

Utilisation de la technique ELISA dans le dépistage des moustiques infectés par *Plasmodium falciparum*

C. BOUDIN,¹ V. ROBERT,² J. P. VERHAVE,³ P. CARNEVALE,⁴ & J. H. E. T. MEUWISSEN⁵

L'étude présentée vise en premier lieu à évaluer la fiabilité et l'efficacité du titrage immunoenzymatique dans le dépistage des moustiques infectés par Plasmodium falciparum, par rapport à la méthode parasitologique classique (dissection et examen microscopique des glandes salivaires), et en second lieu à étudier l'applicabilité de cette méthode immunologique sur le terrain. Dans une première partie sont passées en revue les caractéristiques de la technique ELISA utilisée, les variations de sa fiabilité (reproductibilité, sensibilité, spécificité) et son efficacité selon l'intensité de la charge sporozoïtaire. La seconde partie présente une enquête longitudinale sur la dynamique de transmission de l'infection, effectuée en 1985 dans le sud-ouest du Burkina Faso. Au terme de cette étude, il semble que l'ELISA soit une technique spécifique, moyennant certaines précautions (comme la séparation des abdomens de l'ensemble tête-thorax ou le réexamen des moustiques faiblement positifs), et que sa sensibilité soit supérieure à celle de la dissection.

1) Evaluation de la fiabilité et de l'efficacité de l'épreuve

Le taux d'inoculation est un des paramètres entomologiques les plus importants en épidémiologie du paludisme. Cet indice est égal au produit de l'agressivité anophélienne quotidienne pour l'homme par l'indice sporozoïtaire (7). L'agressivité anophélienne est évaluée par le nombre d'anophèles venant piquer l'homme, tandis que l'indice sporozoïtaire traduit la prévalence de l'infection, classiquement estimée par la dissection des glandes salivaires des moustiques capturés. Cette dissection ne peut être réalisée que sur des insectes non desséchés et prend un certain temps, même à un expérimentateur entraîné, ce qui limite le nombre de moustiques disséqués, et donc la précision de la prévalence, surtout dans les zones à faible transmission paludéenne. D'autre part, l'observation des glandes infectées ne permet pas de quantifier la

charge sporozoïtaire ni de caractériser l'espèce de plasmodium en cause.

La production d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'espèce et du stade sporozoïtaire (8) a permis la mise au point de nouvelles techniques pour détecter des moustiques infectés par radio-immunologie (14) ou par enzymo-immunologie (1). Ces techniques présentent par rapport à la dissection classique le double avantage de pouvoir être réalisées sur des moustiques secs et sur de grandes séries d'échantillons, et de permettre de quantifier la charge sporozoïtaire et d'identifier l'espèce de plasmodium en cause.

Nous avons appliqué sur le terrain une nouvelle technique ELISA (titrage avec immunoabsorbant lié à une enzyme), parallèlement à la dissection classique des glandes salivaires, sur des moustiques sains et expérimentalement infectés.

La fiabilité (reproductibilité—sensibilité—spécificité) et l'efficacité (valeur diagnostique) de cette épreuve immunologique ont pu être ainsi déterminées.

¹ Chargé de recherche (parasitologue) ORSTOM, Département de parasitologie, Faculté de Médecine de l'Université scientifique et médicale de Grenoble, 38700 La Tronche, France. Les demandes de tirés à part doivent être adressées à cet auteur.

² Chargé de recherche (entomologiste) ORSTOM, Centre Muraz, B.P. 171, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

³ Docteur en médecine et des sciences, Département de parasitologie médicale, Faculté de Médecine de l'Université catholique, Geert Grooteplein Zuid 24, 6500 Nimègue, Pays-Bas.

⁴ Directeur de recherches ORSTOM, Centre Muraz, B.P. 171, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

⁵ Professeur de médecine tropicale, Faculté de Médecine de l'Université catholique, Geert Grooteplein Zuid 24, 6500 Nimègue, Pays-Bas.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Technique immunologique

Nous avons utilisé l'épreuve ELISA décrite par Verhave et al. en 1986 (13). Des plaques de polystyrène sont sensibilisées, dans un premier temps, avec un anticorps monoclonal (3 spz) spécifique du

sporozoïte de *Plasmodium falciparum*. Dans un deuxième temps, le tiers d'une suspension de moustique broyé est ajouté. Dans un troisième temps, le même anticorps monoclonal, marqué à la biotine, est introduit et se fixe sur les immunocomplexes (anticorps monoclonal—antigène sporozoïtaire) formés. On ajoute alors le complexe streptavidine—biotine—peroxydase^a qui se fixe sur l'anticorps monoclonal marqué. L'activité peroxydasique est révélée par une réaction colorimétrique utilisant comme substrat l'eau oxygénée et comme chromogène l'orthophénylènediamine. La lecture se fait au spectrophotomètre avec un filtre de 405 nanomètres.

Nous avons réalisé sur chaque plaque les témoins suivants:

- 4 puits, aléatoirement dispersés, d'un témoin positif de référence (broyat de 100 moustiques d'élevage expérimentalement infectés, réparti en aliquotes congelées);
- 2 puits consécutifs d'un témoin négatif de référence (broyat de 100 moustiques d'élevage sains, également réparti en aliquotes congelées);
- 8 puits consécutifs d'une dilution, de progression géométrique de raison 2, d'une suspension initiale de 400 000 sporozoïtes/ml, elle aussi stockée en aliquotes congelées;
- enfin, 8 puits consécutifs d'un témoin optique ne contenant pas de moustique, mais tous les produits intervenant dans la réaction.

Méthodologie

La reproductibilité de la technique a été évaluée sur 14 plaques en comparant entre elles d'une part les 14 valeurs moyennes du témoin positif de référence, et d'autre part celles des dilutions successives de la suspension standard de sporozoïtes. Chaque plaque a été testée avec le même lot d'anticorps monoclonal par le même manipulateur.

Pour déterminer le seuil de positivité de la réaction, nous avons testé 369 moustiques d'élevage (*Anopheles gambiae* s.s.) et 886 moustiques sauvages (*A. gambiae* s.l.) capturés en zone d'endémie faible pendant la saison de non-transmission. Tous les moustiques ont été séchés sous vide et conservés à 4°C pendant 1 à 12 semaines, puis traités en entier (tête, thorax et abdomen).

