon and Sinfra HAT endemic foci in Côte d'Ivoire in 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008588.g001>

structures were selected at the primary level (Fig 1). Two structures, the Sinfra Hôpital Général (HG) and the Bonon Centre de Santé Urbain (CSU), were mandated to perform clinical and serological screening as well as parasitological confirmation and treatment (centres for diagnosis and treatment). The eight other were health centres performed clinical and serological screening only, and referred seropositive suspects to one of the two centres for confirmation diagnosis.

Diagnostic methods for passive surveillance in Bonon and Sinfra

The diagnostic procedure was initiated by clinical suspicion for HAT. The following symptoms were considered: long-lasting fever resistant to anti-malaria treatment, long-lasting headaches (>14 days), swollen cervical lymph nodes, weight loss, weakness, intense pruritus, amenorrhea, abortion, sterility, coma, psychiatric problems (aggressiveness, apathy, mental confusion, hilarity), sleep disruption (nocturnal insomnia and excessive daytime sleepiness), motor problems (convulsions, abnormal movements, tremor, walking difficulties) and speech difficulties. An individual was a clinical suspect if at least one of these symptoms was present, which initiated serologically testing for presence of specific antibodies. Within the DiTECT-HAT diagnostic trial, three rapid diagnostic tests (RDT) were carried out simultaneously: SD Bioline HAT 1.0 (Standard Diagnostics, Korea, [14]), HAT Sero-K-Set (Coris Bioconcept, Belgium, [15]) and rHAT Sero-Strip (Coris Bioconcept, Belgium, [16]). Clinical suspects positive in at least one RDT, underwent parasitological examination by the mini-anion exchange centrifugation technique (mAECT) performed on whole blood [17, 18] and for those who had swollen cervical lymph nodes, a microscopic examination (x400 magnification) of lymph node fluid. Dried blood spots were also prepared for further testing in immunotrypanolysis [19], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA/*Tbg* [20,21]), loop-mediated isothermal amplification (LAMP [22]), and real-time PCR targeting the 18S rRNA and the *Trypanosoma brucei gambiense*-specific glycoprotein (TgsGP) genes specific respectively for *Trypanozoon* [23] and *Tbg* [24]. Patients in whom trypanosomes were detected were treated according to the national procedures and WHO recommendations [25].

Epidemiological investigations

For each detected HAT case, a spatial and geo-referenced investigation of the travel history and living places was carried out to identify populations that share the same environment and are at increased risk for HAT [4, 26]. An epidemiological investigation was carried out to describe in detail the clinical evolution and the health and therapeutic itinerary of the patient (discussions with the family, discussions with health agents that examined the patient, consultation of all possible documentation such as the health book, the results of different analyses, hospitalisation certificates, prescriptions etc.)

Ethics

Before commencement, the DiTECT-HAT diagnostic trial (Diagnostic Tools for Human African Trypanosomiasis Elimination and Clinical Trials, work package 2, passive case detection) received ethical clearance (i) from the Comité Consultatif de Déontologie et d'Éthique of the French National Institute for research on sustainable development (IRD), (ii) from the Institutional Review Board of the Institute of Tropical Medicine Antwerp Belgium (reference 1133/16), (iii) from the Ethics Committee of the University of Antwerp (Belgian registration number B300201730927) and (iv) from the Comité National d'Éthique de la Recherche, Ministry of Public Health and Hygiene in Côte d'Ivoire (reference 076//MSHP/CNER-kp). The DiTECT-HAT trial has been registered at ClinicalTrials.gov, identifier NCT03356665. Before

being included in DiTECT-HAT, the study was explained to the patient and her mother and written ascent and informed consent was obtained. A written ascent and informed consent was also obtained to study and describe the pathway of the HAT case in the frame of the HAT elimination project in Côte d'Ivoire for which ethical clearance was received from the Comité National d'Ethique de la Recherche, Ministry of Public Health and Hygiene in Côte d'Ivoire (reference 030-18/MSHP/CNER-kp).

Results

The patient was the first one diagnosed by the passive surveillance activities implemented in the two endemic foci in Côte d'Ivoire. The patient was an 11 years old girl detected in September 2017 in the Bayota CSU, a serological screening site in the Sinfra focus.

Diagnosis at inclusion

The girl presented with long-lasting fever that did not respond to malaria treatment, serious weight loss, weakness, sleep disruption, motor problems (tremor and unable to walk), anorexia and speaking difficulties. All three RDT performed in Bayota were positive (S1 Fig), and the girl was referred to the Sinfra HG for parasitological examination. In the absence of swollen cervical lymph nodes, parasitological confirmation was carried out by examination of blood in the mAECT, with only one trypanosome observed (S2 Fig). The patient was diagnosed with stage 2 HAT, having 160 white blood cells/ μ l and trypanosomes in the cerebrospinal fluid and was successfully treated using Nifurtimox Eflornithine Combination Therapy in the Bonon CSU since the Sinfra HG was, at that time, not yet functional for HAT treatment. Her dried blood spots were positive in immune trypanolysis, ELISA and LAMP but negative in real time PCR.

Geographical itinerary

The girl was born in January 2006 in Buyo, situated in South-West Cote d'Ivoire in the department of Soubré, in the Nawa region (Fig 2). Three weeks after her birth, her mother took her to Abidjan, from which 8 months later, they moved to Sinfra where they stayed for 5 years. In March 2011, she moved with the girl to Yabayo, a city in Central-West Côte d'Ivoire to do business. In September 2012, they went to Gagnoa, where the girl went to school and was under the supervision of her grandmother. The mother installed herself to work in Bouaké, a city in the centre of the country. In December 2015, the girl dropped out of school due to the deterioration of her health (see below). In January 2016, the mother left her job in Bouaké to seek health care for the girl in Abidjan where they stayed with the mother's family. Running out of financial means, they went to Bouaké in April 2017, for the mother to resume her job, while looking for a cure for the girl. After numerous examinations and despite a strong HAT suspicion established in Bouaké (details provided below), the mother, decided in August 2017 to take her girl to Bayota (20 km south of Sinfra) where her husband resided. It was at the Bayota CSU and then at the Sinfra HG that she was re-screened in September 2017 after which the diagnosis could be confirmed.

Clinical evolution and health seeking itinerary

The first clinical signs of HAT date back to October 2014 (Fig 2) with fever and headaches that were treated with traditional self-medication. In November 2014, the same symptoms persisted accompanied by general asthenia. The patient then consulted the nearest primary health care centre, the maternal and child protection centre (PMI) in Gagnoa where malaria was

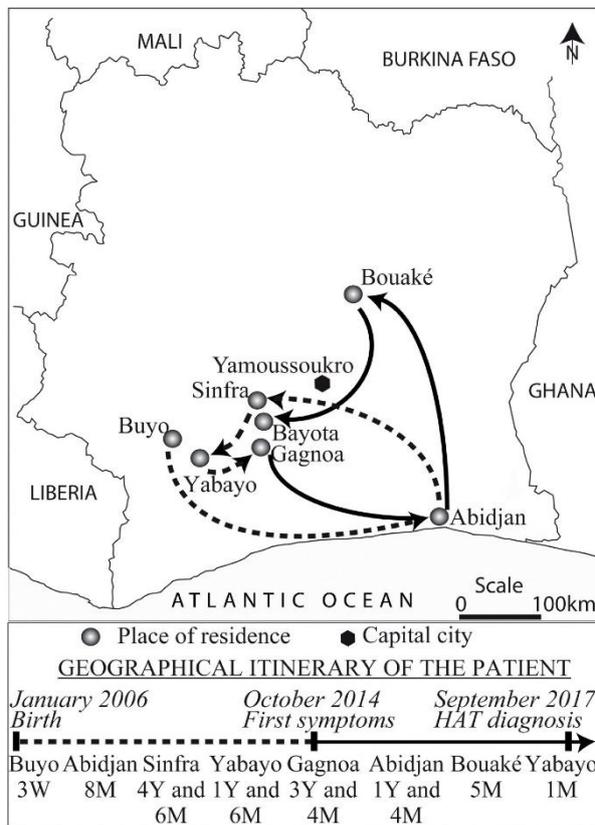


Fig 2. Geographical and health itinerary of the patient between birth and HAT diagnosis. W = week(s), M = month(s), Y = year(s).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008588.g002>

diagnosed and treated. Between December 2014 and July 2015, the PMI continued to diagnose and treat for malaria with monthly intervals, based on the same symptoms, which from June 2015 were accompanied by convulsions. This was the reason for visiting a traditional healer in August. Although from September to October 2015 all symptoms subsided, they reappeared in November 2015, together with hallucinations and behavioural problems (bulimia, hilarity, strong restlessness, abnormal movements). The patient was then hospitalized for 12 days in a private clinic in Gagnoa, but no improvement was observed. In December 2015, the patient's family called upon another traditional healer and a spiritual healer who attributed the troubles to a spirit called "DRAGON". Despite prayers and new treatments, symptoms worsened with appearance of limb paralysis.

In January 2016, the patient and her mother went to Abidjan and first consulted private structures. A strong anemia led to a sickle cell test, which turned out negative. Following the onset of severe fever and diarrhoea, typhoid fever was diagnosed and treated, and anti-anemic drugs were given. In April 2016, the existing symptoms persisted, with the addition of

abnormal movements, trembling of the limbs and sleep disturbances (daytime hypersomnolence and night time insomnia). The patient was then admitted to a private clinic. An analysis report and the patients' health record mention a HAT test, which consisted of a fresh blood examination, which was negative. Anti-anemics and antipyretics were again prescribed. In October 2016, the patient consulted a referral hospital of the tertiary level in Abidjan with, in addition to the aforementioned symptoms, eating difficulties. She was admitted to the neurology department and then to the trauma department. Leg massages were prescribed, as well as medicines for fever and poor appetite. Without improvement, in January 2017, the patient consulted another private clinic in Abidjan where she was diagnosed with malaria and treated.

Back in Bouaké in April 2017, the persistent symptoms associated with severe anemia made the patient to consult an urban health centre where she was once again prescribed antimalarials, antibiotics against typhoid fever and anti-anemics. In July 2017, with the worsening of motor disorders, a generalized paralysis (hypertonia of the limbs), anorexia, almost continuous hyper-somnolence and loss of consciousness, she was referred to the Bouaké CHU where she was admitted to the service of neurology. It is in this department that a precise clinical description was made, described elsewhere [27]. The first real clinical suspicion of HAT was made by a neurologist who knew the symptoms of the disease and who guided the patient to the Institut Pierre Richet, an institution of the National Institute of Public Health (INSP) specialized in research on vector-borne diseases including HAT. Although the RDT and the CATT were positive for presence of specific antibodies, the patient could not be confirmed by parasitological examination in the mAECT. Since a lumbar puncture was performed the day before at Bouaké CHU to perform a direct microscopic observation of cerebrospinal fluid (CSF) which turned out to be negative for trypanosomes, the lumbar puncture was not repeated at this occasion. The patient was invited to come back the next week to repeat the parasitological investigations. Unfortunately, the mother, who lost hope of recovery and trust in conventional medicine, decided to return to Bayota. It was thanks to the strong awareness-raising of the HAT team of IPR who stayed in contact by phone with the mother and to the fact that Bayota was included in the HAT passive surveillance system that she finally agreed to go to the CSU of Bayota in September 2017. The confirmation of the serological suspicion of HAT convinced the mother to go to the Sinfra HG where her daughter was finally parasitologically confirmed.

Financial aspects

We made an estimation of the total expenditures made by the patient's family between the time of her first symptoms (October 2014) and her treatment (September 2017). We took into account the costs of consultations, the cost of laboratory analyses and the cost of drugs that were prescribed and purchased. We also estimated the mother's loss of income due to the interruption of her professional activities (Table 1). We did not include the transport costs and the costs of living outside the main residence. The total amount spent was 3 718 500 CFA francs or 5 669 Euros. For comparison, the gross domestic product per capita of Côte d'Ivoire was 1 383 Euros in 2017 (<https://data.worldbank.org/indicator/NY.GDP.PCAP.CD?locations=CI>).

Discussion

We examined the clinical, diagnostic, geographical, and financial aspects of a HAT case detected in Côte d'Ivoire. Only one single patient is described, which is clearly a limitation. Although interesting for its peculiarities, it is not possible to extrapolate some of the conclusions to the generality. However, the patient overall pathway clearly demonstrates the difficulties that can be encountered to arrive at the correct diagnosis within a HAT elimination context.

Table 1. Details of the expenses for case management of the patient between October 2014 and September 2017.

ITEM	Amount in FCFA*	Amount in EURO
Consultation costs	293 500	447,44
Drug costs	965 000	1 471,13
Costs of medical laboratory analyses	540 000	823,23
24 months' salary loss of the mother**	1 920 000	2 927,02
TOTAL	3 718 500	5 668,84

* FCFA = currency in Côte d'Ivoire (1 euro = 655,957 FCFA)

** The mother had to stop working for 24 months to take care of her daughter

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008588.t001>

Clinically, symptoms and signs for sleeping sickness are not specific [25]. The first symptoms observed (fever, headache, asthenia, anemia and digestive disorders) were attributed several times to malaria or typhoid fever, confirmed or not by laboratory analyses. The treatments prescribed during three years were in line with these diagnoses and mainly composed of antipyretics, antibiotics, antimalarials and anti-anemics, even after the onset of neurological disorders, since no alternative diagnosis could be made. Suspicion of HAT was raised for the first time in a private clinic in Abidjan, on the basis of sleep disruption, but as the diagnosis could not be confirmed at that time, suspicion was not maintained. It was only at a very advanced disease stage that an experienced neurologist strongly suspected HAT [27] and referred the patient to a specialized structure. The evolution of the patient's clinical signs with three years between the appearance of the first symptoms and an almost comatose state in which she was diagnosed, perfectly illustrates the chronic nature of HAT due to *Tbg* with a slow evolution and a progressive appearance of neurological disorders [28,29].

Also laboratory diagnosis [6], which is needed to initiate treatment for HAT, proved not to be easy. The first parasitological examination, the wet blood film examination, was negative but this technique has a poor sensitivity [30, 31]. The final confirmation was also retarded by 2 months due to a negative mAECT result, despite the fact that mAECT is the most sensitive parasitological method [32,33,34]. During the screening of the patient in September 2017, the three RDT were positive, but only one trypanosome could be detected in blood by the mAECT. This can be explained by the low parasite numbers present in the blood, which is characteristic for *Tbg* HAT, and shows the interest of repeating the parasitological examination [30]. The tests carried out on dried blood spots by the reference lab were positive with exception of the 18S and TgsGP PCR, which can be explained by the limited quantity of DNA on the filter paper [33,35]. In contrast to the blood results, many trypanosomes were observed upon cerebrospinal fluid examination, a phenomenon that is not uncommon in advanced stage HAT [33].

The travel history of the patient contributed to delay diagnosis as well. She spent her early childhood in Sinfra, a well-known HAT focus [3,36,37,38,39], where she was probably infected. Although Yabayo and Gagnoa are historic HAT foci, infection there seems less probable due to her short stay in Yabayo and an exclusively urban life as schoolgirl in Gagnoa, with little probability of exposure to tsetse flies. Unfortunately, the patient did not attend any active HAT screening session before leaving Sinfra, and her chances of being diagnosed, despite the onset of symptoms, were limited in Gagnoa where since 1994 no case of HAT had been detected [37].

From a service provider delay perspective, the patient consulted during 3 years at least twenty health centres in the public and private sector. She used the three levels of the national public health system pyramid and met with more than a hundred doctors, nurses, laboratory

technicians and community health workers. This illustrates another difficulty, which comes from the fact that HAT is a neglected tropical disease, whose control, in the absence of vaccines or prophylactics, is based on case management often carried out by specialized teams on the edges of the national health system [40]. In Côte d'Ivoire, for example, control has long relied on two research institutions: Institut Pierre Richet in Bouaké and PRCT. Since 2006, PRCT has been the only centre for passive screening and treatment in the country [3,4,7]. This system offers only very limited access to specialized care, especially in rural areas where HAT mainly occurs [41]. It also limits the number of health workers capable of suspecting the disease, which in addition, is going down in a context of sharply decreasing prevalence. Today, HAT is very succinctly dealt with in the training of health personnel, whatever the level of training is. In addition, a large majority of health workers in Côte d'Ivoire considers HAT as a disease of the past century.

Unfortunately, this is also the case for at-risk communities who no longer consider the disease as a threat, and no longer participate in active screening sessions -hence their ineffectiveness [8] and who gradually lose the reflex of thinking about HAT. Neurological disorders are often attributed to a mystical cause and patients are referred to traditional and spiritual healers. Implication of traditional healers is probably common in diagnostic pathways of patients with rare diseases in an elimination context, but not as well documented for *Tbg* HAT [42], as for *rhodesiense* HAT [43], [44]. These steps contributed to patient delay in seeking the diagnosis. Actions should be taken to raise awareness of the traditional healers so that they can refer clinical suspects to health centres where HAT passive surveillance is implemented. Such an approach would compensate for the often-low presentation rate in health centres in remote areas that characterize the HAT foci [12].

The combination of all difficulties highlighted above, resulted in a patients and service provider delay which was much higher than the median time previously reported from Democratic Republic of Congo [45], which could possibly be attributed to the relatively high HAT prevalence at time of the study in DR Congo, compared to the elimination context in Côte d'Ivoire some years later. The delays led to late treatment of the patient who suffered a lot and still has neurological sequels when writing the manuscript. The present experience also illustrates the financial burden of HAT on families in particular when the suspicion index is low and diagnostic capacities are absent. The costs incurred, including the mothers salary loss for two years, were also much higher than the 44 US\$ previously described for DR Congo [45], and led the mother to seek for financial help from her family.

