

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

Secrétariat Général
B.P. 153 - Bobo-Dioulasso - Haute-Volta
Tél.: 911-79 - 911-91

4ee
ver. cour.
de ppts
B16366 et / 287037
B16367 / 287038

L'Elisa en micro-méthode dans le dépistage
immunologique de la Schistosomiase Mansonienne


- I. Modalités techniques, Δ
- II. Etude critique

C. BOUDIN, DESFONTAINE M.

XIXe CONFERENCE TECHNIQUE
BOBO-DIOULASSO DU 5 AU 8 JUIN 1979

N° 7.153/79.DOC.TECHN.OCCGE

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire
N° : 28747, ex 1
Cote : B

 ELISA EN MICRO-METHODE DANS LE DEPISTAGE
IMMUNOLOGIQUE DE LA SCHISTOSOMIASE MANSONIENNE.

Résumé

Une technique d'ELISA en micro-méthode, utilisant très peu d'Antigène et des prélèvements sériques sur confetti, a été mise au point et testée en dépistage de masse de la bilharziose intestinale à S.mansoni.

La réaction permet de dépister 85 % des sujets parasités, mais aussi 25 % de sujets non parasités. Le couple spécificité-sensibilité est insuffisant pour appliquer cette technique en séro-épidémiologie. Mais la méthode a une sensibilité suffisante pour pouvoir être appliquée en dépistage de masse des sujets parasités, en vue d'une chimiothérapie curative.

L'ELISA en micro-méthode dans le dépistage immunologique
de la schistosomiase mansonienne

I. Modalités techniques.

I. INTRODUCTION :

Il est intéressant de disposer d'une technique de dépistage immunologique des bilharzioses, applicable en médecine de masse et donnant des résultats plus fiables que les techniques parasitologiques des selles actuellement employées.

Notre choix s'est fixé sur la technique de l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Elle a pour principaux avantages sur les autres méthodes immunologiques ;

- une grande sensibilité,
- une diminution du coût du matériel,
- une consommation faible d'antigène et de sérum,
- une réalisation simple à partir de prélèvements sanguins faits sur confetti,
- enfin, la possibilité d'être réalisée en grande série.

II. PRINCIPE DE L'ELISA :

L'ELISA est une méthode immunoenzymatique qui a été décrite pour la première fois ^{par} Engvall et Perlman en 1972 (1). Le principe est original :

L'antigène (Ag) est fixé (adsorbé) spontanément sur les parois des tubes de polystyrène. Après lavage pour éliminer l'excès d'Ag non adsorbé, on ajoute le sérum du sujet contenant des Ac spécifiques contre l'Ag bilharzien. Ces Ac se fixent sur l'Ag adsorbé sur les parois des tubes. Un deuxième lavage élimine l'excès d'Ac non fixés. Dans un troisième temps, on ajoute un conjugué d'immunoglobulines anti-humaines de mouton, marquées à la peroxydase. Ces immunoglobulines de mouton vont se fixer sur les Ac humains donc sur le complexe Ag-Ac adsorbé. Un troisième lavage permet l'élimination des immunoglobulines non fixées.

La mise en évidence de la fixation du conjugué sur le complexe Ag-Ac se fait par une réaction enzymatique colorimétrique. On utilise l'eau oxygénée comme substrat et l'orthodianisidine comme donneur d'hydrogène. L'activité peroxydasique est révélée par la réaction cyto-chimique de Graham et Karnowsky (2). La peroxydase agit sur l'eau oxygénée en libérant l'oxygène qui active l'orthodianisidine. Le composé oxydé se colore en brun jaune. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de peroxydase fixée, donc à la quantité d'Ac fixés. Un sérum de sujet non bilharzien ne donne aucune coloration.

III. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE :

Au cours de nos expérimentations, nous avons étudié différentes techniques d'adsorption de l'Ag sur les parois de polystyrène, afin de pouvoir utiliser la plus faible dilution antigénique, tout en obtenant une coloration franche.

D'autre part nous avons recherché la dilution optimale Ag/AC donnant le meilleur contraste entre positif (+) et négatif (-). Enfin nous avons essayé de réduire les différents temps de contact lors de la réaction.

1. Adsorption de l'Ag :

Nous avons fait varier un grand nombre de paramètres : tampon de dilution, temps de contact, température, présence ou non de glutaral déhyde et types de plaques. Les différentes combinaisons sont résumées dans le tableau I.