La sensibilité et la spécificité de la réaction et sa valeur diagnostique (δ) ont été évaluées sur deux populations de moustiques (*A. gambiae* d'élevage), l'une saine, l'autre expérimentalement infectée sur des porteurs de 40, 60 et 1200 gamétocytes/mm³. Les moustiques ont été disséqués pour détecter une infection des glandes salivaires, qui ont été recueillies

puis testées par l'épreuve ELISA susmentionnée. La sensibilité de cette épreuve a été déterminée par la proportion de moustiques parasités positifs en immunologie rapportée à l'ensemble des moustiques parasités; la spécificité l'a été par la proportion de moustiques sains (moustiques d'élevage) négatifs en immunologie rapportée à l'ensemble des moustiques sains. L'efficacité de l'épreuve immunologique a été évaluée par rapport à trois paramètres (δ):

- la valeur prédictive d'un diagnostic positif (VPD+), qui est la proportion de moustiques infectés par rapport aux moustiques positifs en ELISA;
- la valeur prédictive d'un diagnostic négatif (VPD-), qui est la proportion de moustiques sains par rapport aux moustiques négatifs en ELISA;
- et la valeur globale de l'épreuve (VG), qui est la proportion de moustiques infectés ou sains correctement classés par rapport à l'ensemble des moustiques testés.

Pour étudier la cinétique d'apparition de l'antigène sporozoïtaire chez les moustiques infectés, nous avons disséqué des lots de 10 à 15 moustiques aux 7°, 8°, 9°, 10°, 11° et 12° jour après l'infection expérimentale. Les glandes salivaires et les estomacs ont été examinés au microscope, sans écrasement entre lame et lamelle, afin de rechercher des sporozoïtes et des oocystes. Chacun de ces prélèvements a été ensuite aspiré et testé en ELISA.

RÉSULTATS

Reproductibilité de la technique

En nous référant aux deux critères d'évaluation retenus pour l'étude de la reproductibilité, nous avons observé entre les 14 plaques testées des variations importantes, aussi bien de la densité optique (DO) du témoin positif (0,7 à 1,2) que des DO observées pour des dilutions équivalentes de sporozoïtes (figure 1.A). Ce manque relatif de reproductibilité nous a fait adopter, pour chaque plaque, un coefficient de correction (K) représentant la valeur moyenne du témoin positif calculée sur l'ensemble des plaques, divisée par la valeur moyenne du témoin positif calculée sur la plaque testée.

Chaque DO de la plaque a été ensuite multipliée par la valeur de K. La sensibilisation des plaques par l'anticorps monoclonal pouvant être hétérogène, nous avons exprimé la valeur du témoin positif observé sur la plaque par la moyenne de 4 puits répartis aléatoirement. L'application de ce coefficient de correction aux dilutions de la suspension standard de sporozoïtes a donné les valeurs moyennes représentées dans la figure 1.B.

^a Laboratoire Amersham, Amersham (Buckinghamshire), Angleterre.

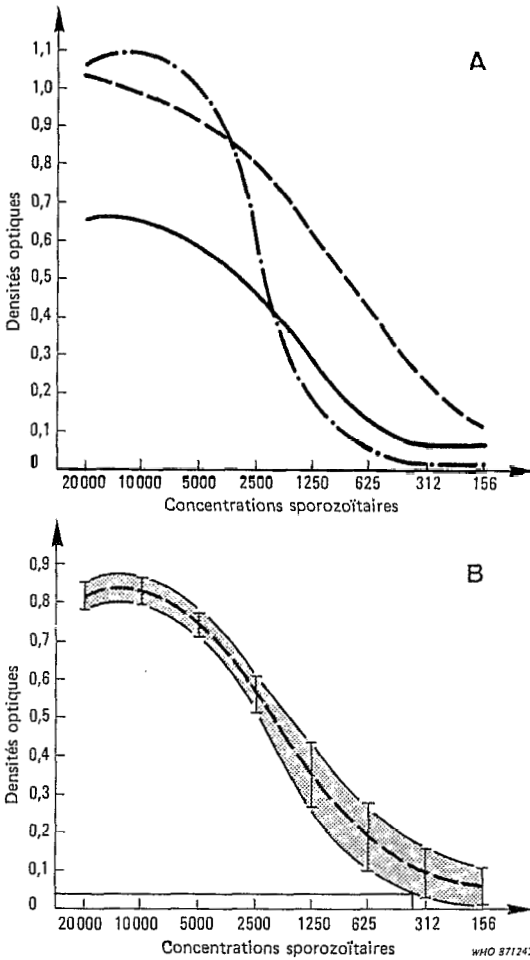


Fig. 1. Distribution des densités optiques (DO) en ELISA, en fonction des concentrations sporozoïtaires pour 50 μ l: A—distribution des DO non corrigées obtenues sur 3 plaques représentatives des réponses observées pour les dilutions successives d'une même suspension de sporozoïtes; B—courbes des valeurs moyennes des DO corrigées et de leur écart type, obtenues sur l'ensemble de 14 plaques pour les dilutions successives de la suspension standard de sporozoïtes.

Détermination du seuil de positivité de la réaction

Les distributions des DO des 369 moustiques d'élevage et des 886 moustiques sauvages sont données dans la figure 2. Nous remarquons une distribution normale des DO des moustiques d'élevage (test de Kolmogorov-Smirnov non significatif). En revanche, il semble exister deux populations de moustiques

sauvages: le premier groupe a une distribution normale (vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov) avec une DO moyenne de $-0,004$ (équivalente à celle des moustiques d'élevage) et une DO maximale approximativement égale à $+0,040$ (figure 2); la distribution du deuxième groupe est décalée vers la droite (DO égales ou supérieures à $+0,050$), ce groupe comprenant probablement des moustiques légèrement infectés. Les moustiques sauvages à DO inférieure ou égale à $+0,040$ ont été considérés comme négatifs. La distribution groupée des moustiques d'élevage négatifs et des moustiques sauvages probablement négatifs est normale (test de Kolmogorov-Smirnov non significatif). Comme 99,9% des moustiques «négatifs» ont une DO inférieure à $+0,040$ (moyenne + 3 écarts types en situation unilatérale), nous avons fixé le seuil de positivité à $DO=0,040$.