In a context of low HAT prevalence, the implementation of an effective passive surveillance integrated into the national health system [12] could help to overcome some of these difficulties. First, it reminds the health workers of the existence of HAT and gives them the means to screen for it using a simple protocol based on clinical and serological suspicion using RDT [46]. It makes care more accessible to all populations at risk, even the most remote, and targets clinical suspects even if they came to consult for other reasons. Finally, geographically localisation of confirmed patients, enables identification of the areas of transmission and improved orientation of the control efforts. Based on the clinical symptoms, the patient might have been diagnosed earlier, if a passive surveillance system had been in place. In Côte d'Ivoire, the national programme for elimination of HAT has decided to reinforce the passive surveillance system from 2018 on, by extending it to all hypo-endemic foci, which were defined as having one case detected between 2000 and 2015, and implemented it in 13 additional health centres. In addition to primary health care centres, passive surveillance has also been integrated in five tertiary level health centres including in the main psychiatric and neurological services (Abidjan, Bouaké and Bingerville). These centres receive patients from all over the country, as was the case for the patient who consulted two of them, and contribute to national surveillance.

This is important as the population at risk for HAT in West-Africa, is often characterized by significant mobility [7,36]. This population has in general very little chance to be tested for HAT when it leaves endemic areas.

Passive surveillance however has some limitations. It is based on clinical suspicion, and risks to detect patients mainly when they present with neurological symptoms and therefore are already in an advanced disease stage [7]. This is an important constraint, not only for the patient, but also for the community since the subject constitutes a reservoir of parasites and a source of contamination for a long time before being detected and treated. To detect additional cases as early as possible, passive surveillance should therefore be accompanied by adapted reactive active screening strategies, such as reactive door to door screening, [4], spatial tracking [26], follow-up of seropositive subjects [47,48,49,50] or identification of villages at risk [51]. It is also essential to inform the health personnel that, even if HAT prevalence has decreased, the disease still exists and carries a risk to re-emerge [52]. Health personnel needs to be trained continuously and must receive the means to diagnose the disease. Equally important, public awareness on HAT should be raised, at the local level in the areas at risk but also at national level, including information on the possibility to be screened in primary health centres. Difficulties in passive case detection of HAT in the context of a significant drop in prevalence have also been observed in DR Congo [53]. In this country, the most affected by HAT [2], a national HAT commemoration day has been created [54], a sensitization initiative that could be extended to all endemic countries.

In conclusion, the detailed analysis of the clinical, diagnostic, geographical, and financial aspects of this HAT case, whose diagnosis was facilitated by a clinical trial, underlines both the complexity and the importance of detecting the last HAT cases and of reaching HAT elimination in Côte d'Ivoire where tsetse flies are found throughout the territory [55]. Reinforcement of passive surveillance at national scale, integrated in the existing health system could help to overcome some difficulties in combination with continued sensitization and health staff training.

Supporting information

S1 Fig. Photo of the three positive rapid diagnostic tests performed at the time of HAT diagnosis in September 2017.

(TIF)

S2 Fig. Video of the single trypanosome detected by the mAECT parasitological test confirming the HAT status of the patient in September 2017.

(MP4)

Acknowledgments

We acknowledge all the technicians from the HAT teams of Institut Pierre Richet of Bouaké, University Jean Lorougnon Guédé of Daloa, Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase of Daloa, Centre de Santé Urbain of Bonon, Hôpital Général de Sinfra and HAT National Elimination Program of Côte d'Ivoire. We also acknowledge all the health agents involved in the HAT passive surveillance in Côte d'Ivoire.

Author Contributions

Conceptualization: Bruno Bucheton, Philippe Büscher, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Funding acquisition: Veerle Lejon.

Investigation: Minayégninrin Koné, Emmanuel Kouassi N'Gouan, Dramane Kaba, Louis N'Dri, Cyrille Mambo Kouamé, Valentin Kouassi Nanan, Gossé Apollinaire Tapé, Bamoro Coulibaly, Fabrice Courtin, Bernardin Ahouty, Vincent Djohan.

Methodology: Minayégninrin Koné, Emmanuel Kouassi N'Gouan, Mathurin Koffi, Lingué Kouakou, Louis N'Dri, Cyrille Mambo Kouamé, Valentin Kouassi Nanan, Gossé Apollinaire Tapé, Bernardin Ahouty, Vincent Djohan.

Project administration: Dramane Kaba, Philippe Solano, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Supervision: Dramane Kaba, Mathurin Koffi, Lingué Kouakou, Philippe Solano, Philippe Büscher, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Writing – original draft: Minayégninrin Koné, Dramane Kaba, Mathurin Koffi, Bamoro Coulibaly, Fabrice Courtin, Veerle Lejon.

Writing – review & editing: Bruno Bucheton, Philippe Büscher, Vincent Jamonneau.

References

1. Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 2017; 390: 2397–2409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31510-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6) PMID: 28673422
2. Franco JR, Cecchi G, Priotto G, Paone M, Diarra A, Grout L, et al. Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: Update to 2016. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12: e0006890. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006890> PMID: 30521525
3. Kaba D, Djè NN, Courtin F, Oke E, Koffi M, Garcia A, et al. L'impact de la guerre sur l'évolution de la THA dans le centre-ouest de la cote d'ivoire. *Trop Med Int Health*. 2006; 11: 136–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01549.x> PMID: 16451337
4. Koffi M, N'Djetchi M, Ilboudo H, Kaba D, Coulibaly B, N'Gouan E, et al. A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Côte d'Ivoire. *Parasite*. 2016; 23: 51. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016059> PMID: 27849517
5. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Bel Med Trop*. 1978; 58: 169–176.
6. Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V, Büscher P. Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18: 133–146. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.133-146.2005> PMID: 15653823
7. Kambiré R, Lingué K, Courtin F, Sidibé I, Kiendrébéogo D, N'gouan KE, et al. La Trypanosomiase Humaine Africaine dans l'espace ivoiro-burkinabé: optimisation des stratégies de surveillance épidémiologique. *Parasite*. 2012; 19: 389–396. <https://doi.org/10.1051/parasite/2012194389> PMID: 23193524
8. Robays J, Bilengue MMC, Stuyft PV der, Boelaert M. The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health*. 2004; 9: 542–550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01240.x> PMID: 15117297
9. Robays J, Lefèvre P, Lutumba P, Lubanza S, Kande Betu Ku Mesu V, Van der Stuyft P, et al. Drug toxicity and cost as barriers to community participation in HAT control in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health*. 2007; 12: 290–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01768.x> PMID: 17300638
10. Mitashi P, Hasker E, Lejon V, Kande V, Muyembe J-J, Lutumba P, et al. Human African trypanosomiasis diagnosis in first-line health services of endemic countries, a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6: e1919. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001919> PMID: 23209860
11. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol*. 2014; 6: 257–275. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728> PMID: 25125985
12. Mitashi P, Hasker E, Mbo F, Geertruyden JPV, Kaswa M, Lumbala C, et al. Integration of diagnosis and treatment of sleeping sickness in primary healthcare facilities in the Democratic Republic of the Congo. *Trop Med Int Health*. 2015; 20: 98–105. <https://doi.org/10.1111/tmi.12404> PMID: 25329353
13. Kroa E, Diaby R, Niaré A, Traoré Y, Ahoussou EM, Yao GSA, et al. Analyse de la collaboration entre médecines traditionnelle et moderne dans la région du Sud Bandama (Côte d'Ivoire). *Revue du Cames-Série Pharm Méd Trad Afr*. 2014; 17: 21–27.

14. Lumbala C. C, Bisser S, Nguertoum, Flevaud L., Jacquet D. Development and evaluation of a rapid screening test for sleeping sickness. *Ann Afr Méd.* 2013; 6, Suppl. 1: 49.
15. Büscher P, Mertens P, Leclipteux T, Gilleman Q, Jacquet D, Mumba-Ngoyi D, et al. Sensitivity and specificity of HAT Sero-K-Set, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a case-control study. *Lancet Glob Health.* 2014; 2: e359–e363. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70203-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70203-7) PMID: 25103304
16. Büscher P, Gilleman Q, Lejon V. Rapid diagnostic test for sleeping sickness. *N Engl J Med.* 2013; 368: 1069–1070. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1210373> PMID: 23484849
17. Lumsden WHR, Kimber CD, Evans DA, Doig SJ. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73: 312–317. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90092-0) PMID: 473329
18. Büscher P, Ngoyi DM, Kaboré J, Lejon V, Robays J, Jamonneau V, et al. Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3: e471. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000471> PMID: 19936296
19. Van Meirvenne N, Magnus E, Büscher P. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.* 1995; 60: 189–199. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(95\)00127-z](https://doi.org/10.1016/0001-706x(95)00127-z) PMID: 8907397
20. Lejon V, Büscher P, Magnus E, Moons A, Wouters I, Van Meirvenne N. A semi-quantitative ELISA for detection of *Trypanosoma brucei gambiense* specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta Trop.* 1998; 69: 151–164. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(97\)00137-x](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(97)00137-x) PMID: 9588235
21. Hasker E, Lutumba P, Mumba D, Lejon V, Büscher P, Kande V, et al. Diagnostic accuracy and feasibility of serological tests on filter paper samples for outbreak detection of *T. b. gambiense* human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83: 374–379. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0735> PMID: 20682885
22. Njiru ZK. Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 69: 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.026> PMID: 21251567
23. Deborggraeve S, Claes F, Laurent T, Mertens P, Leclipteux T, Dujardin JC, et al. Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2884–2889. <https://doi.org/10.1128/JCM.02594-05> PMID: 16891507
24. Radwanska M, Claes F, Magez S, Magnus E, Perez-Morga D, Pays E, et al. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67: 289–295. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.289> PMID: 12408669
25. WHO. Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis: Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization; 2013.
26. Courtin F, Jamonneau V, Camara M, Camara O, Coulibaly B, Diarra A, et al. A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Trop Med Int Health.* 2010; 15: 881–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02559.x> PMID: 20545924
27. Bony KE, Akani AF, Kaba D, Gnazegbo A, Diakite I, Karidioula HA, et al. Mouvements anormaux du sujet jeune et trypanosomiase humaine africaine: un couple presque oublié. *Prat Neurol-FMC.* 2019; 10: 162–166.
28. Blum J, Schmid C, Burri C. Clinical aspects of 2541 patients with second stage human African trypanosomiasis. *Acta trop.* 2006; 97: 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.08.001> PMID: 16157286
29. Checchi F, Filipe JAN, Barrett MP, Chandramohan D. The natural progression of gambiense sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2: e303 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000303> PMID: 19104656
30. Miezán T, Meda A, Doua F, Cattand P. Evaluation of the parasitologic techniques used in the diagnosis of human *Trypanosoma gambiense* trypanosomiasis in the Ivory Coast. *Bull Soc Pathol Exot.* 1994; 87: 101–104. PMID: 8061525
31. Lutumba P, Robays J, Miaka C, Kande V, Mumba D, Büscher P, et al. Validity, cost and feasibility of the mAECT and CTC confirmation tests after diagnosis of African of sleeping sickness. *Trop Med Int Health.* 2006; 11: 470–478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01591.x> PMID: 16553930
32. Camara M, Camara O, Ilboudo H, Sakande H, Kaboré J, N'Dri L, et al. Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health.* 2010; 15: 796–799. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x> PMID: 20497407

33. Mumba D, Ekangu R, Mumvamba K, Pyana P, Balharbi F, Decq M, et al. Performance of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and surveillance of gambiense sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e2954. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002954> PMID: 24921941
34. Lejon V, Büscher P, Nzoumbou-Boko R, Bossard G, Jamonneau V, Bucheton B, et al. The separation of trypanosomes from blood by anion exchange chromatography: From Sheila Lanham's discovery 50 years ago to a gold standard for sleeping sickness diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13: e7051.
35. Deborgraeve S, Büscher P. Recent progress in molecular diagnosis of sleeping sickness. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012; 12: 719–730. <https://doi.org/10.1586/erm.12.72> PMID: 23153239
36. Laveissière C, Sané B, Diallo PB, Truc P, Méda AH. Le risque épidémiologique dans un foyer de la maladie du sommeil en Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health*. 1997; 2: 729–732. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1997.d01-378.x> PMID: 9324419
37. Dje NN, Miézan TW, N'guessan P, Brika P, Doua F, Boa F. Distribution géographique des trypanosomes pris en charge en Côte d'Ivoire de 1993 à 2000. *Bull Soc Pathol Exot*. 2002; 95: 359–361. PMID: 12696376
38. Jamonneau V, Garcia A, Ravel S, Cuny G, Oury B, Solano P, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma brucei gambiense* and clinical evolution of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health*. 2002; 7: 610–621. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00905.x> PMID: 12100445
39. Berté D, De Meeüs T, Kaba D, Séré M, Djohan V, Courtin F, et al. Population genetics of *Glossina palpalis palpalis* in sleeping sickness foci of Côte d'Ivoire before and after vector control. *Inf Genet Evol*. 2019; 75: 103963.
40. Laveissière C, Sané B, Méda HA. Measurement of risk in endemic areas of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994; 88: 645–648. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90207-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90207-0) PMID: 7886756
41. Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, et al. Mapping the capacities of fixed health facilities to cover people at risk of gambiense human African trypanosomiasis. *Int J Health Geogr*. 2014; 13: 4. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-13-4> PMID: 24517513
42. Dama E, Drabo A, Kaboré J, Ouédraogo E, Coulibaly B, Ilboudo H, et al. Description of the first native sleeping sickness case diagnosed in Burkina Faso in the over two decades. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12: e6677.
43. Odiit M, Shaw A, Welburn SC, Fèvre EM, Coleman PG, Mc Dermot JJ. Assessing the patterns of health seeking behaviour and awareness among sleeping sickness patients in Eastern Uganda. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004; 98: 339–348. <https://doi.org/10.1179/000349804225003389> PMID: 15228715
44. Bukachi SA, Wandibba S, Nyamongo IK. The treatment pathways followed by cases of human African trypanosomiasis in western Kenya and eastern Uganda. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009; 103: 211–220. <https://doi.org/10.1179/136485909X398230> PMID: 19341536
45. Hasker E, Lumbala C, Mbo F, Mpanya A, Kande V, Lutumba P, et al. Health care-seeking behaviour and diagnostic delays for human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *Trop Med Int Health*. 2011; 16: 869–874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02772.x> PMID: 21447063
46. Jamonneau V, Bucheton B. The challenge of serodiagnosis of sleeping sickness in the context of elimination. *Lancet Glob Health*. 2014; 2: e306–e307. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70226-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70226-8) PMID: 25103289
47. Garcia A, Jamonneau V, Magnus E, Laveissière C, Lejon V, N'guessan P, et al. Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop Med Int Health*. 2000; 5: 786–793. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00623.x> PMID: 11123826
48. Ilboudo H, Jamonneau V, Camara M, Camara O, Dama E, Leno M, et al. Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forécariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes Infect*. 2011; 13: 943–952. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.05.007> PMID: 21658462
49. Ilboudo H, Jamonneau V, Koffi M, Kaboré J, Amoussa R, Holzmüller P, et al. Trypanosome-induced Interferon- γ production in whole blood stimulation assays is associated with latent *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Microbes Infect*. 2016; 18: 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.002> PMID: 26993030
50. Ahouty B, Koffi M, Hamidou I, Simo G, Matovu A, Mulindwa J, et al. Candidate genes-based investigation of susceptibility to Human African Trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e5992.
51. Courtin F, Camara O, Camara M, Kagbadouno M, Bucheton B, Solano P, et al. Sleeping sickness in the historical focus of forested Guinea: update using a geographically based method. *Parasite*. 2019; 26: 61. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019061> PMID: 31599229

52. Camara M, Ouattara E, Duvignaud A, Migliani R, Camara O, Leno M, et al. Impact of the Ebola outbreak on *Trypanosoma brucei gambiense* infection medical activities in coastal Guinea, 2014–2015: A retrospective analysis from the Guinean national Human African Trypanosomiasis control program. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e6060.
53. Mudji J, Benhamou J, Mwamba-Miaka E, Burri C, Blum J. The Flipside of eradicating a disease; Human African Trypanosomiasis in a Woman in Rural Democratic Republic of Congo: A Case Report. *Trop Med Infect Dis*. 2019; 4: 142.
54. DNDi: Drugs for Neglected Diseases initiative. The Celebration of the first anniversary National HAT Day in DRC. 2019 <http://www.forumdesas.org/spip.php?article18469> -
55. Nekpeni EB, Dagnogo M, Eouzan JP. Détermination de la limite géographique entre deux sous-espèces de glossines en Côte d'Ivoire: *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy, 1830) et *G.P. gambiensis* (Vanderplank, 1949). *Trop. Med. Parasit*. 1988; 40: 12–15.

PUBLICATION 2

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/348692361>

Evolution des stratégies de lutte contre la trypanosomiase humaine africaine dans un contexte de transition épidémiologique

Article · December 2020

CITATIONS

0

READS

163

15 authors, including:



Oumou Camara

Programme National de Lutte contre la Trypanosomiase Humaine de Guinée Afric...