Tableau I.

| Tampon PBS-Azid | Tampon carbonate pH9,6 |
|--------------------|------------------------|
| Glutaraldéhyde (+) | Glutaraldéhyde (+) |
| 25° une nuit | 25° une nuit |
| 25° 3h | 25° 3h |
| 37° une nuit | 37° une nuit |
| 37° 3h | 37° 3h |
| 56° 2h | 56° 2h |
| 56° 1h + agitation | 56° 1h + agitation |
| Glutaraldéhyde (-) | Glutaraldéhyde (-) |
| 25° une nuit | 25° une nuit |
| 25° 3h | 25° 3h |
| 37° une nuit | 37° une nuit |
| 37° 3h | 37° 3h |
| 56° 2h | 56° 2h |

1.1. Utilisation de la glutaraldéhyde :

Nous avons utilisé deux techniques de fixation en présence de glutaraldéhyde :

- soit en utilisant des plaques traitées à la glutaraldéhyde 1 % en eau distillée juste avant usage, pendant 1h à 4°, puis bien lavées avant la fixation de l'Ag,
- soit en associant la glutaraldéhyde 1 % à la solution antigénique.

L'utilisation de la glutaraldéhyde entraîne une fixation non spécifique des Ac et de l'immunoglobuline marquée sur les parois de polystyrène. Ce qui fait que la coloration est très intense même avec des sérums négatifs (voir courbe A). Nous avons abandonné cette méthode de fixation.

1.2. Temps d'adsorption :

En faisant varier les temps de contact de la solution d'Ag avec les parois de polystyrène, nous nous sommes rendu compte que la durée optimale était de une nuit (12 heures) (voir courbe B).

1.3. Variation des tampons de dilutions :

Nous avons utilisé deux tampons classiques : le PBS + Azid de Na (voir formule dans les réactifs) et le tampon carbonate pH 9,6 (voir réactifs).

La meilleure adsorption est obtenue avec le tampon carbonate (v. courbe C)

1.4. Variation de la température d'adsorption :

Nous avons fait varier la température au cours de l'adsorption antigénique, de 25° à 56° en passant par 37°. Comme l'illustre la courbe B, c'est à 37° que l'adsorption se fait le mieux. Nous bloquons ensuite la réaction en stockant les plaques adsorbées à +4°. Le temps de conservation est d'environ 10 jours.

1.5. Types de plaques utilisées :

Afin de limiter les quantités de tampon, de sérum et d'Ag utilisées nous avons préféré travailler sur des plaques de microtitration en polystyrène plutôt que sur des tubes. Nous avons testé plusieurs plaques : les plaques en V n'ont pas une contenance suffisante, les plaques à fond plat donnent de moins bons résultats que les plaques à fond en U.

Finalement nous avons opté pour les plaques "Microtiter" M 24A à fond en U.

Nous avons retenu comme meilleure combinaison : une fixation de l'Ag en tampon carbonate à 37° une nuit, sur des plaques "Microtiter" en polystyrène à fond en U.

2. Dilution optimale Ag/Ac :

Pour chaque réaction Ag/Ac, il existe une dilution donnant une réaction optimale.

Nous avons testé des dilutions ^{Dé}croissantes d'Ag (10,9,8,7, 6,5,4,3,2 micro-grammes d'Ag lyophilisé/ml) vis à vis de dilutions croissantes de sérum : de 1/5ème à 1/10240ème en progression géométrique de raison 2. Nous avons obtenu une courbe sinusoidale (voir courbe D1) avec une chute brutale des densités optiques pour des dilutions comprises entre 1/80ème et 1/1280ème. C'est dans cette zone que nous avons ensuite cherché la dilution optimale Ag/Ac en réalisant des dilutions sériques de 1/125, 1/200, 1/250, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/600, 1/1000⁴⁶⁰ et 1/2000. Les résultats sont illustrés par la courbe D2.

Nous avons finalement retenu une dilution antigénique de 5 micro-grammes d'Ag/ml pour une dilution sérique de 1/125. A la dilution classique 5 micro-grammes d'Ag pour une dilution sérique de 1/500, nous obtenons un certain nombre de sérums faiblement titrés, faussement négatifs. Aussi avons nous préféré accroître la sensibilité de la réaction au détriment éventuel de la spécificité, en diminuant la dilution sérique.

3. Temps de contact sérum/antigène :

Dans le but de raccourcir la durée de la manipulation, nous avons essayé de réduire le temps de contact Ag/Ac qui est classiquement de 3 heures à la température du laboratoire.

Les combinaisons durée-température ont été les suivantes : 3 heures à 25°, 2 heures à 25°, 2 heures à 37°, 1 heure à 37° avec agitation (courbe B).