Relation entre charge sporozoïtaire et réponse en ELISA

Les DO obtenues avec différentes dilutions successives de sporozoïtes se répartissent selon une courbe sigmoïde. Il n'existe une relation de proportionnalité entre la charge sporozoïtaire et la DO que dans l'intervalle 5000–300 sporozoïtes/50 microlitres (figure 1.A). Comme un tiers seulement du broyat de moustique a été testé, cela correspond à un intervalle de 15 000–900 sporozoïtes/moustique. Hors de ces limites, de très fortes variations de la charge sporozoïtaire n'entraînent que de faibles variations de la réponse immunologique (figure 1.B).

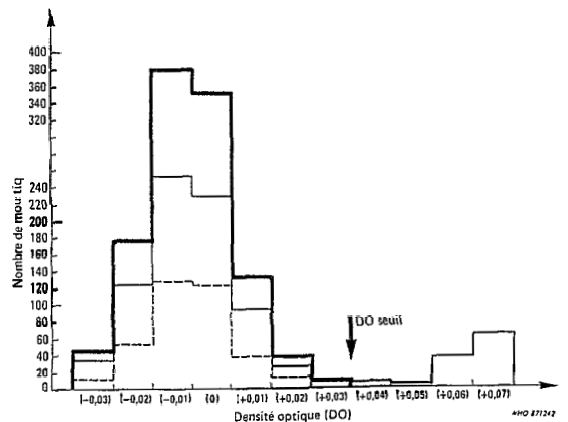


Fig. 2. Distribution des DO en ELISA des moustiques sains d'élevage (-----) et sauvages (———), avec leur distribution groupée (———).

Tableau 1. Corrélation entre résultats parasitologiques et immunologiques chez les mêmes moustiques

	Dissection	Immuno-diagnostic			Sensibilité (ss) et spécificité (sp) ^d
		(+) ^a	(-) ^b	Total ^c	
Moustiques infectés par 40-60 gamétocytes/mm ³	(+)	118 (VP)	23 (FN)	141 (P)	ss = 83,7%
	(-)	24 (FP)	161 (VN)	185 (N)	
		142	184	326	
Moustiques infectés par 1200 gamétocytes/mm ³	(+)	122 (VP)	13 (FN)	135 (P)	ss = 90,4%
	(-)	8 (FP)	45 (VN)	53 (N)	
		130	58	188	
Moustiques sains d'élevage	(+)	—	—	—	sp = 100%
	(-)	0 (FP)	145 (VN)	145 (N)	

^a VP = vrais positifs, FP = faux positifs.

^b FN = faux négatifs, VN = vrais négatifs.

^c P = moustiques infectés, N = moustiques sains.

^d ss = $VP \times 100/P$, sp = $VN \times 100/N$.

A partir des résultats des 14 plaques étudiées, nous avons calculé la courbe moyenne des DO des dilutions successives de sporozoïtes (avec ses limites de confiance). Si nous reportons sur les courbes du 2^e et du 97^e centile le seuil de positivité de la réaction (DO=0,040), nous constatons que l'ELISA peut théoriquement détecter environ 400 sporozoïtes dans 50 microlitres, ce qui correspond à 1200 sporozoïtes/moustique. Ce chiffre est retenu comme seuil de détection minimum.

Evaluation de la sensibilité et de la spécificité

La corrélation entre les résultats d'examen parasitologiques et immunologiques pratiqués sur des moustiques moyennement ou fortement infectés et des moustiques sains permet de déterminer la sensibilité et la spécificité de l'épreuve ELISA (tableau 1).

A la dissection de 326 moustiques gorgés sur des porteurs de 40 et 60 gamétocytes/mm³, nous avons trouvé 141 moustiques positifs; parmi ces derniers, 118 étaient positifs en recourant à l'ELISA. La sensibilité de la réaction est donc supérieure à 83% pour ces moustiques moyennement infectés. De même, à la dissection de 188 moustiques gorgés sur un porteur de 1200 gamétocytes/mm³, nous avons trouvé 135 moustiques positifs, dont 122 étaient positifs en ELISA. La sensibilité de la réaction est ici de plus de 90% pour ces moustiques hyperinfectés. L'augmentation de la gamétocytemie s'accompagne d'une augmentation significative de la proportion de moustiques parasitologiquement positifs (de 141/326 à

135/188; chi carré=37,97) et de la proportion de moustiques immunologiquement positifs (de 142/326 à 130/188; chi carré=30,32); mais la sensibilité de l'ELISA par rapport à la méthode parasitologique ne semble pas varier significativement (118/141 et 122/135; chi carré=2,16).

Les 145 moustiques sains ont été trouvés négatifs en ELISA. La spécificité est donc de 100% au seuil précédemment déterminé. Il faut noter toutefois que, sur un total de 276 moustiques infectés, nous avons trouvé 36 «faux négatifs» en ELISA. Dans tous les cas, les glandes salivaires ont été bien recueillies dans les puits (vérification sous loupe binoculaire), mais le broyage de ces glandes dans les puits peut avoir été défectueux. Sur le total des 238 moustiques apparemment non infectés quoique gorgés sur des porteurs infectants, 32 ont été retrouvés «faux positifs» en ELISA. Il est probable que ces faux positifs correspondent en fait à des moustiques réellement infectés, mais avec des charges sporozoïtaires faibles, passées inaperçues à la dissection. En effet, pour pouvoir recueillir intégralement les glandes après leur examen au microscope, elles n'ont pas été écrasées entre lame et lamelle et certaines glandes peu infectées peuvent ainsi ne pas avoir libéré spontanément leurs sporozoïtes.

