

ORGANISATION DE COORDINATION
ET DE COOPERATION POUR LA LUTTE
CONTRE LES GRANDES ENDEMIES

CENTRE MURAZ
LABORATOIRE DES SCHISTOSOMIASES

N° 8 / PARA.79

MISSION O.R.S.T.O.M.
AUPRES DE L'O.C.C.G.E.
N° 7.097 / Doc.Tech.OCCGE

ELISA EN MICRO METHODE DANS LE DEFISTAGE
IMMUNOLOGIQUE DE LA SCHISTOSOMIASE MANSONIENNE

II Etude Critique (1)

BOUDIN C*

26 DEC. 1984

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° 16.367

Cote : B

- (1) Ce rapport présente les résultats de recherches menées par le Laboratoire des Schistosomiasés Section Parasitologie du Centre Muraz OCCGE, dans le cadre d'accords conclus entre l'OCCGE et l'ORSTOM.

* Parasitologiste de l'O.R.S.T.O.M. Centre Muraz.

- 8 AOUT 1979
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

141
O.D.
n° 9873 Ent. Fed

L'ELISA en microméthode dans le dépistage immunologique
de la schistosomiase mansonienne

II. Etude critique.

I. INTRODUCTION :

La sensibilité de nos examens parasitologiques des selles dans le dépistage de la schistosomiase intestinale est assez faible. La technique du MIF que nous utilisons couramment ne permet de dépister que 50 % des malades lors d'un examen unique. Nous avons voulu tester la fiabilité d'une technique de dépistage immunologique : L'ELISA en micro-méthode, classiquement plus sensible mais moins spécifique que l'examen parasitologique.

L'application en dépistage de masse de toute nouvelle technique diagnostique doit répondre au préalable à 3 impératifs :

- la technique doit être reproductible, c'est à dire conserver la même précision,
- la technique doit être sensible, c'est à dire dépister la quasi totalité des sujets malades au sein d'une population et ne donner que peu de résultats faussement négatifs, chez les sujets schistosomiens,
- Enfin la technique doit être spécifique, c'est à dire capable de ne dépister que des schistosomiens à l'exclusion de toute autre parasitose.

II. METHODE D'ETUDE ET MATERIEL :

L'étude du couple sensibilité spécificité nécessite au préalable un classement de référence en malades et sujets bien portants. En zone d'endémie, il est souvent difficile de départager ces deux groupes de population. Nous avons tenté de résoudre ce problème en choisissant 2 villages. 1 village mésoendémique en bilharziose intestinale à S. mansoni et l'autre indemne de toute bilharziose du fait de l'absence des mollusques hôtes intermédiaires.

1. Les sérums :

Les sérums ont été prélevés chez tous les habitants du village de Dofiguisso (méso-endémique en bilharziose intestinale) et chez les élèves de l'école de Koumi (village indemne d'infection bilharzienne). Ainsi nous disposons de malades schistosomiens et de témoins non schistosomiens.

Nous avons considéré comme sujet bilharzien tout individu présentant des oeufs de S.mansoni à un au moins des 4 examens parasitologiques hebdomadaires et/ou présentant une ascension du taux des Ac après traitement spécifique par le Vansil (Oxamniquine) retenu comme sujet non schistosomien : tous les enfants de l'école de Koumi n'ayant jamais quitté le village. Les individus de Dofiguisso, parasitologiquement négatifs à 4 examens et sans ascension du taux des Ac après traitement, n'ont pas été retenus comme sujet non schistosomien en raison d'un risque de contamination antérieur par des furcocaires de schistosomes humains ou animaux.

Les sérums ont été prélevés à la fois sur confetti et sur tube capillaire hépariné, avant et un mois après la cure d'oxamniquine.