Le meilleur résultat est obtenu pour un contact Ag/Ac de 3 heures à la température du laboratoire.

Les températures supérieures semblent inhiber la réaction et l'agitation semble décrocher les molécules adsorbées sur les parois de polystyrène.

4. Dilution optimale du conjugué :

Dans le but d'abaisser le coût de la réaction, nous avons testé des dilutions croissantes de conjugué (1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500 et 1/5000). De bons résultats, même pour des sérums faiblement titrés sont obtenus pour des dilution au 1/2000ème (courbe F.)

5. Temps de contact conjugué/Complexe antigène-anticorps

Habituellement le temps de contact est de 3 heures à 25°. Nous avons essayé de raccourcir la durée de contact (courbe E). Notre expérimentation confirme la supériorité de la durée classique. (3 heures à 25°).

6. Cinétique de la coloration :

La réaction de coloration étant une réaction enzymatique, il était important de savoir à quel moment la cinétique de la réaction atteignait son maximum. Nous avons enregistré les DO toutes les 10 minutes au cours de la réaction de révélation. L'intensité de la coloration passe par un maximum entre 50 et 60 minutes, puis décroît (courbe G). Nous devons donc stopper la réaction à son maximum d'intensité. (60') par 25 micro-litre d'HCl 5N dans chaque puits.

IV. EMPLOI DES CONFETTI :

L'un des intérêts de l'ELISA est sa faible consommation en sérum. Dans le but de pouvoir appliquer cette technique à un dépistage de masse, nous avons essayé de réaliser des dilutions sériques à partir d'éluats de sang séché sur confetti. Les avantages de la méthode sont multiples :

Les prélèvements sériques se trouvent simplifiés : ils se résument à une simple piqûre au bout du doigt, suivie de l'imprégnation sur les deux faces d'un papier filtre, avec la goutte de sang obtenue.

La conservation des échantillons est excellente à la température ambiante et à l'abri de l'humidité. D'autre part la piqûre d'un doigt est mieux acceptée par les populations que la prise de sang par ponction veineuse. Enfin les confettis sont d'une manipulation plus aisée que les tubes capillaires héparinés.

Le seul problème que pose leur emploi est la reproductibilité des résultats et la bonne corrélation confetti-sérum aux dilutions utilisées. Nous avons envisagé ces deux aspects du problème en étudiant successivement la quantité de sérum absorbée par confetti le temps d'élution maximale la reproductibilité des résultats d'un confetti à l'autre, et enfin la corrélation confetti-sérum.

1. Quantité de sérum absorbé par confetti.

Nous avons choisi une simple perforreuse de bureau donnant des confettis réguliers de 6 mm de diamètre. Une méthode de pesée portant sur 50 confettis nous a permis d'évaluer la quantité de sérum absorbé sur chaque confetti : 4,5 microlitres. En fait ce chiffre est certainement surévalué, car l'imprégnation sanguine est moins parfaite dans les conditions d'emploi sur le terrain. Si bien que nous avons retenu le chiffre de 4 microlitre comme la quantité moyenne absorbée par confetti. La dilution à employer étant de 1/125 ème il suffit d'éluer chaque confetti dans 0,5 ml de tampon.

2. Temps d'élution maximale.

Nous avons tenu l'élution pour maximale quand le confetti était entièrement décoloré et la réaction reproductible. Nous proposons l'élution suivante : 1 nuit à 4°.

3. Reproductibilité des résultats :

Le but de la manipulation était de démontrer l'homogénéité de l'absorption sanguine par le papier filtre. Nous avons réalisé 3 confettis successifs chez des sujets bilharziens confirmés et chez des sujets sains. Ces 3 confettis ont été testés le même jour sur une plaque afin d'éliminer toute autre variation (Adsorption antigénique, manipulation, différence entre lots d'Ag ou de tampon, différence de manipulateur etc...). Les résultats sont donnés dans le tableau I.

La comparaison des moyennes des 3 séries de confetti a été faite par l'intermédiaire d'une analyse de la variance qui ne montre pas de différence significative entre les 3 séries de mesures :

$$F_{42}^2 = 0,02 \quad \text{N.S.} \quad (F_{42}^2 \text{ 5 \%} = 3,23)$$

4. Etude de la corrélation confetti-plama

Nous avons réalisé cette étude en comparant sur la même plaque, des prélèvements sanguins faits le même jour à la fois sur tube capillaire hépariné et sur confetti, chez des malades schistosomiens et des sujets sains. La dilution utilisée était dans les deux cas de 1/125. Les phamas et confetti ont été traités à distance du prélèvement dans les mêmes conditions qu'une enquête épidémiologique sur le terrain avec traitement des échantillons lors du retour au laboratoire central.