Evaluation de la valeur diagnostique de l'épreuve

Pour les moustiques moyennement infectés, la valeur prédictive du diagnostic positif (VPD+) est de

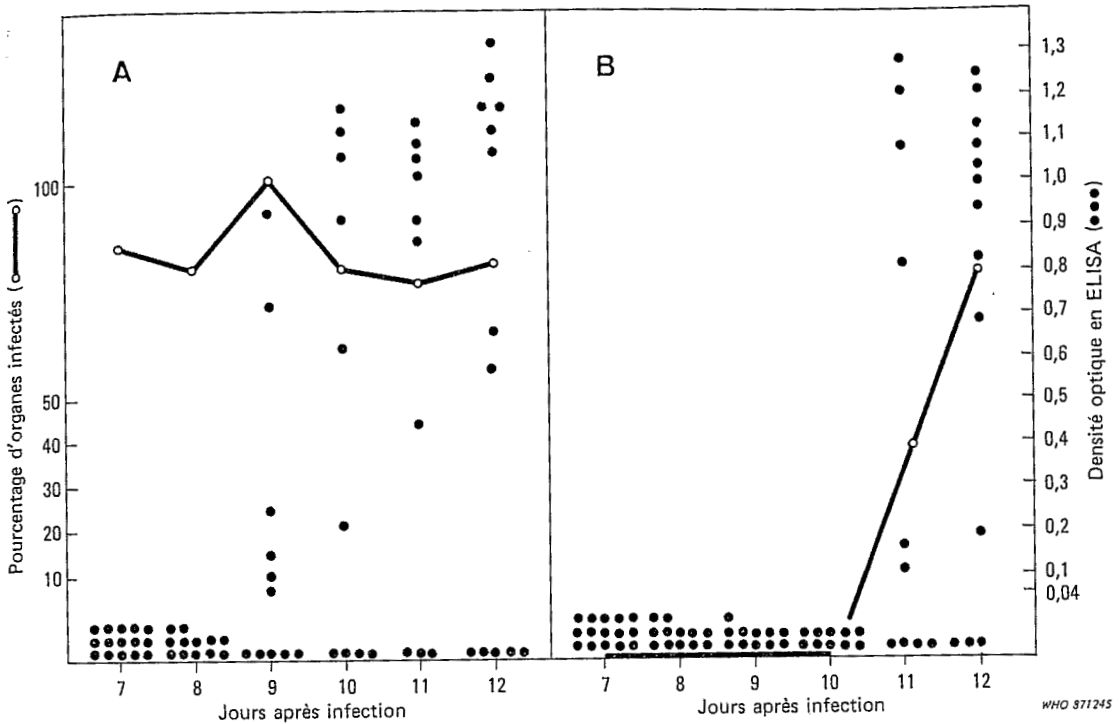


Fig. 3. Cinétique d'apparition de l'antigène sporozoïtaire chez les moustiques infectés par *P. falciparum*, basée sur l'examen des estomacs —A— et des glandes salivaires —B— de lots de 10 à 15 moustiques par jour: 1) au microscope (○—○ pourcentage d'organes positifs); 2) en ELISA selon la densité optique (●●● nombre d'organes positifs).

83%, alors que la valeur prédictive du diagnostic négatif (VPD-) est de 100% pour les moustiques sains d'élevage; la valeur globale de l'épreuve est de 92%. Pour des moustiques hyperinfectés, la VPD+ est de 93,8% et la valeur globale de l'épreuve de 97%. L'efficacité de l'ELISA dépend donc de la relation sensibilité-spécificité.

Cinétique d'apparition des antigènes sporozoïtaires

Certains estomacs de moustiques infectés (contenant des oocystes) ont été trouvés positifs en ELISA dès le 9^e jour après le repas infectant (figure 3.A), soit deux jours avant la migration des sporozoïtes dans les glandes salivaires (figure 3.B). Cela reflète l'apparition de l'antigène sporozoïtaire dès le stade oocyste mûr chez des moustiques infectés, mais pas encore infectants. Cette observation démontre donc la possibilité de faux positifs lorsque les moustiques sont testés entiers (tête-thorax-abdomen).

DISCUSSION

Le relatif manque de reproductibilité de l'ELISA relevé dans cette étude a été signalé par la plupart des auteurs utilisant cette technique dans le dépistage des anticorps antipaludéens. Des tentatives ont été faites pour améliorer la fixation de l'antigène sur le plastique en utilisant différents agents couplants (10). Le même problème se pose avec la détection des antigènes sporozoïtaires. Plusieurs auteurs (14, 3) ont également signalé un manque de reproductibilité en radio-immunologie. Cependant, aucune mention de ce problème dans les mesures par l'ELISA n'est faite par Burkot (1).

Pour pallier cet inconvénient, nous proposons l'utilisation systématique d'un coefficient de correction qui nous a donné de bons résultats dans le dépistage des anticorps antipaludéens.

Le seuil de détection de notre technique a été déterminé à environ 1200 sporozoïtes/moustique.

Burkot (1) trouve une limite de détection de 300 sporozoïtes/moustique. En radio-immunologie, Collins (3) trouve un seuil oscillant entre 500 et 1000 sporozoïtes/moustique. Notre seuil, plus élevé que celui de ces auteurs, explique une moins bonne sensibilité de l'épreuve. Il faut noter toutefois que la fiabilité de la méthode de référence (dissection des glandes) utilisée pour déterminer la sensibilité de l'ELISA n'est pas parfaite. Un certain nombre de glandes faiblement infectées peuvent paraître négatives à l'objectif 10× quand elles ne sont pas écrasées entre lame et lamelle. La sensibilité de l'ELISA, basée sur cette méthode de référence, est donc sous-évaluée. Dans le cas extrême où des « faux positifs » en ELISA seraient en fait des moustiques infectés non détectés à la dissection, cette sensibilité varierait entre 86 et 91 % (tableau 1).

La sensibilité de l'ELISA varie probablement avec l'intensité de la charge sporozoïtaire, bien que la présente étude ne le démontre pas formellement. Par ailleurs, en zone d'endémie, les charges sporozoïtaires par moustique sont plus faibles que celles rencontrées habituellement dans l'infection expérimentale. On peut donc s'attendre à une diminution de la sensibilité du dépistage immunologique dans les conditions naturelles.

Pringle (9) a étudié en 1966 la distribution des densités de sporozoïtes par moustique infecté naturellement. À partir de ces données, nous avons tracé l'histogramme de fréquence des charges sporozoïtaires (non représenté dans cet article) et nous avons reporté le seuil de détection de l'ELISA (1200 sporozoïtes/moustique) sur ce tracé. La sensibilité peut être évaluée par le rapport entre la surface de l'histogramme représentant les moustiques détectés en ELISA et la surface totale de cet histogramme. La sensibilité estimée par cette nouvelle approche est de 88,8 %.

L'efficacité d'une épreuve immunologique dépend à la fois de la relation sensibilité-spécificité et de la prévalence de la maladie (6). Quelle est cette efficacité dans les conditions épidémiologiques naturelles ?