53 PUBLICATIONS 546 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Fabrice Courtin

Institut de Recherche pour le Développement Côte d'Ivoire

86 PUBLICATIONS 1,401 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Jacques Kaboré

Université Nazi Boni (UNB) / Centre International de Recherche-Développement s...

34 PUBLICATIONS 644 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Kaba Dramane

INSTITUT PIERRE RICHET / Institut National de Santé Publique

72 PUBLICATIONS 1,245 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



tsetse phylogenetics and population genetics [View project](#)



Statistical analysis of spatial organization of fluorescent spots in bioimaging [View project](#)

All content following this page was uploaded by Jacques Kaboré on 28 January 2021.

The user has requested enhancement of the downloaded file.



Figure 1. Dépistage actif de la trypanosomiase humaine africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*.
A. Enregistrement de la population venue se faire tester. **B.** Prélèvement de sang par ponction digitale. **C.** Tests sérologique et parasitologique.

la fin des années 1990 et un pic de 37 385 cas rapportés a été enregistré en 1998 [43]. La riposte qui s'est organisée autour de la création de programmes nationaux dédiés à la lutte contre la THA, bénéficiant du soutien de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), de plusieurs organisations non gouvernementales, d'institutions de recherche et de partenaires privés, a été efficace. On assiste depuis le début du siècle à une diminution progressive du nombre de cas rapportés annuellement, qui est passé sous la barre des 10 000 en 2009 [44]. La THA a été inscrite en 2012 sur la feuille de route de l'OMS sur les maladies tropicales négligées, avec l'objectif d'élimination comme problème de santé publique (EPSP) en 2020 [37].

Deux indicateurs globaux ont alors été définis pour suivre le processus d'élimination : le nombre annuel de cas rapportés, avec l'objectif de passer sous la barre des 2 000 en 2020, et la surface de la zone à risque rapportant plus d'un cas sur 10 000 personnes par an, calculée sur une période de cinq ans, avec l'objectif d'atteindre une réduction de 90 % de cette surface sur la période 2016-2020 comparée à celle de 709 000 km² observée sur la période 2000-2004. Avec moins de 1 000 cas rapportés en 2018 et une réduction annuelle de plus de 40 000 km² de la zone rapportant plus d'un cas sur 10 000 personnes par an, les objectifs fixés pour 2020 sont en train d'être atteints [14]. L'indicateur au niveau national pour la THA due à *Tbg* est la moyenne du nombre de cas sur 10 000 personnes par an sur cinq années consécutives dans chaque district sanitaire du pays. La validation de l'EPSP par l'OMS se fait alors sur la base d'un dossier constitué par le pays rassemblant toutes les informations épidémiologiques prouvant que cet indicateur est inférieur à 1 dans l'ensemble des districts. Sept pays ont été récemment identifiés comme éligibles pour demander cette validation [14].

Cependant, malgré les résultats spectaculaires obtenus ces dernières années, plus de 50 millions de personnes sont toujours soumises à un risque plus ou moins élevé d'infection dans l'aire de distribution des glossines, et le passé nous a déjà montré que la THA a tendance à réémerger rapidement après suspension de la lutte. Il est donc crucial de poursuivre les efforts de lutte, qui s'inscrivent aujourd'hui au cœur d'un processus de transition épidémiologique importante, auquel les stratégies et les outils doivent et devront continuellement s'adapter, pour atteindre les prochains objectifs fixés pour 2030 par la nouvelle feuille de

route de l'OMS : l'interruption de la transmission pour la THA due à *Tbg* et l'EPSP pour la THA due à *Tbr* [14].

Comme il n'existe pas de vaccin ni de chimioprophylaxie, la lutte contre la THA repose : (i) sur le dépistage et le traitement les plus précoces possibles des personnes infectées (lutte médicale) ; (ii) sur le traitement curatif et prophylactique des animaux réservoirs ; (iii) sur la lutte contre la mouche tsé-tsé (lutte antivectorielle), pour réduire le risque de transmission [2]. L'objectif de cette revue est de faire un état des lieux des stratégies et des outils de lutte actuellement utilisés, et en particulier de diagnostic, en précisant leurs intérêts et limites dans le contexte actuel de transition épidémiologique.

2. Stratégies de lutte médicale

La lutte médicale repose sur le dépistage actif exhaustif des cas par des équipes mobiles qui se déplacent de village en village dans les zones à risque (Fig. 1), et sur le dépistage passif intégré dans les systèmes nationaux de santé [38]. Pour compenser les limites de ces deux méthodes et s'adapter au contexte actuel de baisse généralisée des prévalences, des stratégies de dépistage actif, ciblé sur les populations les plus à risque, ont récemment été développées pour dépister les cas de THA le plus tôt possible. Du fait d'une symptomatologie aspécifique, le diagnostic de la THA se fait généralement par une suspicion sérologique suivie d'une confirmation parasitologique, sachant que la mise en évidence du parasite est théoriquement nécessaire avant d'initier un traitement potentiellement toxique (multiples effets secondaires fréquents) et toujours contraignant (hospitalisation coûteuse de plus de dix jours) [38].

2.1. Dépistage actif exhaustif

Cette stratégie développée au début du XX^e siècle est toujours utilisée pour endiguer les épidémies de THA due à *Tbg* [39, 45]. Elle est menée par des équipes mobiles spécialisées qui procèdent à un dépistage à grande échelle parmi les populations à risque. Idéalement elle est précédée (i) d'un recensement de la population pour pouvoir en évaluer l'efficacité qui repose sur le taux de présentation de la population et (ii) d'une sensibilisation pour améliorer ce taux de présentation [48]. L'ensemble de la population est d'abord soumise à un test sérologique adapté au dépistage de masse, suivi d'une recherche parasitologique sur les sujets positifs [7]. Depuis les années 1980, le test sérologique

le plus utilisé est le *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* (CATT) [29]. Le diagnostic parasitologique consiste à rechercher le parasite par examen microscopique (x400) entre lame et lamelle du suc ganglionnaire, en cas d'adénopathies cervicales ; soit dans le sang par des méthodes de filtration et/ou de concentration adaptées aux faibles parasitémiés qui caractérisent la THA à *Tbg*, la plus sensible étant la *mini Anion Exchange Centrifugation Technique* (mAECT) [35].

Le dépistage actif exhaustif n'est pas adapté à la THA due à *Tbr*, d'une part à cause de son caractère aigu, et d'autre part parce qu'aucun test sérologique n'est disponible. Dans le cas de la THA due à *Tbg*, il permet une détection précoce des cas, même asymptomatiques, facilitant la prise en charge thérapeutique et limitant dans le temps leur rôle de réservoir, source de contamination pour la population. Il permet aussi d'accéder aux populations à risque les plus reculées ayant un accès limité aux structures de dépistage. Si cette stratégie permet de contrôler rapidement les situations épidémiques, son rapport coût/efficacité diminue avec la baisse des prévalences, accompagnée par un désintérêt progressif des populations à participer aux séances de dépistage, notamment parce qu'elles ne considèrent plus la THA comme une menace [20, 33, 40]. À titre d'exemple, en Côte d'Ivoire, aucun cas de THA n'a été détecté lors des dépistages actifs menés en 2010 et 2011 dans les foyers endémiques de Sinfra et Bonon, alors que douze cas provenant de ces deux foyers étaient diagnostiqués ces mêmes années dans le seul centre de traitement national [26]. Une autre difficulté du dépistage actif est liée au fait que des cas sont dépistés avant l'apparition de symptômes et que certains d'entre eux ne se sentant pas malades, ne se rendent pas spontanément dans un centre à cause des contraintes liées au traitement [40].

2.2. Dépistage passif

Le dépistage passif est en général intégré aux systèmes nationaux de santé dans les structures de santé périphériques ou services de soins de santé primaire dans les zones à risque [32, 34, 51]. Pour la THA due à *Tbg*, un test sérologique est effectué sur des sujets présentant des signes évocateurs de la THA. Le développement récent des tests de diagnostic individuel rapide (TDR) réalisable par un personnel non spécialisé et ne nécessitant ni source de courant, ni chaîne de froid, a considérablement facilité l'intégration du diagnostic de la THA dans le système de santé et a permis l'extension du dépistage passif à un moment crucial du processus d'élimination [22]. Il en existe plusieurs formats [1, 3] dont les performances diagnostiques sont toujours en cours d'évaluation. Les examens parasitologiques sont alors effectués sur les suspects cliniques positifs au TDR. Si la suspicion clinique et sérologique peut se faire dans n'importe quel centre de santé, les examens parasitologiques plus complexes sont souvent effectués dans des centres équipés où sont référés les suspects cliniques positifs au TDR [17]. Pour la THA due à *Tbr*, du fait de l'indisponibilité d'un test sérologique adapté, et en raison des fortes parasitémiés observées, les examens parasitologiques simples comme l'examen microscopique de sang frais, la goutte épaisse, ou d'un suc du chancre d'inoculation, sont directement effectués pour les suspects cliniques [38].

Le dépistage passif présente l'intérêt de rappeler aux agents de santé l'existence de la THA et leur donne les moyens de la dépister à l'aide d'un protocole simple basé sur une suspicion clinique et sérologique. Il rend le diagnostic accessible à toutes les populations à risque tout en ciblant des suspects cliniques même s'ils sont venus consulter pour d'autres motifs [32]. Enfin, la localisation géographique des patients confirmés, permet d'identifier les zones de transmission et de définir une meilleure orientation des efforts de contrôle. Cependant, le fait de cibler des suspects cliniques amène à ne détecter les cas que lorsqu'ils présentent des symptômes, notamment neurologiques, et sont donc déjà à un stade avancé de la maladie [13, 26]. Il s'agit d'une contrainte, non seulement pour le patient, mais aussi pour la communauté, car le sujet constitue un réservoir de parasites et une source de contamination potentielle jusqu'à son traitement. Une autre limite est que le dépistage passif basé sur une suspicion clinique difficile nécessite une formation initiale et continue du personnel de santé souvent soumis à une importante mobilité, ainsi qu'à une baisse de motivation quand le dépistage de nouveau cas devient rare, qui se traduit souvent par une perte progressive du réflexe « trypano » [11, 17, 31]. Le fait que le diagnostic parasitologique de la THA à *Tbg*, qui est une procédure complexe, ne soit effectif que dans certains centres de référence est aussi un inconvénient majeur. En effet, certains suspects sérologiques détectés dans les centres périphériques ne se rendent pas spontanément, voire pas du tout, dans les centres de diagnostic parasitologique parfois éloignés, ce qui retarde leur dépistage et le traitement [17, 34]. Enfin un autre inconvénient est que l'efficacité du dépistage passif intégré dépend du taux de fréquentation qui peut être faible dans certaines zones à risque reculées, notamment à cause d'une offre de soin coûteuse et de faible qualité [32].

2.3. Dépistage actif ciblé

En théorie, le dépistage actif exhaustif et le dépistage passif sont complémentaires. En pratique, le premier est souvent priorisé pour rapidement endiguer une situation épidémique. Mais avec la baisse de la prévalence, il est progressivement remplacé par le second, moins coûteux, mais impliquant un dépistage tardif, qui est alors plutôt utilisé comme stratégie de surveillance. Dans le contexte actuel de transition épidémiologique en vue d'atteindre l'EPSP puis l'interruption de la transmission, des stratégies de dépistage actif ciblé ont été développées pour compenser les principaux inconvénients du dépistage actif exhaustif et de la surveillance passive, c'est-à-dire pour permettre une détection précoce des cas avec un rapport coût/efficacité acceptable. Elles sont menées par des équipes spécialisées qui identifient et ciblent les populations les plus à risque à tester.

Dans une nouvelle zone à risque de transmission ou dans un foyer historique de THA où aucune information épidémiologique récente n'est disponible, il est nécessaire de déterminer la situation de la maladie pour pouvoir y mettre en place des stratégies adaptées. Le dépistage actif peut cibler un choix de villages considérés comme les plus à risque sur la base de données historiques, épidémiologiques et géographiques. Il est alors précédé de la stratégie dite d'identification des villages à risque [8, 42].

Le dépistage actif peut aussi cibler les populations partageant les mêmes espaces que les derniers cas dépistés. Ces populations, considérées comme particulièrement à risque, sont identifiées en déterminant précisément leurs lieux de vie et les trajets quotidiens des cas par un suivi spatialisé [9]. Pour améliorer le taux de participation, ce dépistage réactif peut se faire en porte à porte [27] et/ou avec des équipes légères et très mobiles, à moto par exemple, pour faciliter l'accessibilité aux populations les plus reculées [18].

Le dépistage actif ciblé peut aussi consister (i) à suivre les cas dépistés lors des campagnes de dépistage actif exhaustif qui ne se rendent pas spontanément dans un centre de traitement afin de les convaincre de se faire traiter [23], et (ii) à identifier et effectuer les examens parasitologiques sur les suspects sérologiques du dépistage passif qui ne se sont pas rendus spontanément dans un centre de référence [17, 32, 34].

Lors des dépistages actifs ou passifs, des individus positifs aux tests sérologiques (CATT ou TDR), mais négatifs aux examens parasitologiques, sont aussi identifiés mais non-traités. Une partie de ces sujets, communément appelés séropositifs, constitue pourtant un potentiel réservoir de parasites [15]. Il est préconisé de renouveler régulièrement (annuellement) un dépistage actif ciblé sur ces sujets jusqu'à ce que le parasite soit mis en évidence et le sujet traité, ou jusqu'à négativation des tests sérologiques, qui est le signe d'une guérison spontanée [21]. Des tests spécifiques de laboratoire comme la trypanolyse [24], la *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)¹ [51] ou l'ELISA [19] peuvent être effectués pour différencier les faux positifs aux tests sérologiques de terrain des séropositifs qui ont été ou sont encore porteurs de parasites et qu'il est nécessaire de suivre.

2.4. Traitement de la trypanosomiase humaine

Le traitement des sujets dépistés, étape clé de la lutte médicale, fait l'objet du précédent article de ce bulletin [cf. p. 49]. Les recommandations de l'OMS mettent récemment en avant l'utilisation du fexinidazole comme nouveau traitement de la THA à *Tbg* [28].

3. Traitement curatif et prophylactique des animaux réservoirs

La THA à *Tbr* étant une zoonose, ce sont les animaux qui sont les principaux réservoirs du parasite. Prévenir la transmission à l'homme en assainissant ces réservoirs est une priorité de la lutte contre cette maladie, comme ce fut récemment le cas avec le traitement massif des bovins par des trypanocides en Ouganda [16]. Bien que plusieurs travaux de recherche aient démontré l'existence de *Tbg* chez des animaux sauvages et domestiques, le rôle épidémiologique des animaux en tant que réservoirs fait encore l'objet de débats, notamment à cause de la difficulté de différencier avec certitude *Tbg* de *T. brucei brucei*, pathogène exclusivement animal [4]. C'est par exemple le cas en Côte d'Ivoire où des taux d'infections importants de *Tbg*

(près de 30 %) sont suspectés chez le porc domestique élevé en divagation en périphérie des villages [36], alors que moins de dix cas sont rapportés annuellement depuis 2009 [27]. Une situation comparable est observée au Cameroun [47]. Si ce réservoir existe, il ne semble donc apparemment pas freiner le contrôle la maladie par la combinaison des stratégies de lutte médicale et antivectorielle dans ces deux pays. Néanmoins, dans le contexte actuel de transition épidémiologique, cette question devient prioritaire en termes de recherche, puisqu'un réservoir animal pourrait compromettre l'objectif de l'interruption de la transmission et être à la base d'une réémergence dans d'autres foyers [14]. En termes de lutte, le traitement des animaux pourrait être reconsidéré en attendant le résultat de ces recherches.

Le traitement des animaux, qui ne peut s'appliquer qu'aux animaux domestiques, consiste à utiliser des trypanocides soit à titre curatif, soit à titre prophylactique. Selon le contexte épidémiologique, il peut être exhaustif ou ciblé, et doit être mené en collaboration avec les autorités et services vétérinaires selon le concept « une seule santé » avec un impact concomitant sur les trypanosomiasés animales [46].

4. Lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle (LAV) est une stratégie qui vise à diminuer les densités de glossines afin de réduire le contact homme/vecteur et donc le risque de transmission du parasite. En l'absence de vaccin et de chimioprophylaxie, c'est le seul moyen de prévention contre la THA. Il existe plusieurs méthodes qui sont décrites dans l'article de Solano *et al.* de ce numéro [cf. p. 64]. La plus utilisée pour lutter contre la THA à *Tbg* est l'usage d'attractifs visuels noirs et bleus, sous forme de pièges et d'écrans imprégnés d'insecticide. Le développement récent des « *tiny targets* » a permis de réduire le coût de la LAV sans en altérer l'efficacité, avec des réductions de densités de glossines pouvant atteindre 80 % à 90 %. Plusieurs études récentes ont montré que cette stratégie associée à la lutte médicale a contribué significativement à contrôler la maladie dans plusieurs foyers en Guinée, au Tchad et en Ouganda [10, 25, 30, 49]. Une étude de modélisation a même montré que la LAV serait nécessaire pour atteindre l'interruption de la transmission de la THA à *Tbg* dans les foyers de forte endémicité en République démocratique du Congo avant 2030 [41]. Du fait de son caractère zoonotique, la LAV est essentielle pour limiter le risque d'infections humaines à partir des animaux domestiques, mais également sauvages, chez lesquels un traitement trypanocide n'est pas envisageable. En plus des leurres imprégnés d'insecticide, une méthode efficace consiste à appliquer de l'insecticide sur le bétail qui devient alors un attractif mobile [50].