Les résultats sont donnés dans le tableau II.

La comparaison des 2 séries de mesures a été faite au moyen d'un test t de Student Fisher, (séries appariées) qui ne montre pas de différence significative entre les 2 séries.

$$t_{34 \text{ ddl}} = 0,3 \quad \text{N.S.} \quad (t_{34 \text{ ddl}, 5 \%} = 2)$$

CONCLUSION :

Nous avons finalement retenu le mode opératoire suivant :

2. Mode opératoire

2.1. Fixation de l'Antigène :

Nous utilisons un Ag total de schistosome adulte. Nous réalisons une solution mère de 3 mg/ml en tampon carbonate, fractionnée en tubes de 100 microlitres et conservée au congélateur.

Les dilutions d'Ag sont réalisées à partir de cette solution mère : 20 micro-litres de solution mère suffisent pour une plaque. Avec 2 mg nous pouvons sensibiliser 25 plaques, ce qui permet de tester environ 2450 sérums. On dépose 200 micro-litres de la dilution antigénique en tampon carbonate (5 micro g/ml) dans chaque puits.

Tableau I : Reproductibilité des confetti

| N° sérums | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O |
|-----------|----|----|-----|----|----|-----|-----|----|----|-----|----|----|----|----|----|
| 1e serie | 64 | 80 | 107 | 79 | 50 | 94 | 101 | 71 | 92 | 78 | 70 | 73 | 73 | 72 | 91 |
| 2e serie | 52 | 75 | 107 | 70 | 52 | 107 | 105 | 74 | 78 | 101 | 64 | 85 | 70 | 75 | 85 |
| 3e serie | 49 | 88 | 107 | 68 | 45 | 107 | 89 | 77 | 78 | 89 | 85 | 73 | 72 | 72 | 85 |

Tableau II : Corrélation serum/confetti

| N° serum | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|
| sérum | 88 | 98 | 73 | 60 | 42 | 27 | 17 | 33 | 53 | 81 | 67 | 34 | 23 | 57 | 68 | 24 | 10 |
| confetti | 85 | 84 | 88 | 69 | 44 | 24 | 12 | 36 | 50 | 102 | 69 | 40 | 32 | 69 | 42 | 34 | 13 |

| N° sérums | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 28 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| serum | 51 | 83 | 33 | 40 | 24 | 66 | 26 | 58 | 37 | 31 | 42 | 22 | 31 | 35 | 31 | 20 | 28 |
| confetti | 44 | 80 | 41 | 43 | 4 | 64 | 23 | 58 | 32 | 33 | 32 | 26 | 34 | 29 | 36 | 30 | 30 |

| N° sérums | 35 | 36 |
|-----------|----|-----|
| serum | 95 | 107 |
| confetti | 80 | 104 |

Il faut 1 puits pour le blanc des réactifs

1 puits pour le témoin négatif

1 puits pour le témoin positif

1 puits par sérum à tester.

Nous recouvrons la plaque d'un couvercle et la disposons dans une boîte de Pétri avec un peu d'eau au fond, afin d'éviter toute évaporation de la solution antigénique. Nous laissons la plaque une nuit à 37°. Les plaques peuvent être ensuite stockées au frigidaire au moins 10 j.

2.2. Lavages :

L'excès d'Ag non adsorbé est éliminé par 3 lavages successifs en tampon PBS tween (le tween servant ici d'agent mouillant). Nous distribuons dans chaque puits 250 micro-litres de tampon à l'aide d'une seringue de Cornwall et laissons en contact une à deux minutes entre chaque lavage. Il suffit ensuite de vider la plaque par retournement brusque.

2.3. Incubation des sérums :

Nous préparons les dilutions sériques en plongeant chaque confetti dans des tubes à essais numérotés contenant 0,5 ml de tampon PBS tween. L'élution s'accomplit au cours d'une nuit. Nous répartissons ensuite 200 micro-litres de sérum dans chaque puits. Dans le puits du blanc des réactifs, nous mettons du tampon à la place du sérum.

Nous laissons incuber 3h à la température du laboratoire.

2.4. Lavages :

Nous lavons chaque plaque comme précédemment.

2.5. Incubation du conjugué :

Nous préparons la dilution du conjugué au 1/2000^{ème}, donc 10 micro-litres dans 20 ml de tampon PBS tween pour une plaque. Avec 1 ml de conjugué nous pouvons ainsi réaliser 100 plaques et tester environ 9 300 sérums. Nous répartissons 200 micro-litres de conjugué par puits et laissons incuber 3h à la température du laboratoire.