2. L'Antigène bilharzien.

L'antigène utilisé était un extrait soluble de S.mansoni adulte, obtenu après broyage mécanique, congélations, décongélations successives, ultracentrifugation, dialyse et lyophilisation (3). La souche de S.mansoni est une souche locale entretenue sur le singe B.patas comme hôte définitif et sur B.pfeifferi comme hôte intermédiaire. L'antigène ainsi obtenu a été soigneusement contrôlé, afin de standardiser les différents lots : étude immunoélectrophorétique contre un serum humain hyperimmun, dosage de l'azot protéique selon la méthode de Lowry, étude quantitative en ELISA contre le serum positif de référence et un serum négatif. (4)

3. La technique de base.

C'est la technique de l'ELISA en micro-méthode que nous avons mis au point dans notre laboratoire (5).

III - RESULTATS et COMMENTAIRES.

1. Etude de la reproductibilité :

Nous avons déjà étudié la reproductibilité des confetti élués une nuit à 4° (5). Il nous fallait étudier la reproductibilité de la réaction proprement dite. Pour cela nous disposions d'une d'échantillons normaux et pathologiques, fractionnés en multiples parties et conservés dans les meilleures conditions : à -20° pour les sérums, à +4° avec un dessiccateur pour les confetti. Il suffisait alors de tester à court et moyen terme les causes possibles d'erreur ou d'instabilité à tous les stades de la technique. (différents lots d'Ag et de tampon, différents manipulateurs, différence de température du laboratoire, etc..)

Les résultats sont résumés dans les tableaux I et II.

Pour la série I nous avons appliqué le test des plans à plusieurs facteurs (test F) au risque de 5 %, $F_{27}^2 = 3,35$; le coefficient F calculé est de = 0,09. La réaction est donc reproductible lorsque les conditions techniques sont soigneusement respectées et l'Antigène standardisé. Dans l'étude de la reproductibilité pour deux techniciens différents, nous avons appliqué le test T pour 9 ddl des séries appariées. Au risque 5 %, le T théorique est de 2,262. Le T calculé de 1,11, la différence n'est donc pas significative et la réaction est reproductible quelque soit le manipulateur.

2. Etude de l'Efficacité

Notre immunodiagnostic étant reproductible, nous avons apprécié son efficacité : c'est à dire sa capacité à trier correctement les malades des sujets bien-portants, grâce à la conjonction d'une bonne sensibilité (peu de malades faussement négatifs) et d'une bonne spécificité (peu de sujets sains faussement positifs).

Pour déterminer le couple sensibilité/spécificité de l'ELISA, il faut d'abord fixer le seuil de positivité : c'est à dire la densité optique (DO) à partir de laquelle nous considérerons qu'un sujet est positif en ELISA. Pour cela nous devons comparer la DO moyenne des sujets non schistosomiens par rapport à la DO moyenne des sujets schistosomiens (Diagramme n° 1)

La distribution des DO des sérums de Koumi obéit sensiblement à une loi normale dont la moyenne est $DO = 17,9$ et l'acart type = 9,1. Autrement dit, 95 % des sérums négatifs ont une DO inférieure à 33. La distribution des sérums de Dofiguisso n'obéit pas à une loi normale du fait de l'hétérogénéité de l'échantillon.

Nous n'avons pas pu calculer la DO moyenne et l'écart type permettant de fixer la DO, seuil de positivité.

En appliquant le tableau des contingents 2 x 2 (6) (association entre deux variables dichotomique), nous constatons que pour une DO seuil de 33, la sensibilité n'est que de 64 % (donc presque équivalente à celle de l'examen parasitologique). La spécificité est par contre de 93 %. Tableau III.

IV DISCUSSION :

Notre seuil de négativité (DO = 33) est très élevé. Les sérums de sujets africains, non schistosomiens, peuvent atteindre des DO importantes (entre 20 et 40), contrairement aux sérums de sujets européens. Les seuils de négativité pour POUT et al (7), AMBROISE-THOMAS et al (8) et HULDT et al (9) sont inférieurs à 10.