S'il ne fait plus aucun doute que la LAV doit être utilisée en complément de la lutte médicale pour contrôler la THA, des études sont toujours en cours pour déterminer jusqu'à quels degrés d'endémicité elle doit être utilisée en tenant compte de son rapport coût/efficacité et pendant combien de temps elle doit être maintenue afin d'atteindre l'interruption de la transmission.

¹NDLR. Technique d'amplification d'acide nucléique isotherme ne nécessitant pas de thermocycleur.

Tableau I. Stratégies de lutte à mettre en place contre la trypanosomiase humaine africaine en fonction du degré d'endémicité.

THA	Nombre de cas par habitant et par an	Risque	Dépistage actif	Dépistage ciblé par réactif	Surveillance passive	LAV	Traitement des animaux
<i>Tbg</i>	≥ 1 cas / 10 ³	Haut	+++	+	+	+++	NA
<i>Tbg</i>	entre 1 cas / 10 ⁴ et 1 cas / 10 ³	Modéré	++	++	++	++	NA
<i>Tbg</i>	< 1 cas / 10 ⁴	Faible	+	+++	+++	+	+
<i>Tbr</i>	≥ 1 cas / 10 ³	Haut	+	+	+++	+++	++
<i>Tbr</i>	entre 1 cas / 10 ⁴ et 1 cas / 10 ³	Modéré	NA	+	+++	+++	++
<i>Tbr</i>	< 1 cas / 10 ⁴	Faible	NA	+	+++	+++	+

L'association nombre de cas/habitants/an et risque provient des définitions proposées par l'OMS [38]
 THA = Trypanosomiase humaine africaine ; *Tbg* = *Trypanosoma brucei gambiense* ; *Tbr* = *Trypanosoma brucei rhodesiense* ;
 LAV = Lutte antivectorielle ; +++ = prioritaire ; ++ = conseillé ; + = optionnel ; NA = non adapté

Dans cette approche, il faut tenir compte du fait que même dans un contexte de faible prévalence, une LAV ciblée sur les lieux de contact homme/vecteur pourrait permettre de limiter le risque de transmission à partir du réservoir humain résiduel ou du potentiel réservoir animal. La LAV fait également partie des stratégies « une seule santé » qui ont un impact à la fois en termes de lutte contre la THA et contre les trypanosomioses animales [46].

Conclusion, la lutte continue !

Les deux principales stratégies de lutte contre la THA à *Tbg* ont bénéficié d'avancées significatives ces dernières années, permettant de s'adapter à la diminution des prévalences et d'atteindre aujourd'hui l'EPSP. Le développement des TDR a permis un renforcement important du dispositif de dépistage passif intégré. Si le dépistage actif exhaustif est toujours priorisé dans les derniers foyers de forte endémie, principalement en République démocratique du Congo, plusieurs stratégies de dépistage actif ciblé, moins coûteuses, ont été développées pour dépister les derniers cas et assainir le réservoir humain de parasites. Le développement des écrans « *tiny targets* » a permis à la LAV de retrouver la place qu'elle mérite dans les processus de lutte. Malheureusement, la lutte contre la THA à *Tbr* n'a pas connu les mêmes succès, pourtant nécessaires à un contrôle durable, qui repose toujours sur le triptyque surveillance passive, LAV et traitement des animaux.

Un autre fait marquant dans cet élan vers l'élimination de la THA a été de mettre à profit la complémentarité de plusieurs stratégies de lutte selon le contexte épidémiologique. Par exemple l'association lutte médicale et LAV a permis de contrôler la maladie, en seulement quelques années, dans plusieurs foyers endémiques et l'association dépistage actif ciblé et surveillance passive s'est montrée particulièrement efficace pour atteindre les critères de l'EPSP dans les foyers hypo-endémiques. Au regard de cette revue bibliographique, et en se référant à la notion

de risque défini par l'OMS [14], des associations de stratégies pourraient être recommandées selon le degré de prévalence dans une zone donnée (**Tableau I**).

Si ces évolutions ont permis d'atteindre l'objectif fixé par l'OMS en 2020, il n'en reste pas moins que l'EPSP de la THA n'est qu'une étape vers l'interruption de la transmission et que les stratégies et les outils de lutte vont devoir continuer à s'adapter à de nouveaux défis. Les capacités de lutte diminueront probablement avec notamment la perte du « réflexe trypano » par les agents de santé qui seront de moins en moins motivés à déployer leur énergie pour rechercher les quelques cas d'une maladie infectieuse qui aurait quasiment disparu. L'adhésion des populations aux stratégies de lutte, nécessaire pour en garantir l'efficacité et la pérennité, risque aussi de diminuer. Dans ce contexte, la sensibilisation pourrait devenir une stratégie de lutte à part entière, tant au niveau local dans les zones à risque, qu'au niveau national. En République démocratique du Congo, le pays le plus touché par la THA, une journée nationale de commémoration de la THA a été créée [12]. Cette initiative de sensibilisation pourrait être étendue à tous les pays endémiques, en suivant l'exemple de la journée mondiale de la maladie de Chagas, le 14 avril (<https://www.who.int/news-room/events/detail/2020/04/14/default-calendar/celebrating-world-chagas-disease-day-for-the-first-time-in-2020>). Le développement de cette stratégie devra être accompagné par une approche socio-anthropologique pour la rendre la plus efficace possible.

La baisse des prévalences dans un pays va aussi inévitablement s'accompagner d'une raréfaction des ressources humaines spécialisées et dédiées à la THA. Pour la compenser, il est important de renforcer la coordination entre les partenaires nationaux et la coopération entre pays, notamment par la création d'équipes régionales d'intervention en cas d'apparition de phénomènes de réémergence.

Un autre « challenge » qui permettra d'optimiser cette adaptation est de précisément définir les critères à utiliser pour suivre l'évolution de la maladie et vérifier l'interruption de la transmission. L'évolution des stratégies et des outils de lutte devra aussi tenir compte des résultats sur les phénomènes biologiques qui pourraient compromettre l'élimination. Par exemple, les études en cours sur le réservoir animal de *Tbg* ont déjà permis d'initier des réflexions sur la mise en place du traitement des animaux comme stratégie de lutte contre la THA à *Tbg*. Les récentes études, qui ont montré que le derme est un réservoir anatomique de trypanosomes [5, 6], pourraient également faire évoluer les stratégies de dépistage et de traitement des hommes et des animaux.

Une avancée très attendue dans la lutte contre la THA est un traitement oral à prise unique efficace contre les deux formes de THA et n'occasionnant que peu d'effets secondaires. Ces espoirs

reposent sur les essais cliniques en cours sur l'acoziborole qui pourrait être disponible dans les prochaines années [28]. Les stratégies et les méthodes de lutte devront une fois de plus s'adapter à cet espoir qui pourrait permettre des changements radicaux, notamment celui de pouvoir traiter des personnes sur la base d'une suspicion clinique ou sérologique, voire sur la base d'un simple risque d'exposition.

Remerciements

Les thèses de CFAC, MK et OC sont financées par le projet DiTECT-HAT dans le cadre du programme EDCTP2 de l'Union européenne (Financement N° DRIA-2014-306-DiTECT-HAT). Nous remercions le Réseau francophone sur les maladies tropicales négligées pour son engagement dans la lutte contre ces maladies dont fait partie la THA.

Références

1. Bisser S, Lumbala C, Nguertoum E, *et al.* Sensitivity and specificity of a prototype rapid diagnostic test for the detection of *Trypanosoma brucei gambiense* infection: a multi-centric prospective study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016, **10**, e0004608.
2. Buscher P, Cecchi G, Jamonneau V, *et al.* Human African trypanosomiasis. *Lancet* 2017, **390**, 2397-409.
3. Buscher P, Mertens P, Leclipteux T, *et al.* Sensitivity and specificity of HAT Sero-K-Set, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a case-control study. *Lancet Glob. Health* 2014, **2**, e359-63.
4. Buscher P, Bart JM, Boelaert M, *et al.* Do cryptic reservoirs threaten gambiense-sleeping sickness elimination? *Trends Parasitol.* 2018, **34**, 197-207.
5. Camara M, Soumah A, Ilboudo H, *et al.* Extravascular dermal trypanosomes in suspected and confirmed cases of gambiense human African trypanosomiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2020, DOI: 10.1093/cid/ciaa897.
6. Capewell P, Cren-Travaille C, Marchesi F, *et al.* The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne african trypanosomes. *eLife* 2016, **5**, e17716.
7. Chappuis F, Loutan L, Simarro P, *et al.* Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, **18**, 133-46.
8. Courtin F, Camara O, Camara M, *et al.* Sleeping sickness in the historical focus of forested Guinea: update using a geographically based method. *Parasite* 2019, **26**, 61.
9. Courtin F, Jamonneau V, Camara M, *et al.* A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Trop. Med. Int. Health* 2010, **15**, 881-9.
10. Courtin F, Camara M, Rayaisse JB, *et al.* Reducing human-tsetse contact significantly enhances the efficacy of sleeping sickness active screening campaigns: a promising result in the context of elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015, **9**, e0003727.
11. Dama E, Drabo A, Kabore J, *et al.* Description of the first sleeping sickness case diagnosed in Burkina Faso since two decades. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018, **12**, e0006677.
12. Drugs for neglected diseases initiative. Célébration du premier anniversaire de la Journée nationale de lutte contre la trypanosomiase humaine africaine en République démocratique du Congo, Kinshasa 2019, <http://www.forumdesas.org/spip.php?article18469>
13. Fevre EM, Picozzi K, Fyfe J, *et al.* A burgeoning epidemic of sleeping sickness in Uganda. *Lancet* 2005, **366**, 745-7.
14. Franco JR, Cecchi G, Priotto G, *et al.* Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis at continental and country level: update to 2018. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020, **14**, e0008261.
15. Garcia A, Jamonneau V, Magnus E, *et al.* Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop. Med. Int. Health* 2000, **5**, 786-93.
16. Hamill L, Picozzi K, Fyfe J, *et al.* Evaluating the impact of targeting livestock for the prevention of human and animal trypanosomiasis, at village level, in districts newly affected with *T. b. rhodesiense* in Uganda. *Infect. Dis. Poverty* 2017, **6**, 16.
17. Hasker E, Lumbala C, Mbo F, *et al.* Health care-seeking behaviour and diagnostic delays for human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *Trop. Med. Int. Health* 2011, **16**, 869-74.
18. Hasker E, Lumbala C, Mpanya A, *et al.* Alternative strategies for case finding in human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo: Ps2. 093. *Trop. Med. Int. Health* 2015, **20**.
19. Hasker E, Lutumba P, Mumba D, *et al.* Diagnostic accuracy and feasibility of serological tests on filter paper samples for outbreak detection of *T. b. gambiense* human African trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010, **83**, 374-9.
20. Hasker E, Mpanya A, Makabuza J, *et al.* Treatment outcomes for human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo: analysis of routine program data from the world's largest sleeping sickness control program. *Trop. Med. Int. Health* 2012, **17**, 1127-32.
21. Ilboudo H, Jamonneau V, Camara M, *et al.* Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forécariah mangrove focus (Guinea): Perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes Infect.* 2011, **13**, 943-52.
22. Jamonneau V, Bucheton B. The challenge of serodiagnosis of sleeping sickness in the context of elimination. *Lancet Glob. Health* 2014, **2**, e306-7.
23. Jamonneau V, Ilboudo H, Kabore J, *et al.* Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100 % fatal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012, **6**, e1691.

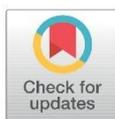
- 24 Jamongneau V, Bucheton B, Kabore J, *et al.* Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, **4**, e917.
- 25 Kagabadouno M, Camara O, Camara M, *et al.* Ebola outbreak brings to light an unforeseen impact of tsetse control on sleeping sickness transmission in Guinea. *bioRxiv* 2018, 202762.
- 26 Kambire R, Lingue K, Courtin F, *et al.* Trypanosomiase humaine africaine en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso : optimisation des stratégies de surveillance épidémiologique. *Parasite* 2012, **19**, 389-96.
- 27 Koffi M, N'Djetchi M, Ilboudo H, *et al.* A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Cote d'Ivoire. *Parasite* 2016, **23**, 51.
- 28 Lindner AK, Lejon V, Chappuis F, *et al.* New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. *Lancet Infect. Dis.* 2020, **20**, e38-e46.
- 29 Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. A Card-Agglutination Test with stained Trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1978, **58**, 169-76.
- 30 Mahamat MH, Peka M, Rayaisse JB, *et al.* Adding tsetse control to medical activities contributes to decreasing transmission of sleeping sickness in the Mandoul focus (Chad). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, **11**, e0005792.
- 31 Matemba LE, Fevre EM, Kibona SN, *et al.* Quantifying the burden of rhodesiense sleeping sickness in Urambo district, Tanzania. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, **4**, e868.
- 32 Mitashi P, Hasker E, Mbo F, *et al.* Integration of diagnosis and treatment of sleeping sickness in primary healthcare facilities in the Democratic Republic of the Congo. *Trop. Med. Int. Health* 2015, **20**, 98-105.
- 33 Mpanya A, Hendrickx D, Vuna M, *et al.* Should I get screened for sleeping sickness? A qualitative study in Kasai province, Democratic Republic of Congo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012, **6**, e1467.
- 34 Mulenga P, Chenge F, Boelaert M, *et al.* Integration of human African trypanosomiasis control activities into primary healthcare services: a scoping review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2019, **101**, 1114-25.
- 35 Mumba DN, Ekangu RA, Kodi MFM, *et al.* Performance of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and surveillance of gambiense sleeping sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, **8**, e2954.
- 36 N'Djetchi MK, Ilboudo H, Koffi M, *et al.* The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Cote d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, **11**, e0005993.
- 37 OMS, 2012. Accélérer les travaux visant à surmonter l'impact mondial des maladies tropicales négligées : Une feuille de route pour la mise en œuvre. Genève, 1-42.
- 38 OMS, 2013. Contrôle et surveillance de la trypanosomiase humaine africaine : Rapport d'un comité d'experts de l'OMS. Report No. 9240691723.
- 39 Robays J, Bilengue MM, Van der Stuyft P, *et al.* The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Trop. Med. Int. Health* 2004, **9**, 542-50.
- 40 Robays J, Lefevre P, Lutumba P, *et al.* Drug toxicity and cost as barriers to community participation in HAT control in the Democratic Republic of Congo. *Trop. Med. Int. Health* 2007, **12**, 290-8.
- 41 Rock KS, Torr SJ, Lumbala C, *et al.* Predicting the impact of intervention strategies for sleeping sickness in two high-endemicity health zones of the Democratic Republic of Congo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, **11**.
- 42 Rouamba J, Salissou A, Sakandé H, *et al.* Identification des villages à risque (IVR): pour un état des lieux de la trypanosomiase humaine africaine au Niger. *Confins. Revue franco-brésilienne de géographie* 2019, **42**.
- 43 Simarro PP, Jannin J, Cattand P. Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *PLoS Med.* 2008, **5**, e55.
- 44 Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, *et al.* The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: The way forward. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011, **5**, e1007.
- 45 Simarro PP, Franco JR, Ndongo P, *et al.* The elimination of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Trop. Med. Int. Health* 2006, **11**, 636-46.
- 46 Simo G, Rayaisse JB. Challenges facing the elimination of sleeping sickness in West and Central Africa: Sustainable control of animal trypanosomiasis as an indispensable approach to achieve the goal. *Parasit. Vectors* 2015, **8**, 640.
- 47 Simo G, Asonjanya T, Nkinin S, *et al.* High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the fonter sleeping sickness focus in Cameroon. *Vet. Parasitol.* 2006, **139**, 57-66.
- 48 Solano P, Kone A, Garcia A, *et al.* Rôle du voyage des patients dans la transmission de la trypanosomiase humaine africaine dans une zone hyper endémique de la Côte d'Ivoire. *Med. Trop. (Mars)*. 2003, **63**, 577-82.
- 49 Tirados I, Esterhuizen J, Kovacic V, *et al.* Tsetse control and gambian sleeping sickness: implications for control strategy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015, **9**, e0003822.
- 50 Torr S, Maudlin I, Vale G. Less is more: restricted application of insecticide to cattle to improve the cost and efficacy of tsetse control. *Med. and Vet. Entomol.* 2007, **21**, 53-64.
- 51 Wamboga C, Matovu E, Bessell PR, *et al.* Enhanced passive screening and diagnosis for gambiense human African trypanosomiasis in north-western Uganda - Moving towards elimination. *PLoS One* 2017, **12**, e0186429.