2.6. Lavages :

Nous procédons comme précédemment.

2.7. Révélation :

Nous déposons dans chaque puits 200 micro-litres de révélateur préparé extemporannément, nous laissons en contact 1h exactement puis stoppons la réaction enzymatique avec de l'HCL 5N : 25 micro-litres par puits.

2.8. Lecture :

La lecture se fait au spectrophotomètre. Nous réglons l'appareil sur 405 nm, faisons le zéro optique avec le blanc des réactifs et lisons chaque sérum automatiquement.

Les résultats sont exprimés en densité optique (DO).

/ A N N E X E I /1. Matériel utilisé :1.1. Les réactifs :Tampon carbonate Ph 9,6

| | |
|---|---------|
| - Carbonate de Na (sel cristallisé 10 H ₂ O) | 1,59 g |
| Bicarbonate de Na (0,035 M) | 2,93 g |
| Azid de Na | 0,2 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| (conservation 15j à 4°) | |

Tampon PBS tween

| | |
|--|---------|
| Chlorure de Na | 40 g |
| Phosphate disodique cristallisé 12 H ₂ O | 5,35 g |
| Phosphate monosodique cristallisé 2 H ₂ O | 1,53 g |
| Tween 20 | 2,5 ml |
| Eau distillée | 5000 ml |
| (conservation 1 semaine à la température ambiante) | |

Conjugué

Conjugué anti-immunoglobuline humaine de mouton, marqué à la peroxydase (Institut Pasteur).

Réactif de coloration :

Tampon phosphate Ph 6 :

| | |
|---------------------------|--------|
| (Phosphate monopotassique | 13,6 g |
| Eau distillée) | 100 ml |

Cette solution est à un pH de 4,4. On l'amène à un pH 6 en ajoutant environ 36,5 ml de la solution suivante :

| | |
|------------------------|-------|
| Phosphate bipotassique | 8,7 g |
| Eau distillée | 50 ml |

(conservation 15 j à 4°)

Au moment de l'emploi, mélanger :

| | |
|--|--|
| 0,3 ml de tampon phosphate pH 6 | |
| 0,3 ml d'eau oxygénée à 1 volume préparée extemporannément | |
| 30 ml d'eau distillée | |
| 0,25 ml d'une solution d'Orthodianisidine : | |

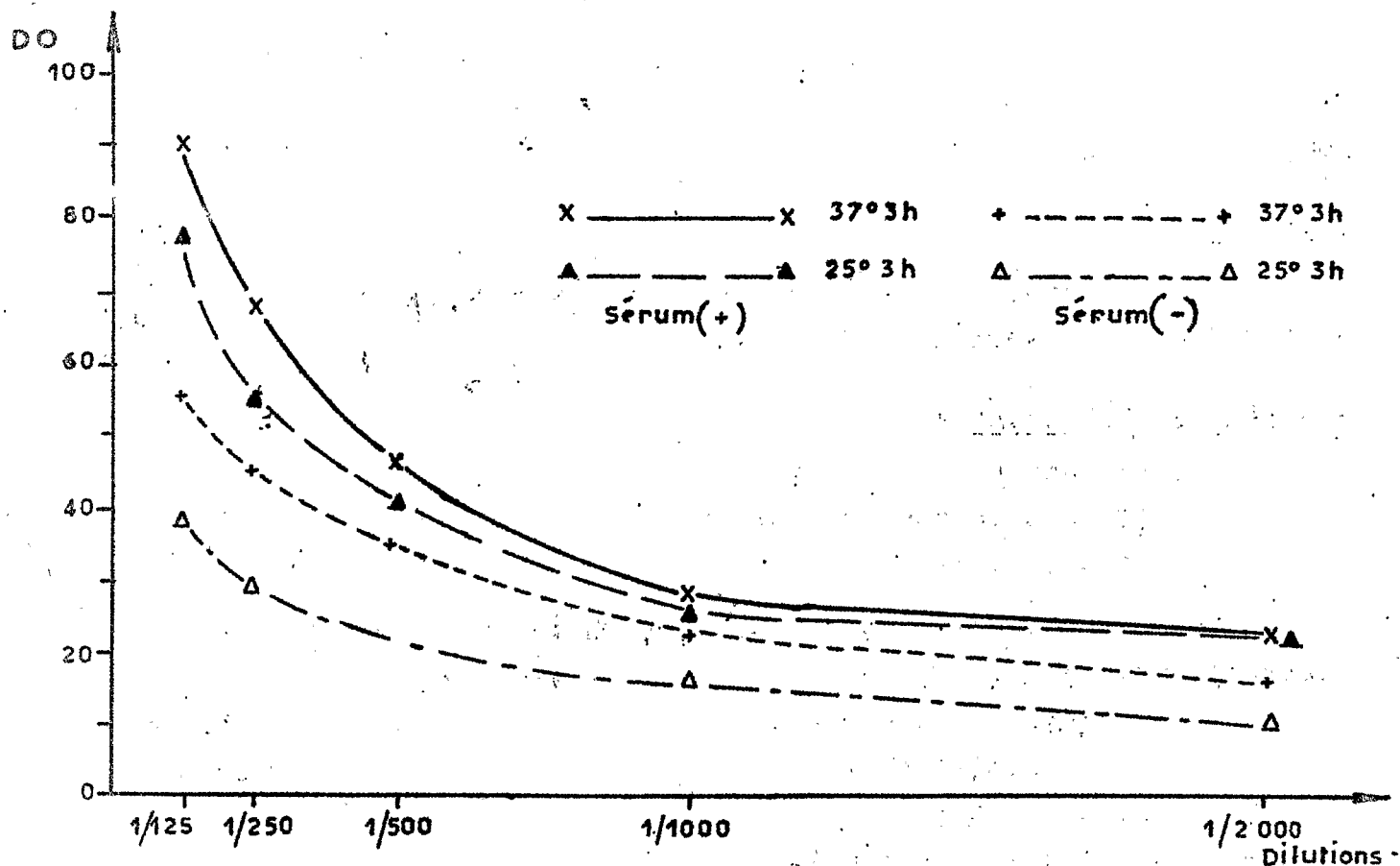
| | |
|--------------------------|--------|
| Orthodianisidine (sigma) | 5 mg |
| Méthanal | 0,5 ml |