Il ne s'agit pas de réactions croisées avec des infections larvées par cercaires d'animaux. Nous avons choisi un village où il n'existait pas de mollusque hôte intermédiaire. Le développement du cycle de transmission des schistosomes humains ou animaux y est donc impossible.

Il ne s'agit vraisemblablement pas de réactions croisées avec d'autres parasitoses. CAPRON (10), AMBROISE-THOMAS, (8) ont montré que l'Ag somatique schistosomien, ne pouvait donner de réactions croisées qu'avec certains distomes, ou l'Echinococcus granulosus. Ces deux parasitoses sont inexistantes dans nos régions. L'ankylostomiase, parasitose extrêmement répandue ne semble pas donner de réactions croisées avec l'Ag schistosomien.

Il ne s'agit pas non plus d'une activité peroxydasique du sang sur confetti. L'excellente corrélation confetti-sérum est contre cette hypothèse.

Il nous faut donc admettre que le seuil de négativité pour les sérums africains non schistosomiens, est très élevé. La réaction d'ELISA étant classiquement très sensible, elle permet de dépister des sujets parasités à faible taux d'Ac. Nous obtenons donc un chevauchement important des deux courbes de distribution des DO chez les sujets bilharziens et non bilharziens (Diagramme 3 bis).

Notre but étant de dépister le maximum de sujets positifs, il nous faut abaisser le seuil de 33 pour augmenter la sensibilité du dépistage. Ce faisant, nous allons diminuer la spécificité, le nombre de sujets non schistosomiens faussement positifs en ELISA va croître.

En appliquant le tableau des contingents 2 x 2 pour différentes DO* (6), nous trouvons que la DO seuil 25 nous donne le meilleur couple sensibilité-spécificité. Pour cette DO seuil, la sensibilité de notre technique est de 85 % et la spécificité de 77 %. Autrement dit, 15 % des sujets positifs échappent au dépistage immunologique, tandis que 23 % des sujets négatifs seront considérés comme parasités. (tableau III).

Ces données tirées de l'observation sont confirmées par l'étude statistique qui a fait l'objet d'un document séparé (12).

Bien que la sensibilité de notre technique immunologique soit nettement supérieure à celle de l'examen parasitologique des selles, nous ne dépistons pas 100 % des malades. D'autre part, la mauvaise spécificité de notre réaction interdit, pour l'instant, l'emploi de l'ELISA en séro-épidémiologie.

Par contre cette technique peut nous rendre de grands services dans le cadre d'un dépistage en vue d'un traitement de masse. Un essai thérapeutique récent avec l'Oxamniquine utilisé en cures séquentielles chez tous les individus de plus de 4 ans dans un village méso-endémique* (11), nous a montré la parfaite tolérance du produit, aussi bien chez les sujets parasités que non parasités. L'inocuité de ce nouveau schistosomicide fait que nous pouvons envisager de le prescrire sans danger à des sujets non bilharziens. Dès lors, le manque de spécificité de notre réaction n'est plus un obstacle à son emploi en dépistage de masse.

L'expérience nous a montré que le traitement efficace de 85 % de la population parasitée en cures radicales répétées permettait, sinon d'interrompre la transmission, du moins de la stabiliser à des niveaux très bas. Dès lors, la sensibilité de notre réaction est suffisante et son emploi pourra être testé dans ce type d'indication.

CONCLUSION :

Au terme de cette étude, nous avons montré que la réaction était parfaitement reproductible lorsque la technique était soigneusement standardisée. Le manque de sensibilité et la mauvaise spécificité de la réaction sont un obstacle à son utilisation en séro-épidémiologie. Mais la fiabilité de la réaction est suffisante pour que son utilisation puisse être envisagée dans le cadre d'un dépistage en vue d'un traitement collectif.