PUBLICATION 3

RESEARCH ARTICLE

Passive surveillance of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire: Understanding prevalence, clinical symptoms and signs, and diagnostic test characteristics

Minayégninrin Koné^{1,2}, Dramane Kaba¹, Jacques Kaboré^{3,4}, Lian Francesca Thomas^{5,6}, Laura Cristina Falzon^{5,6}, Mathurin Koffi², Cyrille Mambo Kouamé¹, Bernardin Ahouty², Charlie Franck Alfred Compaoré³, Emmanuel Kouassi N'Gouan⁷, Philippe Solano⁸, Eric Fèvre^{5,6}, Philippe Büscher⁹, Veerle Lejon⁸, Vincent Jamonneau^{1,8*}



1 Unité de Recherche « Trypanosomoses », Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire, **2** Laboratoire de Biodiversité et Gestion des Ecosystèmes Tropicaux, Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire, UFR Environnement, Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire, **3** Unité de Recherche sur les Maladies à Vecteurs et Biodiversité, Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en Zone Subhumide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **4** Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Techniques, Université Nazi Boni, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso, **5** International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya, **6** Institute of Infection, Veterinary and Ecological Sciences, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, **7** Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase, Daloa, Côte d'Ivoire, **8** Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, INTERTRYP, Institut de Recherche pour le Développement, Université de Montpellier, Montpellier, France, **9** Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

* vincent.jamonneau@ird.fr

OPEN ACCESS

Citation: Koné M, Kaba D, Kaboré J, Thomas LF, Falzon LC, Koffi M, et al. (2021) Passive surveillance of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire: Understanding prevalence, clinical symptoms and signs, and diagnostic test characteristics. *PLoS Negl Trop Dis* 15(8): e0009656. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009656>

Editor: Grace Adira Murilla, KARI-Trypanosomiasis Res Centre, KENYA

Received: February 13, 2021

Accepted: July 16, 2021

Published: August 30, 2021

Copyright: © 2021 Koné et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The public sharing of personal health data is subject to the General Data Protection Regulation. The health data underlying the findings described in the manuscript can therefore not be made public. Metadata are available via <https://doi.org/10.23708/FNZDMZ>. Data will be made available to qualified researchers upon request and after signing a confidentiality agreement. Data requests may be sent to the

Abstract

Background

Little is known about the diagnostic performance of rapid diagnostic tests (RDTs) for passive screening of human African trypanosomiasis (HAT) in Côte d'Ivoire. We determined HAT prevalence among clinical suspects, identified clinical symptoms and signs associated with HAT RDT positivity, and assessed the diagnostic tests' specificity, positive predictive value and agreement.

Methods

Clinical suspects were screened with SD Bioline HAT, HAT Sero-K-Set and rHAT Sero-Strip. Seropositives were parasitologically examined, and their dried blood spots tested in trypanolysis, ELISA/*Tbg*, m18S-qPCR and LAMP. The HAT prevalence in the study population was calculated based on RDT positivity followed by parasitological confirmation. The association between clinical symptoms and signs and RDT positivity was determined using multivariable logistic regression. The tests' Positive Predictive Value (PPV), specificity and agreement were determined.

Institut de Recherche pour le Développement (IRD) data administrator (data@ird.fr).

Funding: This study was funded by the EDCTP2 programme supported by the European Union (grant number DRIA-2014-306-DITECT-HAT, VL). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Results

Over 29 months, 3433 clinical suspects were tested. The RDT positivity rate was 2.83%, HAT prevalence 0.06%. Individuals with sleep disturbances ($p < 0.001$), motor disorders ($p = 0.002$), convulsions ($p = 0.02$), severe weight loss ($p = 0.02$) or psychiatric problems ($p = 0.04$) had an increased odds (odds ratios 1.7–4.6) of being HAT RDT seropositive. Specificities ranged between 97.8%–99.6% for individual RDTs, and 93.3–98.9% for subsequent tests on dried blood spots. The PPV of the individual RDTs was below 14.3% (CI 2–43), increased to 33.3% (CI 4–78) for serial RDT combinations, and reached 67% for LAMP and ELISA/*Tbg* on RDT positives. Agreement between diagnostic tests was poor to moderate (Kappa ≤ 0.60), except for LAMP and ELISA/*Tbg* (Kappa = 0.66).

Conclusion

Identification of five key clinical symptoms and signs may simplify referral for HAT RDT screening. The results confirm the appropriateness of the diagnostic algorithm presently applied, with screening by SD Biotline HAT or HAT Sero-K-Set, supplemented with trypanolysis. ELISA/*Tbg* could replace trypanolysis and is simpler to perform.

Trial registration

ClinicalTrials.gov [NCT03356665](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03356665).

Author summary

As human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is approaching elimination, case management is progressively transferred from specialized teams to front line health care centres. This approach raises practical questions. What clinical symptoms and signs should trigger HAT testing? What rapid diagnostic tests (RDT) are suitable for screening? Which unconfirmed serological suspects should be examined further? During this study conducted in Côte d'Ivoire, individuals with sleep disturbances, motor disorders, convulsions, severe weight loss, or psychiatric problems were more often positive in RDTs. These symptoms and signs should trigger referral for HAT screening. Our results confirm appropriateness of the existing HAT screening strategy with SD Biotline HAT or HAT Sero-K-Set having specificities of 97.8% and 98.9%. Subsequent tests on dried blood spots from RDT positives were 93.3% to 98.9% specific, and increased the positive predictive value from below 15% up to 67%. For selection of RDT seropositives for additional parasitological examinations, trypanolysis on dried blood spots is suitable, but could be replaced by ELISA, which can be performed locally. The optimal diagnostic test algorithm for Côte d'Ivoire, in terms of cost-effectiveness, remains to be determined.

Introduction

Sleeping sickness, or human African trypanosomiasis (HAT), is a parasitic disease that is fatal if left untreated. This disease is caused by an extracellular protozoan of the *Trypanosoma brucei* (*Tb*) species, which is transmitted by the tsetse fly. Two subspecies are pathogenic to humans: *Tb gambiense* (*Tbg*) and *Tb rhodesiense* (*Tbr*), causing distinct disease entities. The chronic

HAT form, responsible for 98% of cases and endemic across Central and West Africa, is caused by *Tbg* [1,2]. HAT experienced an emergence / re-emergence phase with a peak number of 37,385 cases reported in 1998 [3]. Thanks to a very effective response, the number of cases decreased gradually, and HAT was included in the 2012 WHO roadmap on Neglected Tropical Diseases (NTDs), with the goal of elimination as a public health problem by 2020 [4]. With less than 1,000 cases reported since 2018, and an annual reduction of more than 40,000 km² in the area reporting more than 1 case / 10,000 peoples / year, this target could be considered to have been achieved [5]. In the new WHO NTD roadmap, *Tbg* HAT is targeted for interruption of transmission by 2030 [6].

Active case finding, carried out by mobile teams, has largely contributed to HAT reduction but is no longer cost effective in low prevalence contexts [7]. The integration of HAT diagnosis into the routine activities of peripheral health centers, or passive screening, becomes crucial but requires diagnostic tests and algorithms adapted to the limited resources of these centers [1]. Indeed, the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) [8] used by mobile teams for population screening is not suitable for passive case detection: it is manufactured in multiple dose vials which expire quickly once opened, the preservation of CATT requires a cold chain, and a 12 Volt rotator is needed for performing the test. Specialized equipment and electricity are often not available in peripheral health centers, while the number of persons presenting to be tested for HAT can be low and vials of antigen may therefore not be used before expiry [9,10].

The advent of rapid diagnostic tests (RDTs) for individual HAT serodiagnosis, that are stable at ambient temperature and can be performed without additional equipment [11–14], is an important step towards integrating HAT surveillance in fixed health care facilities [15]. Several immunological tests, such as trypanolysis [16] and Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay for *Tbg* (ELISA/*Tbg*) [17–19], and molecular tests, such as Loopamp *Trypanosoma brucei* Detection Kit (LAMP) [20,21,22] and real-time qPCR (RT-qPCR) [23–25], have also been developed for HAT diagnosis. While these serological and molecular assays are usually restricted to reference laboratories, they may still play a role in detecting the infection in pre-screened individuals [18,26].

Currently, little is known about the performance of diagnostic algorithms using RDTs in combination with additional serological and molecular tests for passive detection of suspected HAT cases requiring parasitological diagnosis. New, less toxic, oral drugs, efficient for all HAT stages [27,28] may offer opportunities for widened treatment of HAT suspects identified by RDT and/or other serological and molecular tests. Empirical data on the performance of different diagnostic algorithms are therefore needed to inform HAT surveillance, innovative case management and elimination efforts. The objectives of the present study were i) to determine the apparent prevalence of HAT in endemic foci of Côte d'Ivoire under passive surveillance; ii) to identify clinical symptoms and signs associated with RDT positivity and; iii) to assess the specificity, Positive Predictive Value (PPV) and agreement between the diagnostic tests used.

Methods

Ethics statement

This study corresponds to the Ivorian part of the DiTECT-HAT-WP2 multi-country diagnostic clinical trial (Diagnostic Tools for Human African Trypanosomiasis Elimination and Clinical Trials, work package 2, passive case detection, <https://www.ditect-hat.eu/>), which, before its implementation in Côte d'Ivoire received ethical clearance from the Advisory Committee on Deontology and Ethics (plenary meeting of 17–20 October 2016) of the French National Institute for Research on Sustainable Development (IRD), of the Institutional Review Board of the

Institute of Tropical Medicine in Antwerp Belgium (reference 1133/16), of the Ethics Committee of the University of Antwerp (Belgian registration number B300201730927) and of the National Research Ethics Committee, Ministry of Public Health and Hygiene in Côte d'Ivoire (reference 076 // MSH / CNER-kp). The DiTECT-HAT-WP2 project is registered on ClinicalTrials.gov, ID NCT03356665. Prior to inclusion, each potential study participant was informed about the objectives, conduct, benefits and risks of the study in the language of their choice in order to obtain written informed consent. For children, parents/legal guardians provided written informed consent agreeing to their children's participation in the study. In addition, assent was obtained from the participating minors.

Study area and inclusion and exclusion criteria. This study took place in 10 fixed health centers, including two centers for diagnosis and treatment (CDT) and eight serological screening site (SSS) in the Bonon and Sinfra endemic foci in west-central Côte d'Ivoire, as previously described [29]. From August 2017 to December 2019, patients who visited one of the selected fixed health centers were included in the study based on the following inclusion criteria: visitors or residents in a HAT endemic area and clinical suspicion of HAT based on one or more of the following clinical symptoms or signs: 1) long-term fever, resistant to antimalarial treatment, 2) headache for a long period (> 14 days), 3) presence of enlarged lymph nodes in the neck, 4) severe weight loss, 5) weakness 6) severe pruritus, 7) amenorrhea, abortion(s), or sterility, 8) psychiatric problems (aggressiveness, apathy, mental confusion, unusual increasing hilarity), 9) sleep disturbances (nocturnal insomnia and excessive daytime sleep), 10) motor disorders (abnormal movements, tremor, difficulty walking), 11) speech disorders, 12) convulsion, 13) coma. Individuals meeting any of the following criteria were excluded from the study: subjects previously treated for HAT; subjects refusing to sign the informed consent form; children <4 years.

Diagnostic procedure and sample collection. The diagnostic procedure is summarized in Fig 1. Following informed consent, 3 RDTs were performed from a blood sample taken by finger prick and using the blood transfer device of each test: SD Bioline HAT (Abbott Diagnostics, South Korea), HAT Sero-K-Set (Coris BioConcept, Belgium), and rHAT Sero-Strip (Coris BioConcept, Belgium). Tests were carried out in parallel and according to the manufacturer's instructions. Subjects negative to the 3 RDTs were considered free from HAT. Subjects that tested positive for at least one RDT were considered "serological suspects" and were referred for parasitological examinations at the CDT. From each serological suspect, venous blood was taken using heparin as anti-coagulant, to carry out the mini-anion exchange centrifugation technique (mAECT) [30] according to the manufacturer's instructions (INRB, Democratic Republic of Congo). If enlarged cervical lymph nodes were present, they were punctured to obtain fresh lymph, which was examined microscopically by direct examination at 10x40 magnification. In case of strong clinical suspicion, the CDT clinician could decide to perform a lumbar puncture for trypanosome detection in the cerebrospinal fluid by modified simple centrifugation [31]. HAT cases in whom trypanosomes were detected, were treated at the CDT according to the Ivorian national procedure implemented by the National Program for the Elimination of HAT (NPEHAT).

For every serological suspect two categories of dried blood spots (DBS) were prepared. For RT-qPCR, ELISA/*Tbg* and trypanolysis, a total of 16 individual drops, 30μL each, of heparinised blood were carefully deposited on a Whatman No 4 paper mounted on a drying rod. For LAMP, 180 μL of heparinised blood were mixed with 20 μL of 5% SDS solution (Sigma Aldrich) in an eppendorf tube. After 5 minutes of lysis, two drops of 40 μL of the mixture were deposited on Whatman No 1001 filter paper. The filter papers were left to dry, then placed in separate envelopes, which were inserted in hermetically sealed plastic bags containing silica gel.

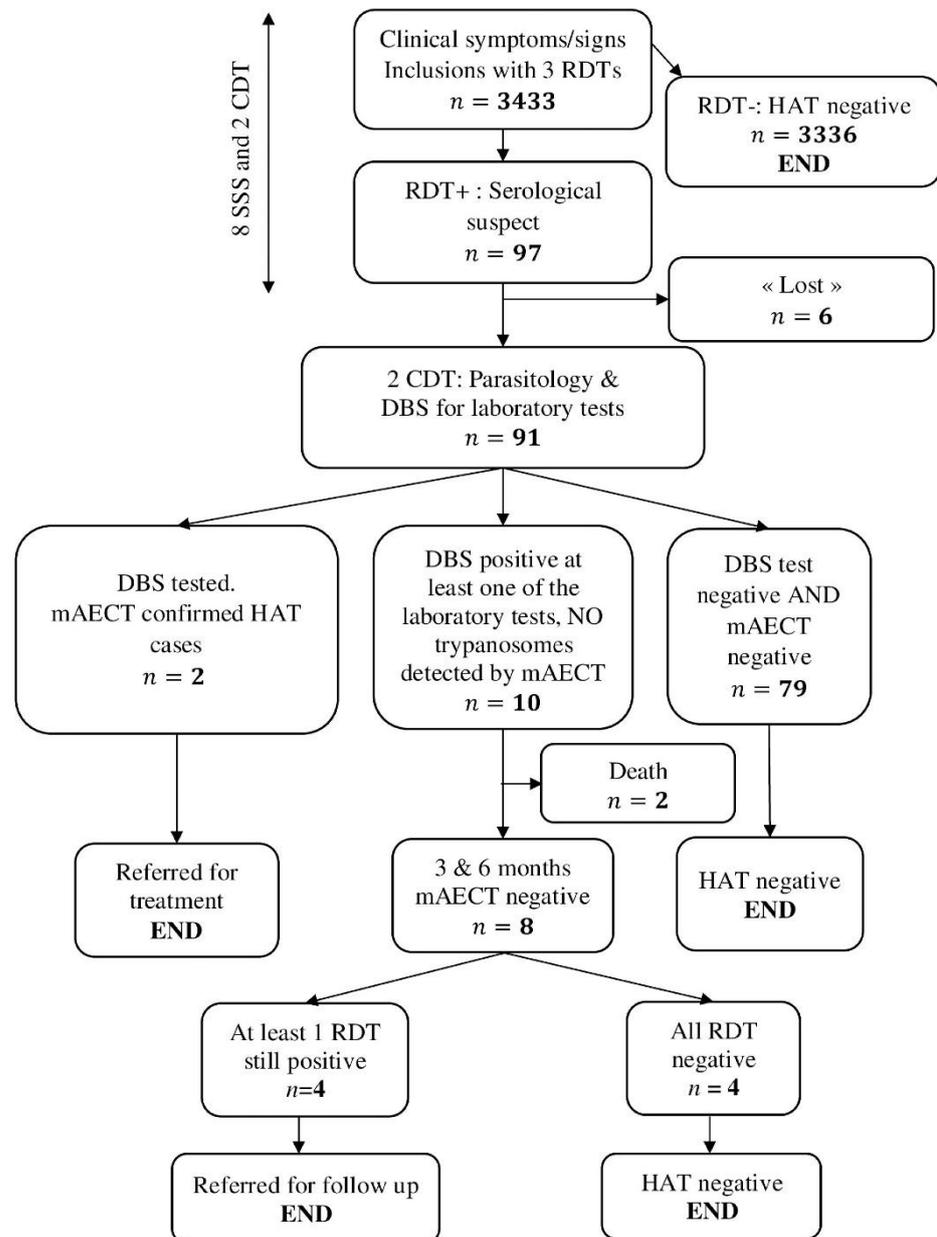


Fig 1. Flow chart of study participants with tests results. RDT rapid diagnostic test, HAT human African trypanosomiasis, SSS serological screening site, CDT centre for diagnosis and treatment, DBS dried blood spot, mAECT mini anion exchange centrifugation technique.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009656.g001>

The DBS were sent for analysis to the Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso). Antibodies were assessed with trypanolysis and ELISA/*Tbg*. The trypanolysis was carried out with 2 *Tbg* variable antigen types (LiTat 1.3 and LiTat 1.5) as previously described [16]. Trypanolysis was considered positive if at least one trypanosome variable antigen type was lysed for more than 50 percent. ELISA/*Tbg* was performed as previously described [19] with the following small modifications. Briefly, 6 mm confettis were punched out of the Whatman No 4 dried blood spots, and eluted with 720 μ L of PBS-Blotto-Tween buffer overnight at 4°C. The specimen was tested against a mixture of purified *Tbg* LiTat 1.3 and LiTat 1.5 variable surface glycoproteins, coated each at a concentration of 1 μ g/ml. The test result was considered positive when the percentage positivity of the test specimen was higher than 30, i.e. when the optical density (O.D.) obtained with a test sample was above 30% of the O.D. obtained with the positive control included in the plate. Molecular tests on DBS included LAMP (Eiken Chemical, Taito-ku, Tokyo, Japan), m18S-qPCR and, if the latter was positive, TgsGp-qPCR [25].