(le révélateur ne se conserve pas).

1.2. Le matériel :

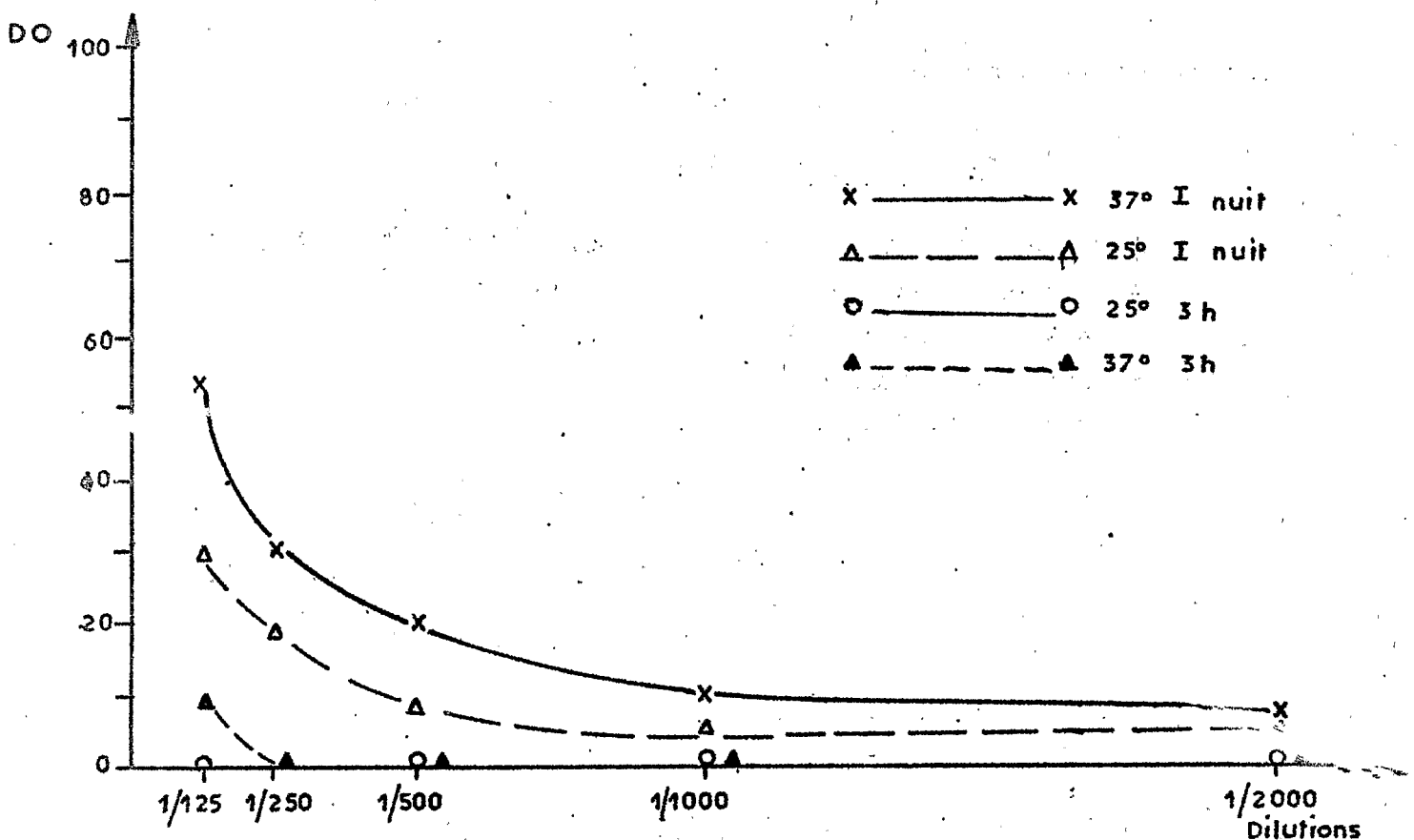
- plaques de microtitration COOK MICROTITER U M 24 A
- seringue Hamilton de 20 micro litres
- pipette type Eppendorf de 200 micro litres
- spectrophotomètre
- seringue de Cornwall 1 ml