L'indice sporozoïtaire, rarement supérieur à 10 %, est bien souvent inférieur à 1 % dans les zones où l'ELISA présenterait un intérêt comme moyen de dépistage. Avec une prévalence d'infection de 1 %, une spécificité de 99,9 % (au seuil de 0,040) et une sensibilité de 88 %, la VPD+ est de 89,8 %, la VPD- et la valeur globale étant l'une et l'autre de 99,8 %. La VPD+ est donc relativement décevante, en raison du manque de sensibilité de notre épreuve.

Pour augmenter la sensibilité de l'ELISA on peut théoriquement agir de trois façons différentes: soit abaisser la valeur du seuil de positivité, soit tester la totalité du broyat de moustique, soit encore augmenter le nombre de moustiques par lots (2).

L'abaissement de la DO seuil de l'épreuve diminue la spécificité sans augmenter nettement la sensibilité.

Si l'on dépose dans un puits l'intégralité de la suspension de moustique broyé, on augmente la proportion de moustique testé, le nombre de sporozoïtes dans le puits, et donc la sensibilité de la réaction.

Plusieurs moustiques peuvent être groupés dans le même puits. La probabilité qu'il y ait plus d'un moustique positif par puits augmente, et il devient alors plus facile de détecter de faibles infections cumulées. Van Druten (communication personnelle, 1986) a élaboré des abaques permettant d'estimer l'indice sporozoïtaire réel en fonction du nombre de lots de moustiques immunologiquement positifs et du nombre de moustiques par lot.

Ainsi, l'augmentation de la proportion du broyat de moustique testé et du nombre de moustiques par lot est la seule façon d'augmenter la sensibilité de l'épreuve. Cependant, le groupage des moustiques par lots fait perdre une information épidémiologique, celle de la charge sporozoïtaire par moustique infecté. En fait, comme la reproductibilité de l'ELISA n'est pas entièrement satisfaisante, la détermination de la charge sporozoïtaire par moustique risque de toute façon d'être fautive.

L'ELISA nous paraît être une épreuve fiable et efficace dans le dépistage des antigènes sporozoïtaires, à condition de ne pas en attendre de résultats quantitatifs et de ne tester que la partie tête-thorax des moustiques. La seconde partie de cet article, qui suit, présente l'application de cette technique dans une enquête longitudinale étudiant la dynamique de transmission de *P. falciparum*, en parallèle avec les données entomologiques classiques, dans une zone de faible transmission.

2) Application de l'épreuve sur le terrain

On a vu dans la première partie de cet article que l'épreuve ELISA, appliquée à des moustiques expérimentalement infectés et à des moustiques sains d'élevage, a montré une sensibilité de 83 % à 90 % environ selon la charge sporozoïtaire moyenne des moustiques positifs et une spécificité de 99,9 % au seuil de positivité choisi.

Dans les conditions naturelles, la prévalence d'infection des moustiques est bien souvent faible (7), et les charges sporozoïtaires sont inférieures à celles que l'on rencontre dans les conditions expérimentales (9). Nous avons donc étudié la fiabilité de cette technique ELISA en zone d'endémie paludéenne, en comparant les indices sporozoïtaires immunologiques (ISI) et parasitologiques (ISP).

L'étude a été faite en 1985 dans un village du sud-ouest du Burkina Faso, dans une zone rizicole. Le climat y est de type soudanien avec une saison sèche et

chaude de février à mai, une saison pluvieuse de juin à octobre, et une saison sèche et froide de novembre à janvier. Deux récoltes de riz ont lieu chaque année, avec une première mise en eau des rizières en février et une seconde en août. Il existe pendant presque toute l'année (sauf en saison sèche et froide) une forte densité anophélienne, mais, paradoxalement, la transmission du paludisme y est faible et transitoire (11).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Méthodologie de l'étude parasitologique

L'étude, qui a débuté en février, s'est déroulée jusqu'en décembre. Deux captures consécutives sur l'homme ont été organisées, tous les quinze jours, la

nuît, à l'intérieur de différentes maisons du village. Tous les moustiques recueillis ont été identifiés, mais nous n'avons conservé que les anophèles, principaux vecteurs du paludisme dans cette région (11). Les femelles ont été séparées aléatoirement en deux lots égaux. Celles du premier lot ont été immédiatement disséquées afin d'examiner les glandes salivaires et les ovaires. Nous avons calculé l'indice sporozoïtaire à partir des glandes non écrasées entre lame et lamelle, par lecture microscopique avec un objectif 10×. Le pourcentage de femelles pares a été déterminé à partir des ovaires selon la technique de Detinova (5). Le deuxième lot de moustiques a été séché sous vide et conservé en sachets scellés à 4 °C pendant 1 à 9 mois; les moustiques de ce lot ont ensuite été testés en ELISA.

Tableau 2. Comparaison des indices sporozoïtaires parasitologiques et immunologiques

Dates des captures	Indices parasitologiques		Indices immunologiques ^a		Différence ^b
	nombres	%	nombres	%	
<i>1^{re} période: moustiques entiers (tête-thorax-abdomen)</i>					
12-13.2	0/249	0			
12-13.3	0/89	0			
26-27.3	0/362	0			
9-10.4	0/125	0			
23-24.4	0/264	0			
7-8.5	0/179	0			
21-22.5	1 + /391	0,25			
4-5.6	1 + /178	0,56			
17-18.6	1 + /125	0,80	7 + /123	5,69	s.
2-3.7	3 + /483	0,62	5 + /183	2,73	s.
16-17.7	1 + /481	0,21	13 + /439	2,96	s.
30-31.7	0/446	0	3 + /408	0,73	n.s.
12-13.8	0/515	0	0/417	0	n.s.
28-29.8	0/620	0	3 + /546	0,54	n.s.
10-11.9	0/573	0	0/336	0	n.s.
24-25.9	0/521	0	0/572	0	n.s.
<i>2^e période: tête-thorax seulement</i>					
8-9.10	1 + /390	0,25	1 + /340	0,29	n.s.
22-23.10	1 + /454	0,22	8 + /395	2,02	s.
5-6.11	2 + /239	0,83	4 + /275	1,45	n.s.
19-20.11	3 + /174	1,72	3 + /1000	1,66	n.s.
3-4.12	3 + /80	3,75	3 + /63	4,76	n.s.
17-18.12	0/15	0			
30-31.12	0/13	0			

^a Seuil de la DO = 0,040.