REMERCIEMENTS :

Nous tenons à remercier A. BOUDIN^{de} sa précieuse aide technique et le Dr. J.P. MOREAU, Directeur du Centre Muraz pour les conseils qu'il a bien voulu nous donner dans la rédaction de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ENGVALL E. PERLANN P. (1972)
Enzyme-Linked immunosorbent assay, ELISA
J. Immunol. 109 129-135
- (2) GRAHAM et KANOWSKY (1966)
The early stages of absorption of injected horseradish peroxydase in the proximal tubules of mouse kidney.
J. Histo. Cytochem. 14 291-301
- (3) BIGUET J. ROSE F. CAPRON A. TRAN VAN KY P. (1965)
Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des Ag vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoélectrophorèse.
Rev. Immunol. 29 (1-3) 5-30

- (4) CAPRON A. VERNES A. WATTRE P. CAPRON M. LEFEBVRE-BONNANGE M.N. (1976)
Diagnostic immunologique des helminthiases
Monographie Spéciale n° 3
- (5) BOUDIN C. DESFONTAINE M. (1979)
L'ELISA en micro-méthode dans le dépistage immunologique de la schistosomiase mansonienne I) Modalités techniques
Communication à la 19 ème conférence technique de l'OCCGE
Bobo-Dioulasso.
- (6) LAFAYE A. (1976)
Association entre deux variables dichotomiques. Valeur diagnostique d'une réaction immunologique.
Doc. Techn. OCCGE Stat n° 75 n° 6234
- (7) BOUT D. DUCIMONT JC. FARAG H. CAPRON A. (1975)
Diagnostic immuno-enzymologique des affections parasitaires
Lille Médical 20/6 561-566
- (8) AMBROISE-THOMAS P. DESGEORGES PT. MONGET D. (1978)
Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une micro-méthode modifiée
Bull. OMS.
- (9) HULDT G. LAGEQUIST B. PHILLIPS T. DRAPER CC. VOLLER A. (1975)
Detection of antibodies in schistosomiasis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
WHO/Schisto/75.38 5p
- (10) CAPRON A. BIGUET J. VERNES A. (1968)
Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologique des relations hôte-parasite.
Path.Bio. 16/3-4 121-138
- (11) BOUDIN C. MOREAU J.P. (1979)
Essai de traitement de masse de la bilharziose intestinale à S. mansoni par prises uniques répétées d'Oxamniquine (Vansil).
Communication à la 19 ème conférence technique de l'OCCGE
Bobo-Dioulasso.-

REPRODUCTIBILITE

(Etude sur serums)

VARIATION DES LOTS D'AG :

N° des serums	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1 ^{er} lot	29	26	38	30	51	48	23	33	79	46
2 ^{ème} lot	22	29	28	34	60	47	39	39	80	49
3 ^{ème} lot	33	30	39	25	68	50	37	31	75	45

CHANGEMENT DE MANIPULATEUR :

N° des serums	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	29	26	22	30	51	29	23	33	79	46
B	33	30	28	25	60	26	27	31	75	45

COUPLE SENSIBILITE - SPECIFICITE
 =00=0

) (⊖) SEUL = 33

		IMMUNO		
		(+)	(-)	T
PARASITO	(+)	67	38	105
	(-)	8	111	119
	T	75	149	224

Probabilité de faux négatifs = $\frac{38}{105}$

Sensibilité = $(1-x)$ = 64 %

Probabilité de faux positifs = $\frac{8}{119}$

Spécificité = $(1-B)$ = 93 %

) (⊖) SEUL = 25

		IMMUNO		
		(+)	(-)	T
PARASITO	(+)	86	19	105
	(-)	27	92	119
	T	113	111	224

Probabilité de faux négatifs = $\frac{19}{105}$

Sensibilité = $(1-x)$: 85 %

Probabilité de faux positifs = $\frac{27}{119}$

Spécificité = $(1-B)$: 77 %

6

Diagramme - I - distribution des sérums.