Courbe A - Adsorption de l'Ag avec glutaraldéhyde.

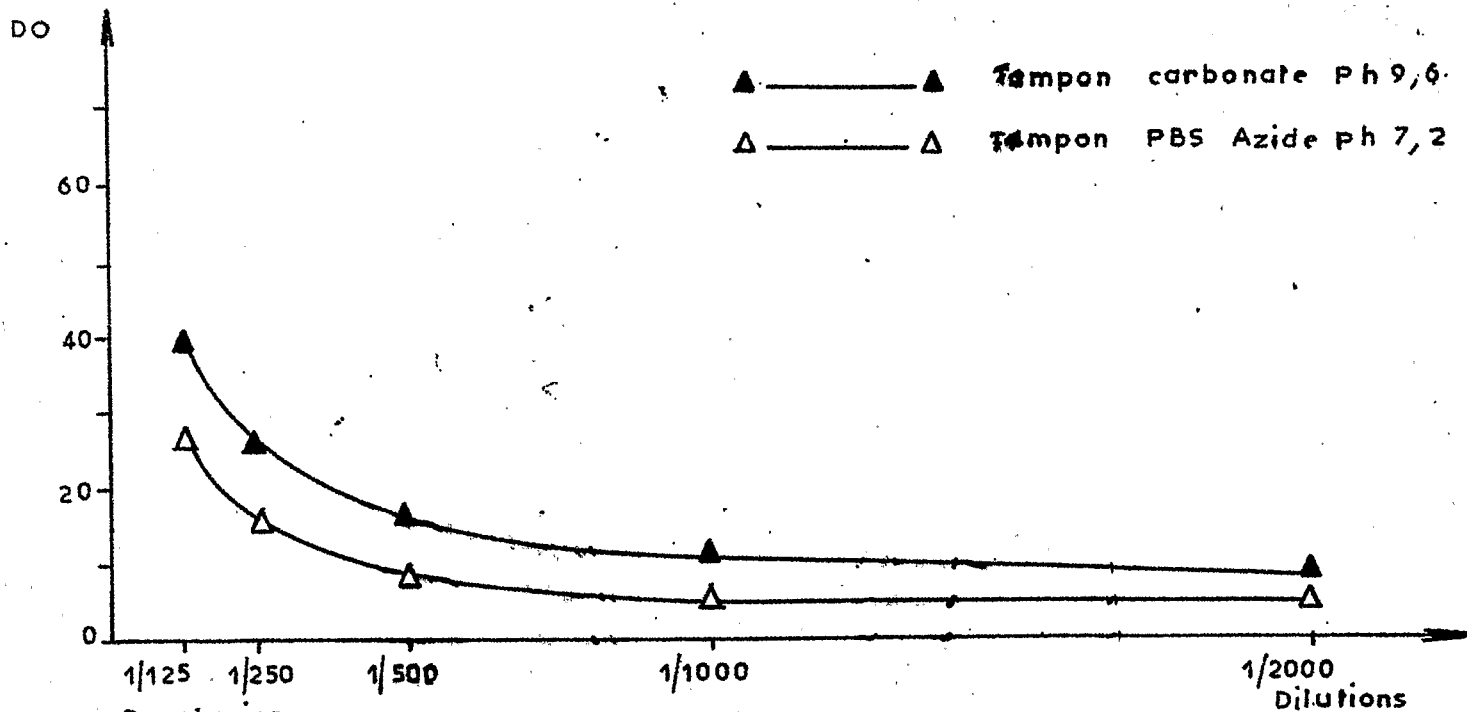


Conclusion - La glutaraldéhyde entraîne une fixation non spécifique des Ac et de Ig marquée.