^b Test des probabilités exactes de Fischer (signification à 5%): s. = significative, n.s. = non significative.

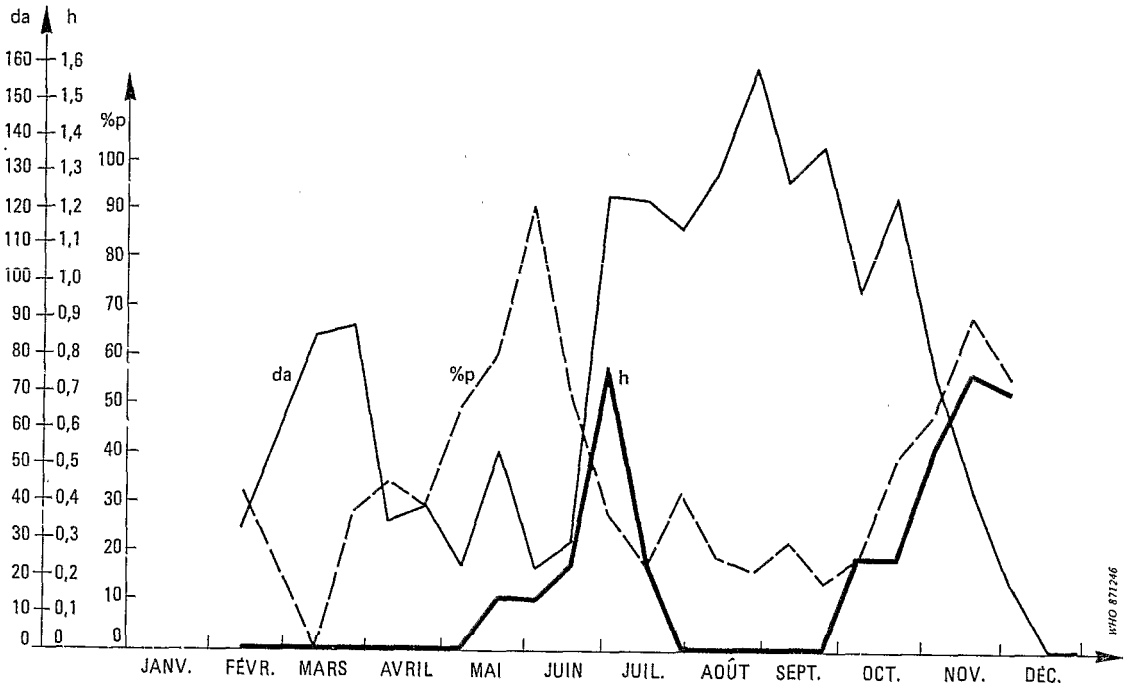


Fig. 4. Dynamique de la transmission de *P. falciparum*, estimée par la densité anophélienne (da ———), le pourcentage de femelles pares (%p - - - -), et le taux d'inoculation entomologique (h ———) pendant l'année 1985.

Méthodologie de l'étude immunologique

La technique utilisée a été mise au point par l'équipe du professeur Meuwissen (13). Nous avons précédemment déterminé le seuil de positivité de la réaction (voir p. 89), qui est de $DO=0,040$.

Les moustiques ont été groupés par lots de 3 et testés en double sur la même plaque ELISA. Compte tenu du faible indice sporozoïtaire obtenu à la dissection, nous avons postulé qu'un lot positif en ELISA ne contenait vraisemblablement qu'un seul moustique infecté. De juin à septembre, l'ISI a été déterminé à partir de moustiques broyés entiers. L'observation d'une certaine discordance entre l'immunologie et la parasitologie nous a conduits à modifier le protocole après quatre mois d'expérimentation. D'octobre à décembre, l'ISI a été déterminé uniquement à partir des têtes et thorax des moustiques, et un indice oocystique immunologique a été estimé séparément à partir des abdomens des mêmes moustiques.

Pendant toute la série de manipulations, nous avons utilisé le même témoin positif (lot de 100 moustiques

expérimentalement infectés, broyés et distribués en aliquotes congelées) et le même témoin négatif (distribué aussi en aliquotes). Les résultats de chaque plaque ont été réévalués en fonction d'un coefficient de correction (K) qui dépend de la valeur du témoin de référence (voir p. 88), ce qui nous a permis de conserver, tout au long de l'étude, une reproductibilité satisfaisante.

Tests statistiques

La comparaison entre les indices sporozoïtaires immunologiques et parasitologiques obtenus après chaque capture a été faite à l'aide du test des probabilités exactes de Fischer (12).

RÉSULTATS

Résultats parasitologiques

Les 23 captures de nuit organisées de la mi-février à la fin décembre aux fins de l'étude parasitologique

ont permis l'examen de 6966 anophèles. Parmi les dix espèces de ces moustiques rencontrées dans la région, trois sont potentiellement vectrices: *Anopheles gambiae*, *A. funestus* et *A. nili*. Les résultats de l'étude sont présentés dans le tableau 2 et la figure 4.

La densité anophélienne estimée par les captures sur l'homme oscille entre 0 et 160 piqûres par homme et par nuit (P/H/N).

Le taux d'inoculation entomologique (h) oscille entre 0 et 0,75 piqûre infectée par homme et par nuit (Pi/H/N). *A. gambiae* est le principal vecteur dans cette zone. La transmission débute en mai, se prolonge en juin-juillet, devient négligeable en août-septembre, puis reprend en octobre pour diminuer de nouveau jusqu'en décembre; il existe donc deux pics de transmission.

Le pourcentage de femelles pares chez *A. gambiae* oscille entre 0% et 90%. Minimum en mars, il atteint un premier maximum (90%) en mai-juin, un peu avant le premier pic de transmission de juin-juillet, puis tombe à 25% pendant la saison des pluies (juillet-septembre) alors que la densité anophélienne est maximale et que la transmission est faible ou nulle; il croît à nouveau en novembre, alors que la densité commence à baisser et que se dessine le second pic de transmission. Cette concordance entre le pourcentage

en question (qui reflète la longévité du vecteur) et la transmission est un phénomène classique (7). En effet, le moustique doit survivre assez longtemps (12-13 jours environ) pour que le cycle sporogonique du parasite puisse se réaliser.