If the results of all four laboratory tests on DBS were negative, the serological suspect was considered free from HAT and no further follow-up parasitological examinations were performed. In the event that at least one of the four laboratory tests was positive, two visits, 3 months and 6 months after the date of inclusion, were carried out in order to repeat the parasitological examinations. At the last visit, the RDTs that were positive at inclusion were repeated. Serological suspects that had remained parasitologically negative and remained reactive in at least one RDT, were referred to the NPEHAT for further follow-up.

For each study participant, socio-demographic characteristics (residence, age, gender, contacts, date of visit, travel details) and details of inclusion symptoms were collected using an electronic questionnaire and stored in an electronic database. In the CDTs, pictures were taken from the RDT result, and if present, a short video of the trypanosome was recorded [32].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (version 4.0.2, R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria) via RStudio (Version 1.1.456–2009–2018 RStudio, Inc., Boston, MY). Descriptive statistics were carried out to summarize the characteristics of participants. Specifically, quantitative data were expressed as a median with range, while categorical variables were expressed as a frequency with percentage. The prevalence of HAT in the study population was calculated based on those testing positive on RDTs with parasitological confirmation in lymph, blood or cerebrospinal fluid.

Logistic regression analysis using the lme4 package in R was performed to identify clinical symptoms and signs associated with overall RDT positivity, and with positivity of each RDT separately. First, univariable analyses were carried out to screen variables based on their unconditional association with the four separate outcomes (overall RDT positivity; SD Bioline HAT positivity; HAT Sero-K-Set; rHAT Sero-Strip). Next, multivariable logistic regression models were built for each outcome using variables that were marginally significant (p -value < 0.1) in the univariable analysis, together with their 2-way interaction terms. Stepwise model selection was performed, and the model with the lowest Akaike information criterion (AIC) value was chosen as the final model for each outcome.

The results of the diagnostic tests were analysed to establish associations between all possible paired combinations of tests. Cohen's Kappa (K) coefficient [33] with its confidence intervals was used as a measure of agreement between each pair of tests, and the level of agreement was expressed in terms of positive and negative agreement indices [34], representing respectively the proportion of agreement observed for positive and negative test results using irr

package in R [35]. The interpretation of K was made according to Landis and Koch [36] (very bad agreement if $K < 0.00$; bad if $0.00 \leq K \leq 0.20$; moderate if $0.21 \leq K \leq 0.60$; good if $0.61 \leq K \leq 0.80$; excellent if $0.81 \leq K \leq 1.00$). The test specificity was estimated, after exclusion from the dataset of RDT-positive subjects that were lost to follow-up, as the number of test negatives in the non-HAT test population, over the total non-HAT test population. The non-HAT test population used as a denominator consisted of all subjects in whom no parasites were detected (including subjects that tested negative to the RDTs and were therefore not examined in parasitology). The PPV of each individual test, and combination of tests in series or parallel, was calculated. The degree of significance adopted was 5%. The confidence intervals (CI) were all calculated at 95%.

Results

Description of recruited patients and results of the diagnostic algorithm

Between August 2017 and December 2019, 3433 clinical suspects were screened with the three RDTs. In total, 1,606 (46.8%) inclusions were made in the Bonon focus and 1,827 (53.2%) in the Sinfra focus. The gender ratio of the study participants was 0.96 with 1,681 men and 1,752 women. Their median age was 37 years (IQR: 26–50). The clinical symptoms and signs are described in Table 1, with weakness, headache and fever being most common.

The flow chart in Fig 1 shows the results of the screening and laboratory tests. A total of 97 clinical suspects (2.83%, CI: 2.33–3.43) were positive on at least one RDT (59 detected at a SSS and 38 at a CDT). There was no significant difference in the proportion of serological suspects between Bonon and Sinfra foci ($p = 0.588$). Among the 59 serological suspects that were detected at one of the fixed health centers, six did not go to the CDT for the parasitological confirmation and DBS collection. The cervical lymph nodes present in 4 clinical suspects were

Table 1. Frequency of clinical symptoms and signs and their association with RDT positivity.

Clinical symptoms and signs	% frequency (number)	Univariable <i>p</i> -value	Multivariable OR (CI)	Multivariable <i>p</i> -value
Weakness	57.1 (1960)	0.897		
Headache (> 14 days)	50.4 (1730)	0.521		
Long-term fever	48.9 (1678)	0.220		
Sleep disturbances	26.2 (900)	< 0.001***	2.8 (1.9–4.3)	1^{-06***}
Severe weight loss	16 (550)	0.001**	1.7 (1.06–2.75)	0.02*
Severe pruritus	8.2 (283)	0.262		
Motor disorders	5.8 (200)	< 0.001***	2.7 (1.4–4.8)	0.002**
Amenorrhea, abortion(s), sterility	4.8 (165)	0.08 ^a		
Enlarged lymph nodes	3.6 (123)	0.771		
Psychiatric problems	2.5 (85)	< 0.001***	2.5 (0.97–9.5)	0.04*
Speech disorders	0.96 (33)	< 0.001***		
Convulsions	0.87 (30)	< 0.001***	4.6 (1.5–14.0)	0.02*
Coma	0.3 (11)	0.209		
Intercept			0.015 (0.01–0.02)	< $2^{-16}***$

OR: odds ratio; CI: confidence interval

***: high significance

***: moderate significance

*: slight significance

^a: analysis carried out only on women

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009656.t001>

small and could not be punctured. The 91 serological suspects were tested with mAECT and trypanosomes were detected in two individuals.

Of the 91 DBS of serological suspects sent to the reference laboratory, 12 samples were positive for at least one of the laboratory tests (details discussed below), including the two confirmed cases of HAT. Two serological suspects with positive laboratory test results died. The remaining eight serological suspects were parasitologically re-examined twice, but no cases were parasitologically positive at these follow-ups. At the second follow-up visit, four of the serological suspects were still positive in an RDT and they were sent to the NPEHAT for follow-up. The remaining four had become negative to all the RDTs and were declared free of HAT. The prevalence of confirmed HAT in the participating clinical suspects was therefore 0.06% (CI 0.02–0.2%).

Detailed test results for 12 seropositive, laboratory test positive participants

Detailed results are shown in Table 2. The two HAT patients were adolescents, a girl (11 years old) and a boy (13 years old). The girl presented with terminal HAT and clinical symptoms and signs included weight loss, weakness, psychiatric problems, sleep disturbances, motor disorders, convulsions, and speech disorders. Her physical condition and diagnostic pathway are described in more detail elsewhere [29]. The boy presented with fever and sleep disturbances. Both HAT patients tested positive in all 3 RDTs, and trypanosomes were demonstrated in their blood by mAECT. After analysis of their CSF, they were both classified as stage 2 *Tbg* patients since trypanosomes were found in the girl's CSF with a cytorachia of 160 cells/mm³, while a cytorachia of 240 cells/mm³ was observed for the boy. They were treated with nifurtimox eflornithine combination therapy as recommended by the national procedure. Both HAT patients were ELISA/*Tbg*, trypanolysis, and LAMP positive. The boy was positive in m18S-qPCR, but TgsGP-qPCR negative.

Table 2. Detailed test results and outcome of 12 RDT positive, laboratory test positive study participants.

Status	Gender/age	HAT Sero-K-Set	rHAT Sero-Strip	SD Bioline HAT	Trypanolysis LiTAT 1.3	Trypanolysis LiTAT 1.5	ELISA/ <i>Tbg</i>	LAMP	m18S-qPCR	TgsGP-qPCR
HAT	M/13	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HAT	F/11	+	+	+	+	-	+	+	-	ND
Death	M/28	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Death	F/20	+	+	+	+	+	-	-	-	ND
Seropositive, DBS+	M/27	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Seropositive, DBS+	M/53	+	-	-	+	+	+	-	-	ND
Seropositive, DBS+	F/36	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Seropositive, DBS+	M/71	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Seroconverter, DBS+	F/52	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Seroconverter, DBS+	F/6	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Seroconverter, DBS+	F/35	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Seroconverter, DBS+	M/38	+	-	-	+	-	-	-	-	ND

HAT: human African trypanosomiasis; DBS: dried blood spot; M: male; F: female; ND: not done; (-): RDT result after 6 months; +: positive; -: negative

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009656.t002>

The two deceased participants were a woman and a man aged 20 and 28 respectively; both had fever, headache, weight loss, weakness, sleep disturbances, motor disorders, and speech disorders. In addition, the man suffered from pruritus, the woman from psychiatric problems and convulsions. The man was positive for HAT Sero-K-Set and rHAT Sero-Strip, but remained negative in mAECT at inclusion. He died a few days later. His DBS turned out to be positive in trypanolysis, LAMP and m18S-qPCR. The woman was positive for all RDTs but was mAECT negative. As she was trypanolysis positive, she was requested to attend a follow-up visit 3 months later, on which mAECT remained negative. Taking into account her clinical presentation, lumbar puncture was performed but CSF was normal. The woman refused the next follow-up visit, and eventually died.

The remaining eight individuals presented with fever ($n = 4$), sleep disturbance ($n = 4$), headache ($n = 3$), weakness ($n = 3$), weight loss ($n = 1$), motor disorders ($n = 1$), and convulsion ($n = 1$). All eight were positive in HAT Sero-K-Set, three in SD Bioline HAT, and one in rHAT Sero-Strip. They were all mAECT negative at inclusion. For 6 seropositives the DBS was positive for m18S-qPCR but negative for TgsGP-qPCR, while trypanolysis and ELISA/*Tbg* were positive in respectively 3 and one individual. No-one was LAMP positive. All 8 remained mAECT negative at the 3- and 6-month follow-up examinations. At the 6 month follow-up visit, however, 4 individuals had seroconverted in the initially positive RDT(s), while 4 others maintained their HAT Sero-K-Set positivity.

Clinical symptoms and signs as a predictor of being a serological suspect

Neither age ($p = 0.149$), nor gender ($p = 0.918$) were associated with being a serological suspect. Univariable analysis of clinical symptoms and signs in the study population showed that 6 out of 13 inclusion symptoms and signs (sleep disturbances, severe weight loss, motor disorders, psychiatric problems, convulsions and speech disorders) were significantly associated with positivity for at least one of the RDTs (Table 1). These six clinical symptoms and signs were therefore included in the multivariable regression model.

Stepwise model selection (Table 1), indicated that the best fitting and most parsimonious model (AIC = 841.86) was the one containing five clinical symptoms and signs: sleep disturbances, motor disorders, convulsions, severe weight loss, and psychiatric problems. The highest odds ratio was for convulsions, with the model indicating that the odds of a clinical suspect with convulsions testing positive on at least one RDT was 4.6 times higher (1.5–14.0, $p = 0.02$) than the odds of a clinical suspect without convulsions.

Univariable analysis for the three RDTs separately indicated that positivity to one of the RDTs was statistically significantly ($p < 0.001$) associated with positivity to another RDT (S1 Table). The number of clinical symptoms and signs significantly associated with positivity to each RDT ranged between three and five, and these were the same identified as being associated with overall RDT positivity; sleep disorders and convulsions were significantly associated with positivity to each of the three RDTs (S2 Table).

Performance of diagnostic tests and agreement between tests

When multiple diagnostic tests are available, combinations of tests can be interpreted in parallel (an individual who is positive on any one of the tests is considered a positive result) or in series (all tests must be positive for an individual to be considered positive). As indicated in Table 3, the HAT Sero-K-Set test reported the highest positivity rate (2.5%, CI: 2.0–3.1%) among the 3 RDTs. Samples testing positive with the m18S-qPCR were all negative for TgsGp-qPCR.

Table 3. Performance of the different rapid diagnostic tests for HAT using the parasitological test as gold standard.

Diagnostic test	Total positive	Positivity rate (95% CI)	Specificity (95% CI) ^{a,b}	PPV (95% CI) ^b
SD Bioline HAT	43	1.3 (0.9–1.7)	98.9 (98.5–99.2)	4.9 (1–17)
HAT Sero-K-Set	85	2.5 (2.0–3.1)	97.8 (97.2–98.2)	2.5 (0–9)
rHAT Sero-Strip	14	0.4 (0.2–0.7)	99.6 (99.4–99.8)	14.3 (2–43)
All RDTs (in parallel)	97	2.8 (2.3–3.4)	97.2 (96.6–97.7)	2.2 (0–8)
All RDTs (in series)	6	0.2 (0.1–0.4)	99.9 (99.7–100)	33.3 (4–78)
HAT Sero-K-Set- rHAT Sero-Strip (parallel)	85	2.5 (2.0–3.1)	97.8 (97.2–98.2)	2.5 (0–9)
HAT Sero-K-Set- SD Bioline HAT (parallel)	97	2.8 (2.3–3.4)	97.2 (96.6–97.8)	2.2 (0–8)
rHAT Sero Strip- SD Bioline HAT (parallel)	51	1.5 (1.2–2.0)	98.6 (98.2–99.0)	4.1 (0–14)
HAT Sero-K-set + rHAT Sero Strip (series)	14	0.4 (0.2–0.7)	99.6 (99.4–99.8)	14.3 (2–43)
HAT Sero-K-set + SD Bioline (series)	31	0.9 (0.6–1.3)	99.2 (98.9–99.5)	6.9 (1–23)
rHAT Sero Strip + SD Bioline HAT (series)	6	0.2 (0.1–0.4)	99.9 (99.7–100)	33.3 (4–78)

^a: denominator of 3425 for RDTs

^b: 6 lost individuals excluded for these calculations (4 positive in HAT Sero-K-Set only, and 2 positive in HAT Sero-K-Set + SD Bioline HAT)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009656.t003>

The specificities of the RDTs ranged from 97.2% (parallel combination) to 99.9% (serial combination). For these calculations, the 6 lost individuals were excluded (4 positive in HAT Sero-K-Set only, and 2 positive in HAT Sero-K-Set + SD Bioline HAT). Of the 3 RDTs, rHAT Sero-Strip was the most specific with 99.6% (3413/3425, CI 99.4–99.8%). The cassette-based RDTs were slightly less specific, with the SD Bioline HAT (98.9%; CI 98.5–99.2%) being more specific than the HAT Sero-K-Set (97.8%; CI 97.2–98.2%). The series combinations of all the RDTs and rHAT Sero-Strip + SD Bioline HAT had the highest specificity (3421/3425, 99.9%; CI: 99.7–100%). Among the laboratory tests performed on the 91 RDT seropositives (Table 4), specificities ranged from 93.3% to 98.9%, disregarding TgsGp-qPCR. LAMP and ELISA/Tbg had the highest specificity of 98.9% (88/89, CI: 93.9–99.9%). Sensitivity was not calculated.

The PPV of the tests was evaluated as the ability to predict HAT (Table 3). The estimated PPV for the RDTs was generally low, with the highest PPV being 33% (2/6, 95% CI 4–78%) for both the 'in series' interpretation of all three RDTs and the 'in series' interpretation of rHAT Sero-Strip and SD Bioline HAT. The 'in-series' addition of the HAT Sero-K-Set did not improve the PPV. The laboratory tests, performed on RDT pre-screened samples, had PPVs ranging from 25 (2/8, CI 4–89%) for m18s-qPCR, to 67% (2/3, CI 9–99%) for LAMP and ELISA/Tbg (Table 4).

Table 4. Performance of laboratory tests performed on dried blood spots of RDT seropositive subjects for diagnosis of HAT, using the parasitological test as gold standard.

Diagnostic test	Total positive	Positivity rate (95% CI)	Specificity (95% CI) ^a	PPV (95% CI)
Trypanolysis	7	7.7 (3.8–15)	94.4 (87.4–98.1)	29 (4–71)
LAMP	3	3.3 (1.1–9.3)	98.9 (93.9–99.9)	67 (9–99)
ELISA/Tbg	3	3.3 (1.1–9.3)	98.9 (93.9–99.9)	67 (9–99)
m18s-qPCR	8	8.8 (4.5–16.4)	93.3 (85.7–97.5)	25 (4–89)
TgsGp-qPCR	0	0	1 (0.96–1)	—

^a: denominator of 89 (except for TgsGp-qPCR which had a denominator of 8)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009656.t004>

Table 5. Agreement between HAT Sero-K-Set, rHAT Sero-Strip, SD Bioline HAT, trypanolysis, ELISA/Tbg and LAMP.

	SD Bioline HAT		rHAT Sero-Strip		Trypanolysis		ELISA/Tbg		m18S-qPCR		LAMP	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
HAT Sero-K-Set												
Pos	31	54	15	70	7	72	3	76	8	71	3	76
Neg	12	3336	0	3348	0	12	0	12	0	12	0	12
Kappa (CI)	0.47 (0.36; 0.58)		0.27 (0.16; 0.39)		0.02 (0.00; 0.05)		0.01 (-0.03; 0.02)		0.03 (0.00; 0.05)		0.01 (-0.03; 0.02)	
SD Bioline HAT												
Pos			7	36	4	36	2	38	4	36	2	38
Neg			8	3382	3	48	1	50	4	47	1	50
Kappa (CI)			0.20 (0.06; 0.30)		0.04 (-0.08; 0.17)		0.03 (-0.05; 0.12)		0.02 (-0.11; 0.15)		0.03 (-0.05; 0.12)	
rHAT Sero-Strip												
Pos					4	11	2	13	3	12	3	12
Neg					3	73	1	75	5	71	0	76
Kappa (CI)					0.29 (0.02; 0.56)		0.18 (-0.06; 0.42)		0.16 (-0.08; 0.41)		0.29 (0.03; 0.56)	
Trypanolysis												
Pos							3	4	3	4	3	4
Neg							0	84	5	79	0	84
Kappa (CI)							0.58 (0.22; 0.95)		0.35 (0.02; 0.68)		0.58 (0.22; 0.95)	
ELISA/Tbg												
Pos									1	3	2	1
Neg									7	81	1	87
Kappa (CI)									0.14 (-0.17; 0.45)		0.66 (0.21; 1.10)	
m18S-qPCR												
Pos											2	6
Neg											1	82
Kappa (CI)											0.33 (-0.03; 0.70)	

Kappa values are in bold, CI: confidence interval; Pos: positive; Neg: negative

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009656.t005>

Table 5 details the agreement between tests. The kappa coefficient for the RDTs was calculated on 3433 RDT results. Agreement between the 3 RDTs was moderate for each 2-way comparison. Kappa coefficients were calculated between the laboratory tests and between laboratory and RDT results on the 91 available results. Agreement between the RDTs and the laboratory tests showed an overall poor agreement, except for trypanolysis and rHAT Sero-Strip which had moderate agreement ($K = 0.3$; CI 0.02–0.6). Laboratory tests showed moderate agreement, except for ELISA/Tbg and LAMP tests which had a good level of agreement ($K = 0.7$; CI: 0.2–1.1).