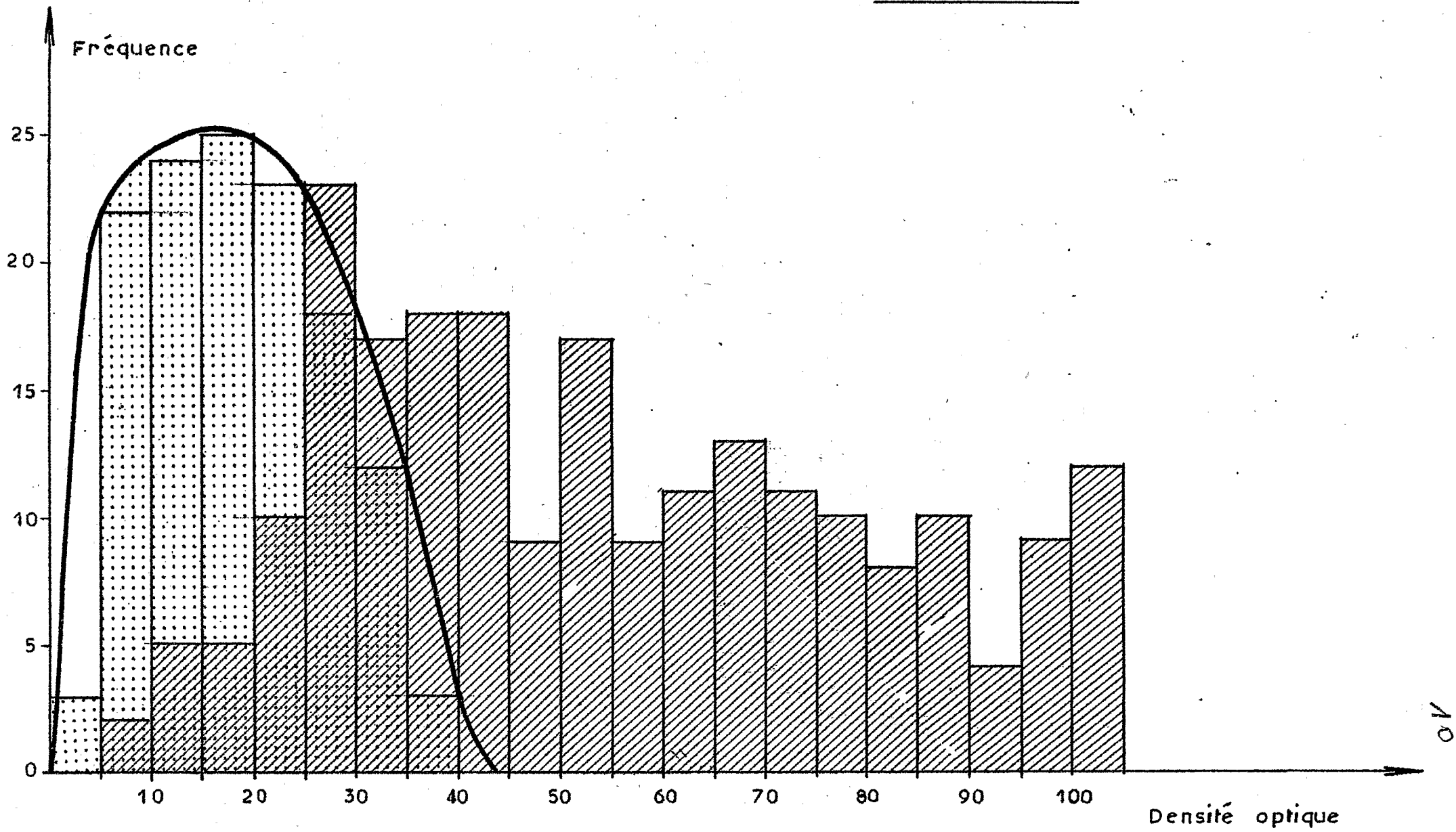
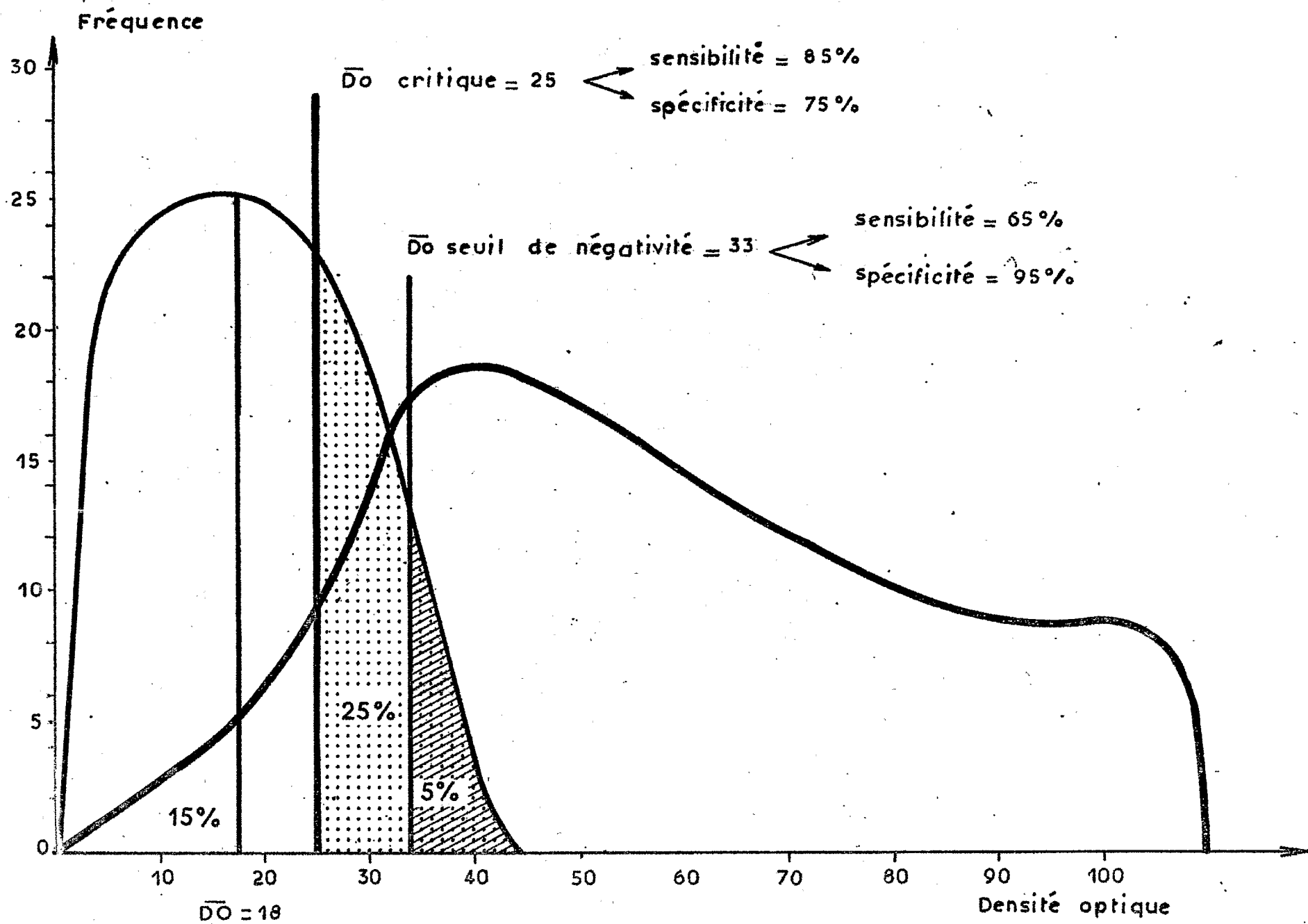


Diagramme II - Courbe de distribution de sérums



11