Résultats immunologiques

L'étude immunologique a débuté en juin 1985; 5097 anophèles ont été testés en ELISA. Les résultats en sont présentés dans le tableau 2 et la figure 5. Nous remarquons que l'ISI suit la même évolution bimodale que l'ISP. Il est maximum fin juin, nul ou très faible en août-septembre, puis à nouveau maximum en décembre.

Pendant la première période d'étude (moustiques testés en entier), nous remarquons que l'ISI est constamment supérieur à l'ISP. L'écart entre ces deux indices est d'autant plus grand que la prévalence de l'infection est forte et que le pourcentage de femelles pares, donc la survie du moustique, est élevé. Sur les cinq valeurs positives de l'ISI, trois sont significativement différentes de l'ISP correspondant.

Pendant la deuxième période (tête et thorax séparés

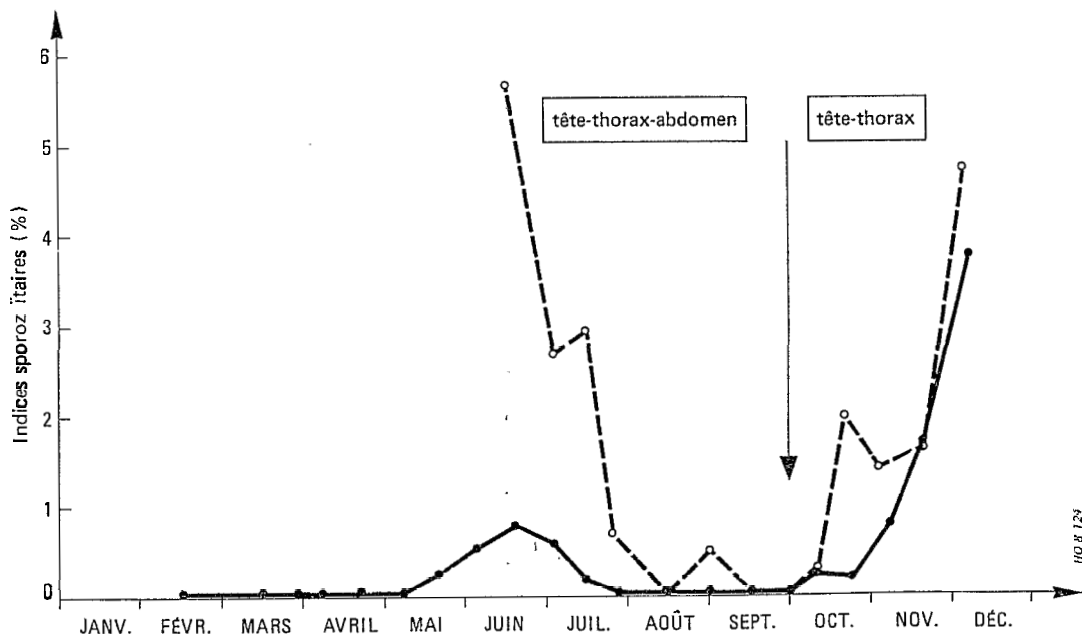


Fig. 5. Comparaison des indices sporozoïtares parasitologique (ISP ———) et immunologique (ISI - - -); l'ISP est obtenu par dissection des glandes salivaires de la moitié des moustiques capturés, l'ISI par l'ELISA (seuil DO = 0,040) sur l'autre moitié de ces moustiques.

de l'abdomen), nous remarquons que les valeurs de l'ISI sont beaucoup plus proches des valeurs de l'ISP, sauf en ce qui concerne la capture du 22-23 octobre. Sur les cinq valeurs positives de l'ISI, seule celle établie pour cette capture est significativement différente de l'ISP correspondant.

L'indice oocystique immunologique (qui estime la prévalence des oocystes mûrs contenant des sporozoïtes immunologiquement différenciés) est nul en octobre, égal à 0,3 % et 1,1 % en novembre, puis à nouveau nul en décembre.

DISCUSSION

Divers auteurs (13, 1, 14) ont démontré la possibilité de faux positifs en radio-immunologie ou en enzymo-immunologie, lorsque des moustiques expérimentalement infectés par des oocystes des 9^e et 10^e jours étaient testés avec l'anticorps monoclonal ant sporozoïtaire 3 spz. A ce moment l'antigène sporozoïtaire commence à apparaître dans ces oocystes mûrs. Au cours d'une enquête transversale en Gambie, utilisant le même type d'anticorps monoclonal, une technique radio-immunologique et des moustiques broyés entiers, Collins (4) a trouvé une prévalence immunologique des sporozoïtes plus élevée que la prévalence parasitologique. Pour expliquer cette discordance, il a émis l'hypothèse qu'un certain nombre de moustiques testés étaient infectés par des oocystes mûrs, mais pas encore infectants (pas de sporozoïtes dans les glandes salivaires).

Cette hypothèse pourrait s'appliquer à certaines des discordances que nous avons observées pendant la première période d'étude entre l'ISI et l'ISP. En effet, ces discordances s'estompent lorsque les têtes et thorax des moustiques sont testés séparément des abdomens; et d'autre part, les écarts observés entre l'immunologie et la parasitologie deviennent plus faibles quand les pourcentages de femelles paires, et donc la survie du moustique, sont faibles (figure 4). Lorsque les moustiques ont une survie moyenne inférieure à 9 jours, les chances de trouver des porteurs d'oocystes mûrs sont très faibles et la probabilité d'avoir des faux positifs immunologiques est négligeable. Il nous semble donc important, lors des

enquêtes épidémiologiques utilisant une épreuve immunologique pour le dépistage des moustiques porteurs de sporozoïtes, de séparer les tête et thorax de l'abdomen de chaque moustique testé.

Toutefois, il faut remarquer que la prévalence des oocystes mûrs était relativement faible durant la deuxième période d'étude (0 % en octobre, 0,3 et 1,1 % en novembre, puis 0 % en décembre); ces valeurs nous paraissent trop faibles pour expliquer l'importance des écarts observés entre l'immunologie et la parasitologie pendant la première période, et d'autres facteurs interviennent probablement.