Discussion

The low *Tbg* HAT prevalence observed in passive screening in Central-West in Côte d'Ivoire can be considered a strength. Sporadic HAT occurrence was expected: the annual number of HAT cases reported since 2009 has always been below 10 [37], and low prevalence were

reported in previous studies [38,39]. Côte d'Ivoire presents characteristics of having eliminated HAT as a public health problem [5], evolving towards zero transmission. Côte d'Ivoire was therefore considered as a model for the West-African region where adapted diagnostic algorithms for passive case detection and disease surveillance are highly relevant. Previous prospective RDT evaluation studies however have all been carried out in Central Africa [11,12,14,40]. The 0.06% prevalence we observed contrasts with the 1.13% prevalence observed in passive case detection in a previous phase 3 study conducted in Democratic Republic of the Congo (DR Congo) [11]. However, with only two HAT cases confirmed in the present study, extreme care should be taken with interpretation of diagnostic test sensitivity, which was therefore not calculated; this can be considered as a limitation of the study.

The most important strength of the present study is the prospective parallel evaluation, for the first time, of all available RDTs for diagnosis of HAT. Previous prospective studies evaluated either RDTs produced by Standard Diagnostics [11,12], or by Coris BioConcept [14,40]. Only one study compared RDTs of both test producers on stored plasma originating from West-Africa [41]. An additional strength is the parallel examination of DBS in 4 different laboratory tests: trypanolysis, ELISA/*Tbg*, LAMP and qPCR. Dried blood spot testing of seropositive unconfirmed subjects to select individuals for additional parasitological follow-up has previously been performed either with serology, in trypanolysis and/or ELISA/*Tbg* [16,19], or with molecular tests [12]. So far, LAMP has been mainly applied in the field on seropositive microscopy negative subjects, to compensate for the imperfect sensitivity of microscopy [26,42]. Serological and molecular tests have rarely been performed in parallel [24].

Unfortunately, the study set-up has some inherent weaknesses. First, individuals without one of the 13 clinical inclusion symptoms and signs for HAT were not included. Some true HAT patients might have been missed, in particular first stage patients with mild symptoms. This limitation is inherent to the passive case detection setting. In the present study, we indeed only picked up patients with severe late stage HAT, which were probably infected long ago.

On the other hand, we cannot guarantee that all individuals presenting at the health centre with one of the 13 clinical symptoms and signs for inclusion were effectively included. Although we tried to sensitize the majority of the health staff working in the study sites, HAT is perceived as a disease from the past in Côte d'Ivoire, and many health professionals are unaware of it, even in endemic foci [29]. Furthermore, we assumed that clinical suspects negative in all 3 RDTs did not suffer from HAT, so they were not examined neither parasitologically nor in the four laboratory tests. Although sensitivity of the individual RDTs might be lower than 100%, we assumed that a combination of 3 RDTs would detect different serological profiles, and bring sensitivity close to 100%. This approach might result in an overestimation of the specificity of the RDTs, as triple RDT negative HAT cases were considered non-HAT, but taking into account the very low HAT prevalence in Côte d'Ivoire, the effect is likely to be small. Previous prospective trials [11,12] also did not perform parasitology systematically on all RDT or CATT negatives. Reasons are the strong increase in costs, infrastructural requirements (8/10 health centres were not equipped to do parasitology), and work load, which was already experienced to be high by the health personnel due to administrative and ethical aspects of the diagnostic trial. A similar limitation is that we considered participants who tested negative in all laboratory tests as non-HAT, and such subjects were therefore classified as false RDT positives.

Two other serological screening tests for HAT were not performed in this study. A promising additional RDT, SD Bioline HAT 2.0, based on recombinant LiTat 1.5 VSG and ISG 65 antigens, would be more sensitive than SD Bioline HAT [11]. Unfortunately, the test remained unavailable for the whole study duration. Although parallel screening with CATT might theoretically have been interesting, also for comparison with previous diagnostic studies

[11,12,14,40], it was considered irrelevant for passive screening. Indeed, with 3433 participants in 10 centres over 29 months, on average 12 tests/centre/month were performed, which would have implied considerable waste of CATT reagent, in particular in centres not able to store the reagent in the fridge. Attendance rates and test use of health centres offering HAT diagnosis in some HAT endemic areas can be extremely low [43].

The imperfect sensitivity of mAECT implies that parasitological confirmation in some RDT true positives might have been missed. However, RDT positives that were positive in the laboratory tests were followed up with two additional parasitological examinations wherever possible. We therefore made a strong effort to confirm RDT positives. Unfortunately, two seropositive laboratory test positive participants died without receiving the complete parasitological follow-up. They might have been HAT patients. As previously described, different mAECT examinations might be necessary for confirmation [29]. For the same reason, study participants who were followed up and remained RDT positive until the end of the study might have been real cases, and were therefore referred to the NEPHAT for follow-up.

The present study obtained a high referral rate of RDT seropositives to parasitology. Indeed, 53/59 (89.8%) of RDT seropositives detected at the fixed health centres (SSS) where parasitological examination was not available, attended the onwards parasitological confirmation step at the level of the CDT. This is slightly more than proportions reported elsewhere [26]. In passive screening in Kongo Central in DR Congo however, only 39.9% of RDT positives referred for confirmatory testing to the CDT completed their referral [42]. Although the latter authors do not exclude that the group that did not complete the diagnostic examinations might have contained HAT cases, they considered it probable that most lost seropositives would have had a self-limiting illness and recovered. The 6 "lost" seropositives had relatively mild symptoms (mainly weakness, headache and fever, sleep disturbance for one), and tested positive in one or maximally two RDTs. Poor communication by the health personnel about HAT RDTs also has been highlighted as a reason for non-completion [43]. In the present study in Côte d'Ivoire, regular meetings with the country study coordinators might have improved understanding and motivation of the health personnel, resulting in better efforts in communication towards study participants. Active tracing of RDT positives not showing up for confirmation parasitology was carried out, and they were encouraged to go to the CDT.

Selection of 13 inclusion symptoms and signs for the actual study was based on the WHO guidelines for passive surveillance. For all study participants, presence of these symptoms and signs was systematically recorded. Although the frequency of clinical symptoms and signs in *Tbg* HAT patients has been described previously [44–48], clinical criteria with increased odds for a positive RDT or for HAT in a population visiting the hospital have been rarely studied. Application of simple clinical algorithms facilitates selection of individuals to be tested for HAT. Such an algorithm to select individuals for RDT testing, could in Côte d'Ivoire be based on presence of sleep disturbances, motor disorders, convulsions, severe weight loss or psychiatric problems. The absence of enlarged cervical lymph nodes, in particular in all 12 individuals with HAT or with high suspicion of HAT, was remarkable since it is considered typical for HAT and was the most frequent sign observed in 86.3% of HAT patients in the neighbouring focus of Daloa [44]. In South Sudan, syndromic referral algorithms consisting of sleep problems, neurological problems, weight loss and/or a history of oedema would best identify HAT among a treatment-seeking population [49]. Whether the same clinical criteria to select RDT seropositives would be appropriate in other HAT endemic countries remains to be confirmed.

Our specificity estimates of 98.9% for SD Bioline HAT and 97.8% for HAT Sero-K-Set in Côte d'Ivoire approach specificities previously reported for those tests in prospective trials in Central Africa. For SD Bioline HAT, specificities of 94.6% and 98.8% have been reported previously [11,12], while the latter also reports a slightly lower 96.7% specificity value in passive

case detection. Specificity values reported previously from DR Congo for HAT Sero-K-Set were 98.6 and 97.0% [14,40]. Specificities of around 88%, observed with SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set using stored plasma from West-Africa [41], were lower. For the laboratory tests, specificities reported previously in DR Congo were 99.8% for ELISA/*Tbg* on DBS [19], and 98.0% for trypanolysis on serum [14]. The specificity of ELISA/*Tbg* and trypanolysis in the present study, of respectively 98.9% and 94.4%, are probably underestimated, as these tests were carried out on RDT positives only, which partially rely on the same antigens, *Tbg* LiTat 1.3 and 1.5 VSGs, for antibody detection. This does not apply to the molecular tests, for which the 98.9% specificity observed in the present study compares well with LAMP specificities of 92.8% and 96.4% observed in a laboratory study on extracted DNA [50].

The PPV and agreement of most tests was relatively low, compared to previous observations, driven strongly by the underlying low prevalence in the Bonon and Sinfra foci. In DR Congo, the PPV of SD Bioline HAT in passive case detection was 14.4% [42], while among patients with neurological disorders, the PPV of HAT Sero-K-Set was 50% [40], for HAT prevalences of respectively 0.1–0.8% and 2.9%. We observed PPVs for these RDTs of 4.9% and 2.5%, and 14.3% for rHAT Sero-Strip. For the laboratory tests, PPVs were between 29 and 67%, but these tests were performed on a RDT positive population, therefore pre-selecting a higher prevalence population (2 out of 91 seropositives or 2.4%). As a result of the elevated specificity of the tests in combination with the low HAT prevalence, the confidence intervals from the PPV were however wide. Similarly, the agreement between RDTs was rather low. The sensitivity of the kappa coefficient to prevalence results in an "abnormally low" Kappa value [51]. Also the agreement between the RDTs and the laboratory tests ranged from low to moderate, which might be due to the fact that not all the tests are based on the same biological principle. Good agreement was found between two laboratory tests (ELISA/*Tbg* and LAMP), suggesting that these two techniques have more consistent results and that potentially only one of the two tests could be used in a future diagnostic algorithm.

Four subjects were RDT positive, laboratory tests positive and mAECT negative, but sero-converted to RDT negative by the end of the trial. At the end of the study, however, 4 subjects remained RDT positive, laboratory test positive, yet were parasitologically unconfirmed after 3 mAECT tests. In addition 2 subjects died, and we cannot confirm nor exclude that they had HAT. The four remaining RDT positive individuals remain under continued follow-up to exclude the risk that they would act as aparasitemic serological suspects becoming asymptomatic carriers [52–54], who may act as a human parasite reservoir and can maintain transmission. We cannot exclude that RDT positive laboratory test positive individuals might carry trypanosomes, including in the brain or skin [55].

Future treatment regimens with an improved safety profile may open up the possibility of treating such highly suspect cases, without parasitological confirmation [28]. The diagnostic criteria to identify these highly suspicious cases will be an important next step in the fight against HAT. However, test positivity could possibly also be explained by a transient infection with animal trypanosomes. Animal trypanosome infection rates of cattle and pigs in the foci of Bonon and Sinfra, where the present study took place, are quite high [56]. Infected tsetse flies may also bite humans and during the bite, inject animal trypanosomes, which might elicit an antibody response and false positivity in serological tests, or transient false positivity in molecular tests which are *Trypanozoon* specific, such as m18S-qPCR. The *Tbg* specific TgsGP-qPCR, which was carried out on all m18S-qPCR positive DBS, was always negative, including in the 2 confirmed HAT patients. With its limited sensitivity [25], this test does not seem to be helpful in detecting *Tbg* HAT.

The present study has some practical impacts for HAT control in Côte d'Ivoire. It has initiated the set-up of a passive case detection network in the country. This passive screening

network is now being enlarged through other projects [57]. The intention is to maximally cover known HAT foci, and, taking into account the mobility of the population, also include key health structures in non-endemic districts which might be frequented by HAT cases seeking for care [29]. Furthermore, the study allowed passive screening of 3433 individuals for HAT in the last 2 HAT endemic districts in Côte d'Ivoire and contributed to the elaboration of a WHO dossier for validation of HAT elimination as a public health problem in Côte d'Ivoire. This underlines again that participation to clinical research can contribute to strengthening of health systems, as previously described for DR Congo [58].

Despite the limitations of the current study, some practical recommendations can be derived. The list of clinical symptoms and signs for selection of clinical suspects to be screened for HAT RDT testing in Côte d'Ivoire might be reduced to 5 key clinical signs, possibly extended with presence of enlarged cervical lymph nodes, which is known to be suggestive for HAT, and if confirmed in other project countries with higher HAT prevalences. The results also confirm the appropriateness of the diagnostic test algorithm that is presently applied in routine in Côte d'Ivoire. Serological screening can be performed with any of the three commercially available RDTs. For RDT positive subjects, the actual algorithm depends on on-site availability of parasitology. Seropositives are either directly examined in parasitology and if HAT is not confirmed, a DBS is taken for further testing with trypanolysis to decide on follow-up. Alternatively, if parasitology is not immediately available, a DBS can first be taken and tested in trypanolysis or ELISA/*Tbg*, two methods that were recently implemented at the national HAT diagnosis reference laboratory of Institut Pierre Richet, Bouaké. In that case, if the DBS is positive, specific actions can be initiated for the individuals to undergo parasitology.

Some open questions and topics for future research remain. The current study does not yet determine the optimal diagnostic algorithm for passive case detection in terms of sensitivity, specificity and cost-effectiveness. Further analysis of the study results, including results from other countries is therefore indicated. Combining results from different test populations will allow estimation of the diagnostic sensitivity and specificity in the absence of a gold standard using latent class analysis [59]. The next step is the cost-effectiveness analysis, allowing to choose the most appropriate HAT diagnostic test algorithm for the Ivorian context.

Supporting information

S1 Table. Univariable associations between the explanatory variables of interest and positivity with each of the three Rapid Diagnostic Tests used in this study.

(DOCX)

S2 Table. Multivariable logistic regression models for associations between clinical symptoms and signs and positivity with each of the three Rapid Diagnostic Tests.

(DOCX)

Acknowledgments

We acknowledge all technicians from the HAT teams of Institut Pierre Richet in Bouaké, University Jean Lorougnon Guédé in Daloa, Projet de Recherches Cliniques sur la Trypanosomiase in Daloa, Centre de Santé Urbain in Bonon, Hôpital Général in Sinfra, Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en Zone Subhumide, in Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) and of the HAT National Elimination Program. We also acknowledge all health agents involved in the HAT passive surveillance in the Bonon and Sinfra HAT foci. Thanks to Fadhila Le Meur and Oscar Yao Attoungbré for administrative assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Jacques Kaboré, Eric Fèvre, Philippe Büscher, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Data curation: Charlie Franck Alfred Compaoré.

Formal analysis: Lian Francesca Thomas, Laura Cristina Falzon, Charlie Franck Alfred Compaoré, Eric Fèvre.

Funding acquisition: Dramane Kaba, Philippe Solano, Eric Fèvre, Philippe Büscher, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Investigation: Minayégninrin Koné, Mathurin Koffi, Cyrille Mambo Kouamé, Charlie Franck Alfred Compaoré, Emmanuel Kouassi N'Gouan, Philippe Büscher, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Methodology: Minayégninrin Koné, Jacques Kaboré, Cyrille Mambo Kouamé, Bernardin Ahouty, Charlie Franck Alfred Compaoré, Emmanuel Kouassi N'Gouan, Eric Fèvre, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Project administration: Dramane Kaba, Philippe Solano, Veerle Lejon, Vincent Jamonneau.

Software: Minayégninrin Koné, Lian Francesca Thomas, Laura Cristina Falzon.

Supervision: Jacques Kaboré, Mathurin Koffi, Veerle Lejon.

Writing – original draft: Minayégninrin Koné, Lian Francesca Thomas, Vincent Jamonneau.

Writing – review & editing: Dramane Kaba, Jacques Kaboré, Laura Cristina Falzon, Mathurin Koffi, Bernardin Ahouty, Charlie Franck Alfred Compaoré, Emmanuel Kouassi N'Gouan, Philippe Solano, Eric Fèvre, Philippe Büscher, Veerle Lejon.

References

1. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol.* 2014; 6: 257–75. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728> PMID: 25125985
2. World Health Organization. Human African Trypanosomiasis (sleeping sickness) 2020. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)).
3. Simarro PP, Jannin J, Cattand P. Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next? *PLoS Med.* 2008; 5: e55. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050055> PMID: 18303943
4. World Health Organization. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation: executive summary. 2012. 1–22. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70809>.
5. Franco JR, Cecchi G, Priotto G, Paone M, Diarra A, Grout L, et al. Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis at continental and country level: Update to 2018. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14: e0008261. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008261> PMID: 32437391
6. WHO. Ending the Neglected to Attain the Sustainable Development Goals: A Roadmap for Neglected Tropical Diseases 2021–2030. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020. Available from: <https://reliefweb.int/report/world/ending-neglect-attain-sustainable-development-goals-roadmap-neglected-tropical>.
7. Mulenga Cilundica P, Chengé F, Boelaert M, Mukalay A, Lutumba P, Lumbala C, et al. Integration of Human African Trypanosomiasis Control Activities into Primary Healthcare Services: A Scoping Review. *Am J Trop Med Hyg.* 2019; 101: 1114–1125. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0232> PMID: 31482788
8. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belge Med Trop.* 1978; 58: 169–176.

9. Mitashi P, Hasker E, Mbo F, Geertruyden J, Kaswa M, Lumbala C, et al. Integration of diagnosis and treatment of sleeping sickness in primary healthcare facilities in the Democratic Republic of the Congo. *Trop Med Int Health*. 2015; 20: 98–105. <https://doi.org/10.1111/tmi.12404> PMID: 25329353
10. Mulenga Cilundica P, Lutumba P, Coppieters Y, Mpanya A, Mwamba-Miaka A, Luboya E, et al. Passive screening and diagnosis of sleeping sickness with new tools in primary health services: an operational research. *Infect Dis Ther*. 2019; 8: 353–367. <https://doi.org/10.1007/s40121-019-0253-2> PMID: 31309434
11. Lumbala C, Biéler S, Kayembe S, Makabuza J, Ongarello S, Ndung'u JM. Prospective evaluation of a rapid diagnostic test for *Trypanosoma brucei gambiense* infection developed using recombinant antigens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12: e0006386. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006386> PMID: 29590116
12. Bisser S, Lumbala C, Nguertoum E, Kande V, Fievaud L, Vatunga G, et al. Sensitivity and Specificity of a Prototype Rapid Diagnostic Test for the Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* Infection: A Multi-centric Prospective Study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10: e0004608 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004608> PMID: 27058033
13. Büscher P, Gilman Q, Lejon V. Rapid diagnostic test for sleeping sickness. *N Engl J Med*. 2013; 368: 1069–1070. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1210373> PMID: 23484849
14. Büscher P, Mertens P, Leclipteux T, Gilman Q, Jacquet D, Ngoyi DM, et al. Sensitivity and specificity of HAT Sero-K-Set, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a case-control study. *Lancet Glob Health*. 2014; 2: e359–e363. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70203-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70203-7) PMID: 25103304
15. Jamonneau V, Bucheton B. The challenge of serodiagnosis of sleeping sickness in the context of elimination. *Lancet Glob Health*. 2014; 2: e306–e307. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70226-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70226-8) PMID: 25103289
16. Camara O, Camara M, Lejon V, Ilboudo H, Sakande H, Léno M, et al. Immune trypanolysis test with blood spotted on filter paper for epidemiological surveillance of sleeping sickness. *Trop Med Int Health*. 2014; 19: 828–831. <https://doi.org/10.1111/tmi.12316> PMID: 24750463
17. Ruitenbergh EJ, Buys J. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Am J Trop Med Hyg*. 1977; 26: 31–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.31> PMID: 320895
18. Mumba D, Bohorquez E, Messina J, Kande V, Taylor SM, Tshetu AK, et al. Prevalence of human African trypanosomiasis in the democratic Republic of the Congo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5: e1246. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001246> PMID: 21829736
19. Hasker E, Lutumba P, Mumba D, Lejon V, Büscher P, Kande V, et al. Diagnostic accuracy and feasibility of serological tests on filter paper samples for outbreak detection of *T. b. gambiense* human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83: 374–379. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0735> PMID: 20682885
20. Njiru ZK, Mikosza ASJ, Matovu E, Enyaru JCK, Ouma JO, Kibona SN, et al. African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int J Parasitol*. 2008; 38: 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.006> PMID: 17991469
21. Njiru ZK, Traub R, Ouma JO, Enyaru JC, Matovu E. Detection of group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 1530–1536. <https://doi.org/10.1128/JCM.01817-10> PMID: 21307218
22. Njiru ZK, Mbae CK, Mburugu GN. Loop-Mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma gambiense* Group 1 with stem primers: A molecular xenomonitoring test for sleeping sickness. *J Trop Med*. 2017; 2017: 8630708. <https://doi.org/10.1155/2017/8630708> PMID: 28321260
23. Becker S, Franco JR, Simarro PP, Stich A, Abel PM, Steverding D. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50: 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.07.001> PMID: 15541605
24. Mumba D, Ali Ekangu R, Mumvemba Kodi MF, Pyana PP, Balharbi F, Decq M, et al. Performance of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and surveillance of gambiense sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e2954. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002954> PMID: 24921941
25. Compaoré CFA, Ilboudo H, Kaboré J, Kaboré JW, Camara O, Bamba M, et al. Analytical sensitivity of loopamp and quantitative real-time PCR on dried blood spots and their potential role in monitoring human African trypanosomiasis elimination. *Exp Parasitol*. 2020;2019: 108014. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108014> PMID: 33011238
26. Wamboga C, Matovu E, Bessell PR, Picado A, Biéler S, Ndung'u JM. Enhanced passive screening and diagnosis for gambiense human African trypanosomiasis in north-western Uganda—Moving towards

- elimination. PLoS ONE. 2017; 12: e0186429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186429> PMID: 29023573
27. Jacobs RT, Nare B, Wring SA, Orr MD, Chen D, Sligar JM, et al. SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human African trypanosomiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5: e1151. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001151> PMID: 21738803
 28. Eperon G., Balasegaram M., Potet J., Mowbray C., Valverde O., Chappuis F. Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014; 12: 1407–1417. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.959496> PMID: 25204360
 29. Koné M, N'Gouan EK, Kaba D, Koffi M, Kouakou L, N'Dri L, et al. The complex health seeking pathway of a human African trypanosomiasis patient in Côte d'Ivoire underlines the need of setting up passive surveillance systems. PLoS Negl Trop Dis. 2020; 14: e0008588. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008588> PMID: 32925917
 30. Büscher P, Ngoyi DM, Kaboré J, Lejon V, Robays J, Jamonneau V, et al. Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3: e471. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000471> PMID: 19936296
 31. Miezán TW, Meda HA, Doua F, Dje NN, Lejon V, Büscher P. Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94: 293. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90327-4](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90327-4) PMID: 10975002
 32. Hasker E, Kwete J, Inocencio da Luz R, Mpanya A, Bebronne N, Makabuza J, et al. Innovative digital technologies for quality assurance of diagnosis of human African trypanosomiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12: e0006664. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006664> PMID: 30212459
 33. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. Educ. Psychol. Meas. 1960; 20: 37–46.
 34. Cicchetti DV, Feinstein AR. High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. J Clin Epidemiol. 1990; 43: 551–558. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(90\)90159-m](https://doi.org/10.1016/0895-4356(90)90159-m) PMID: 2189948
 35. Gamer M, Lemon J, Fellows I, Singh P. Irr: divers coefficients de fiabilité et d'accord inter-évaluateurs. Version 0.84 du package R. 2012. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=irr>. 2012
 36. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33: 159–174. PMID: 843571
 37. Franco JR, Cecchi G, Priotto G, Paone M, Diarra A, Grout L, et al. Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: Update to 2016. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12: e0006890. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006890> PMID: 30521525
 38. Koffi MN' Djetchi M, Ilboudo H, Kaba D, Coulibaly B, N'Gouan E, et al. A targeted door-to-door strategy for sleeping sickness detection in low-prevalence settings in Côte d'Ivoire. Parasite. 2016; 23: 51. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016059> PMID: 27849517
 39. Kambiré R, Lingué K, Courtin F, Sidibé I, Kiendrébéogo D, N'gouan KE, et al. La Trypanosomose Humaine Africaine dans l'espace ivoiro-burkinabé: optimisation des stratégies de surveillance épidémiologique. Parasite. 2012; 19: 389–396. <https://doi.org/10.1051/parasite/2012194389> PMID: 23193524
 40. Boelaert M, Mukendi D, Bottieau E, Kalo LJR, Verdonck K, Minikulu L, et al. A phase III diagnostic accuracy study of a rapid diagnostic test for diagnosis of second-stage human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. EBioMedicine 2018; 27: 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.032> PMID: 29246478
 41. Jamonneau V, Camara O, Ilboudo H, Peylhard M, Koffi M, Sakande H, et al. Accuracy of individual rapid tests for serodiagnosis of *gambiense* sleeping sickness in West Africa. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9: e0003480. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003480> PMID: 25642701
 42. Lumbala C, Kayembe S, Makabuza J, Lutumba P, Van Geertruyden J-P, Bessell PR, et al. Development and implementation of a strategy for intensified screening for *gambiense* human African trypanosomiasis in Kongo Central province, DRC. PLoS Negl Trop Dis. 2020; 14: e0008779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008779> PMID: 33057341
 43. Lee SJ; Palmer JJ. Integrating innovations: A qualitative analysis of referral noncompletion among rapid diagnostic test-positive patients in Uganda's human African trypanosomiasis elimination programme. Infect Dis. 2018; 7: 1–16.
 44. Boa YF, Traore MA, Doua F, Kouassi MT, Kouassi BE, Giordano C. Les différents tableaux cliniques actuels de la trypanosomiose humaine Africaine à *T. b. gambiense*. Analyse de 300 dossiers du foyer de Daloa, Côte d'Ivoire. Bull Soc Pathol Exot. 1988; 81: 427–444
 45. Pépin J, Milord F, Bokelo Mpia, Meurice F, Ethier L, DeGroof Det al. An open clinical trial of nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in central Zaire. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989; 83: 514–7 [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90270-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90270-8) PMID: 2694491

46. Jannin J, Moullia-Pelat JP, Chanfreau B, Penchenier L, Louis JP, Nzaba P, et al. Trypanosomiase Humaine Africaine: étude d'un score de présomption de diagnostic au Congo. *Bull World Health Organ.* 1993; 71: 215–222. PMID: [8490985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8490985/)
47. Blum J, Schmid C, Burri C. Clinical aspects of 2541 patients with second stage human African trypanosomiasis. *Acta Trop.* 2006; 97: 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.08.001> PMID: [16157286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16157286/)
48. WHO. Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis: Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization; 2013.
49. Palmer JJ, Surur EI, Goch GW, Mayen MA, Lindner AK, Pittet A, et al. Syndromic algorithms for detection of gambiense human African trypanosomiasis in South Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: e2003. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002003> PMID: [23350005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23350005/)
50. Mitashi P, Hasker E, Ngoyi DM, Pyana PP, Lejon V, Veken WV der, et al. Diagnostic Accuracy of Loop-amp *Trypanosoma brucei* Detection Kit for Diagnosis of Human African Trypanosomiasis in Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: e2504. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002504> PMID: [24147176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24147176/)
51. Bendahhou K, El Fakir S, Obtel M, Abda N, Najdi A, Nejari C. Mesures de l'accord entre 2 ou plusieurs juges: Cas des variables qualitatives. *J Epid Santé Publ.* 2010; 5: 51–55
52. Jamonneau V, Bucheton B, Kabore J, Ilboudo H, Camara O, Courtin F, et al. Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4: e917. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000917> PMID: [21200417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21200417/)
53. Jamonneau V, Ilboudo H, Kaboré J, Kaba D, Koffi M, Solano P, et al. Human infections not treated with *Trypanosoma brucei* gambiense are not 100% fatal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e1691.
54. Bucheton B, Macleod A, Jamonneau V. Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Parasite Immunol.* 2011; 33: 438–447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01287.x> PMID: [21385185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21385185/)
55. Camara M, Soumah AM, Ilboudo H, Travaillé C, Clucas C, Cooper A, et al. Extravascular Dermal Trypanosomes in Suspected and Confirmed Cases of gambiense Human African Trypanosomiasis. *Clin Inf Dis.* 2020; 24: 20026211.
56. N'Djetchi MK, Ilboudo H, Koffi M, Kaboré J, Kaboré JW, Kaba D, et al. The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Cote d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11: e0005993. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993> PMID: [29045405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29045405/)
57. Ndung'u JM, Boulangé A, Picado A, Mugenyi A, Mortensen A, Hope A, et al. Trypano! contributes to the elimination of gambiense human African trypanosomiasis by combining tsetse control with "screen, diagnose and treat" using innovative tools and strategies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14: e0008738. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008738> PMID: [33180776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33180776/)
58. Mbo F, Mutombo W, Ngolo D, Kabangu P, Valverde MO, Wourgaft NS, et al. How Clinical Research Can Contribute to Strengthening Health Systems in Low Resource Countries. *Trop Med Inf Dis.* 2020; 5: 48. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020048> PMID: [32235362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235362/)
59. Johnson WO, Jones G, Gardner IA. Gold standards are out and Bayes is in: Implementing the cure for imperfect reference tests in diagnostic accuracy studies. *Prev Vet Med.* 2019; 167: 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.01.010> PMID: [31027713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31027713/)

Résumé

La situation épidémiologique de la THA est passée d'un contexte épidémique à un contexte d'élimination en Côte d'Ivoire. Cette transition épidémiologique a été rendue possible grâce à la détection active de cas par les équipes mobiles coordonnées par le programme national d'élimination de la THA (PNETHA). Cependant, ces équipes mobiles deviennent moins efficaces car à faible prévalence le rapport coût-efficacité de la détection de cas diminue. Ainsi, l'intégration de la détection de cas de la THA dans les activités courantes des centres de santé périphériques devient donc cruciale. L'avènement de différents outils diagnostiques est un événement important pour l'intégration de la surveillance de la THA dans le système de santé. Par conséquent, il devient indispensable d'évaluer les performances de ces tests de diagnostic afin de mettre en place des algorithmes appropriés à la détection passive des cas de la THA. Cette étude a été réalisée dans les districts sanitaires de Bouaflé et Sinfra. Sur le terrain, trois tests de diagnostic rapides (TDR) ont été réalisés sur des échantillons de sang collectés auprès des suspects cliniques volontaires venus en consultation dans un centre de santé fixe. Les séropositifs détectés ont été examinés avec les tests parasitologiques et des échantillons de sang séché sur du papier filtre collectés puis analysés au laboratoire avec le test de la trypanolyse, l'ELISA/*T.b.gambiense*, la RT-qPCR et la LAMP. Au total, 3433 suspects cliniques ont été dépistés et la séroprévalence était de 2,83 % (97/3433). Deux cas de THA ont été diagnostiqués avec les tests parasitologiques soit une prévalence de 0,06% observée dans la population recrutée. La probabilité d'être positif à l'un des TDR de la THA (*odds ratio*: 1,7 - 4,6) a été observé chez les personnes présentant les troubles du sommeil, les troubles moteurs, les convulsions, le grand amaigrissement et les problèmes psychiatriques. La spécificité des TDR individuels variait de 97,8 % à 99,6 % et de 93,3 % à 98,9 % pour les tests de laboratoire. La valeur prédictive positive (VPP) des TDR individuels a été de 14,3 %. Pour la LAMP et l'ELISA/*T.b.gambiense*, les VPP étaient de 67 %. Les résultats obtenus dans cette étude confirment la pertinence de l'algorithme de diagnostic appliqué sur le territoire national, avec l'usage du HAT Sero-K-Set et/ou SD Bioline HAT suivi de la trypanolyse ou l'ELISA pour la surveillance passive en Côte d'Ivoire.

Mots clés: spécificité, surveillance passive; symptômes et signes cliniques, test de diagnostic, trypanosomiase humaine africaine; valeur predictive positive.

Abstract

The epidemiological situation of HAT has changed from an epidemic context to one of elimination in Côte d'Ivoire. This epidemiological transition was made possible by the active cases detection by mobile teams coordinated by the National HAT Elimination Programme (NEPHAT). However, these mobile teams are becoming less effective because at low prevalence the cost-effectiveness of case detection decreases. Thus, the integration of HAT case detection into the peripheral health centres routine activities becomes crucial. The advent of different diagnostic tools is an important event for HAT surveillance integration. Therefore, it becomes essential to evaluate the performance of these diagnostic tests in order to develop appropriate algorithms for HAT passive case detection. This study was conducted in the health districts of Bouaflé and Sinfra. In the field, three rapid diagnostic tests (RDTs) were performed on blood samples collected from volunteer clinical suspects who came for consultation at a fixed health centre. The detected seropositives were examined with the parasitological tests and blood samples dried on filter paper were collected and analysed in the laboratory with the trypanolysis test, ELISA/*T.b.gambiense*, RT-qPCR and LAMP. A total of 3433 clinical suspects were screened and the seroprevalence was 2.83% (97/3433). Two cases of HAT were diagnosed with the parasitological tests, i.e. a prevalence of 0.06% observed in the recruited population. The probability of being positive for one of the HAT RDTs (*odds ratio*: 1.7 - 4.6) was observed in individuals with sleep disorders, motor disorders, convulsions, severe weight loss and psychiatric problems. The specificity of individual RDTs ranged from 97.8% to 99.6% and from 93.3% to 98.9% for laboratory tests. The positive predictive value (PPV) of individual RDTs was 14.3%. For the LAMP and the ELISA/*T.b.gambiense*, the PPVs were 67%. The results obtained in this study confirm the relevance of the diagnostic algorithm applied on the national level, with the use of the HAT Sero-K-Set and/or SD Bioline HAT followed by trypanolysis or ELISA for passive surveillance in Côte d'Ivoire.

Keywords: clinical signs and symptoms, diagnostic test, human African trypanosomiasis; passive surveillance; positive predictive value; specificity.