Ainsi, l'examen des glandes salivaires se faisant sans écrasement préalable et avec un objectif 10×, certaines glandes peu infectées peuvent ne pas éclater spontanément lors de la dissection et être alors considérées comme négatives, même par un examinateur entraîné. Dans ces conditions, l'ISP est probablement sous-estimé.

D'autre part, nous remarquons que les plus fortes discordances entre les deux méthodes de détection sont enregistrées quand les échantillons sont les plus petits (tableau 2). Pour d'aussi faibles prévalences d'infection, les variations dues aux fluctuations dans l'échantillonnage deviennent d'autant plus importantes que les échantillons sont de petite taille. Le petit nombre (relatif) de moustiques testés peut expliquer, en partie, les écarts observés entre l'ISI et l'ISP.

Enfin, le manque relatif de reproductibilité de l'ELISA (voir p. 88) peut aussi expliquer certaines discordances. En effet, quelques moustiques faiblement positifs une première fois peuvent être trouvés négatifs lors d'une deuxième épreuve; s'il s'agit de moustiques faux positifs, ils peuvent contribuer à renforcer les écarts observés entre l'ISI et l'ISP. Il paraît donc important de tester à nouveau les moustiques faiblement positifs.

En conclusion, l'ELISA est une technique qui semble spécifique pour le dépistage immunologique des moustiques infectés lorsqu'on prend soin d'enlever les abdomens des moustiques testés. Sa sensibilité est difficile à évaluer, compte tenu du fait que l'examen parasitologique de référence est lui-même imparfait dans notre étude. Des enquêtes complémentaires, dans d'autres situations épidémiologiques, sont nécessaires avant qu'on puisse affirmer la fiabilité de cette technique pour le dépistage de masse.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de l'antenne ORSTOM du Centre Muraz de l'Organisation de Coordination et de Coopération pour la Lutte contre les Grandes Endémies, à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso), et du Département de parasitologie de la Faculté de Médecine de l'Université catholique de Nimègue (Pays-Bas). Il a bénéficié d'une aide financière du programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de recherche et de formation concernant les maladies tropicales.

SUMMARY

DETECTION OF MOSQUITOS INFECTED WITH *PLASMODIUM FALCIPARUM* USING THE ELISA TEST

The feasibility and efficiency of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *P. falciparum*-infected mosquitos were studied. The relative lack of reproducibility of the test may be compensated for by the application of a correction factor that is based on the mean optical density (OD) of a positive reference sample. The corrected OD of every plate permits comparison between plates and between surveys. The critical value of positivity in the reaction is determined by using the distribution of optical densities in negative mosquitos; this value is chosen in such a way that 99.9% of the non-infected mosquitos have an OD below it (specificity=99.9%).

The sensitivity is determined by using a population of mosquitos experimentally infected and found positive by dissection of the salivary glands. This sensitivity, which varies with respect to the average yield of sporozoites in infected mosquitos, lies between 83% and 90%. The level of detection with the ELISA is fixed at a minimum of 1200 sporozoites per mosquito. The study investigated the variations in sensitivity and specificity and the efficiency of the test with respect to the transmission, the choice of the critical level of positivity, and the pooling of mosquitos.

The efficiency of the test in the field was investigated in a longitudinal study of the dynamics of *P. falciparum* transmission in south-west Burkina Faso in 1985. The immuno-

logical sporozoite index (ISI) followed the same course of development as the parasitological sporozoite index (ISP) and was at its peak when the dissection showed a maximum prevalence; it was zero when the dissection revealed no sporozoite-positive gland whatsoever. In the first part of this study, intact field-caught mosquitos were tested in the ELISA. The ISI always gave higher percentages than the ISP when the latter was positive. On the other hand, the ISI was zero when the ISP was also zero, which indicates excellent specificity of the immunological test. In the second part, the mosquitos were tested in the ELISA after removal of the abdomen. Under these conditions the ISI was very similar to the ISP. The authors consider the differences observed between ISI and ISP in the first part to be partly due to the detection in some mosquitos of maturing oocysts containing sporozoite antigen. These are necessarily false positives, but the immunological index of mature oocysts is too small to explain the importance of the discrepancy on its own.

The authors discuss the possibility of an underevaluation of the parasitological results and stress the importance of the size of the samples for a more precise immunological prevalence. It therefore seems that the ELISA is a specific technique whose sensitivity at least matches that of dissection.

BIBLIOGRAPHIE

- BURKOT, T. R. ET AL. Identification of malaria infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 33: 227-231 (1984).
- CHIANG, C. L. & REEVES, W. C. Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. *American journal of hygiene*, 75: 377-384 (1962).
- COLLINS, F. H. ET AL. Laboratory assessment of a species-specific radio-immunoassay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 22: 121-129 (1985).
- COLLINS, F. H. ET AL. First field trial of an immunoradiometric assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 33: 538-543 (1984).
- DETINOVA, T. S. *Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les diptères présentant une importance médicale, notamment certains vecteurs du paludisme*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1963 (Série de Monographies, N° 47).
- JENICEK, M. & CLÉROUX, R. *Epidémiologie: principes, techniques, applications*. Paris, Maloine, 1982, pp. 27-31.
- MACDONALD, G. *The epidemiology and control of malaria*. Londres, Oxford University Press, 1957.
- NARDIN, E. H. ET AL. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *P. falciparum* and *P. vivax*. *Journal of experimental medicine*, 156: 20-30 (1982).
- PRINGLE, G. A quantitative study of naturally-acquired malaria infections in *A. gambiae* and *A. funestus* in a highly malarious area of East Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 626-632 (1966).
- REICHLIN, M. Use of glutaraldehyde as a coupling agent for protein. In: *Methods in enzymology*, Vol. 70, Londres, Academic Press, 1980, pp. 159-166.
- ROBERT, V. ET AL. La transmission du paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Annales de la Société belge de Médecine tropicale*, 65 (Supplément 2): 201-214 (1985).
- SCHWARTZ, D. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 3° éd., 9° tirage 1986.
- VERHAVE, J. P. ET AL. The biotin-streptavidin system in a two-site ELISA for the detection of sporozoite antigen in mosquitoes. In: *Proceedings of the International Symposium on Malaria, Rio de Janeiro, 16-25 February 1986*.
- ZAVALA, F. ET AL. Monoclonal antibodies to circumsporozoite proteins identify the species of malaria parasite in infected mosquitoes. *Nature*, 299: 737-738 (1982).