Courbe B - Variation de la température et du temps sur l'adsorption de l'Ag.



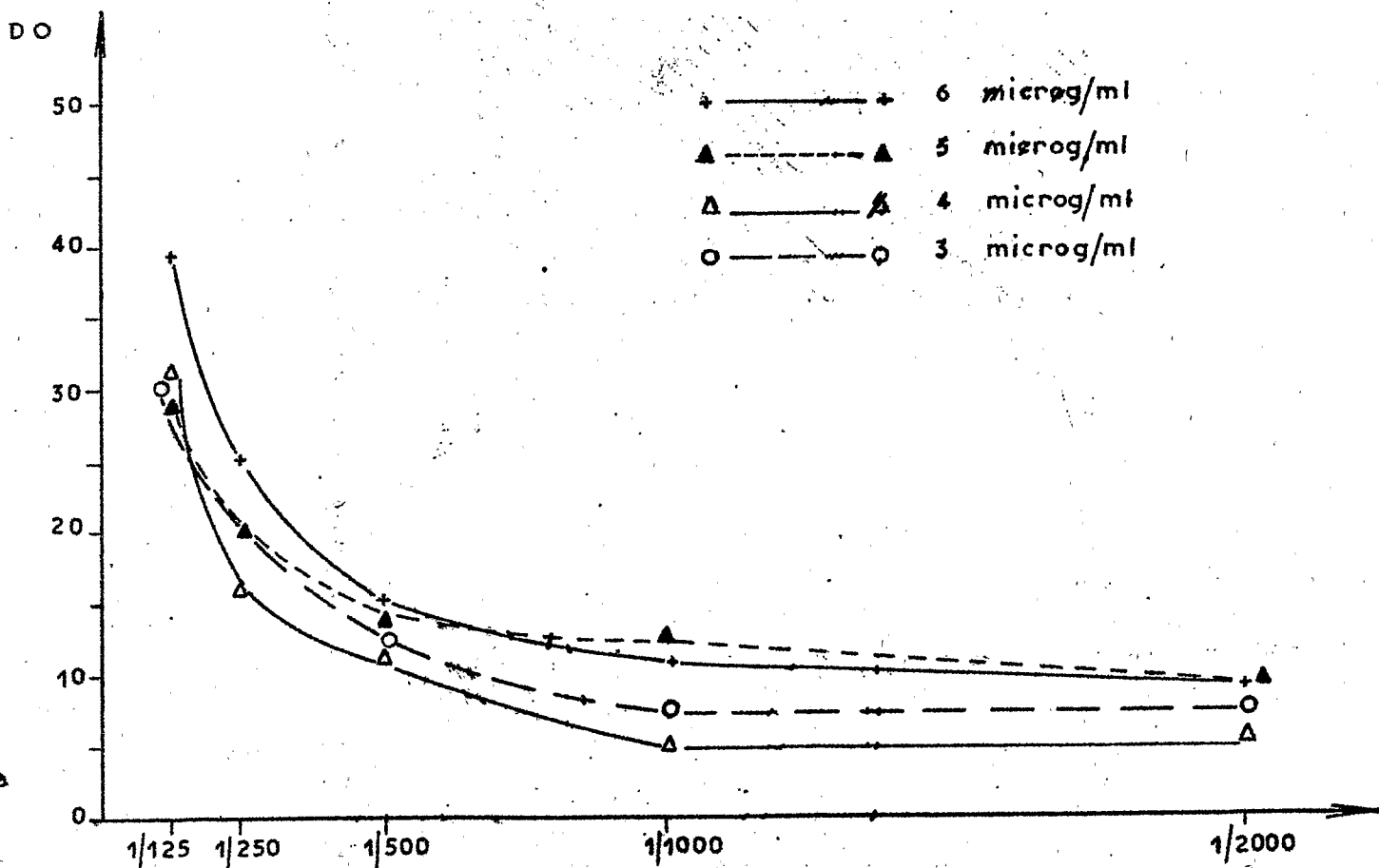
Courbe C - Adsorption de l'Ag dans différents tampons



Conclusion -

C'est en tampon carbonate que la coagulation est la meilleure.

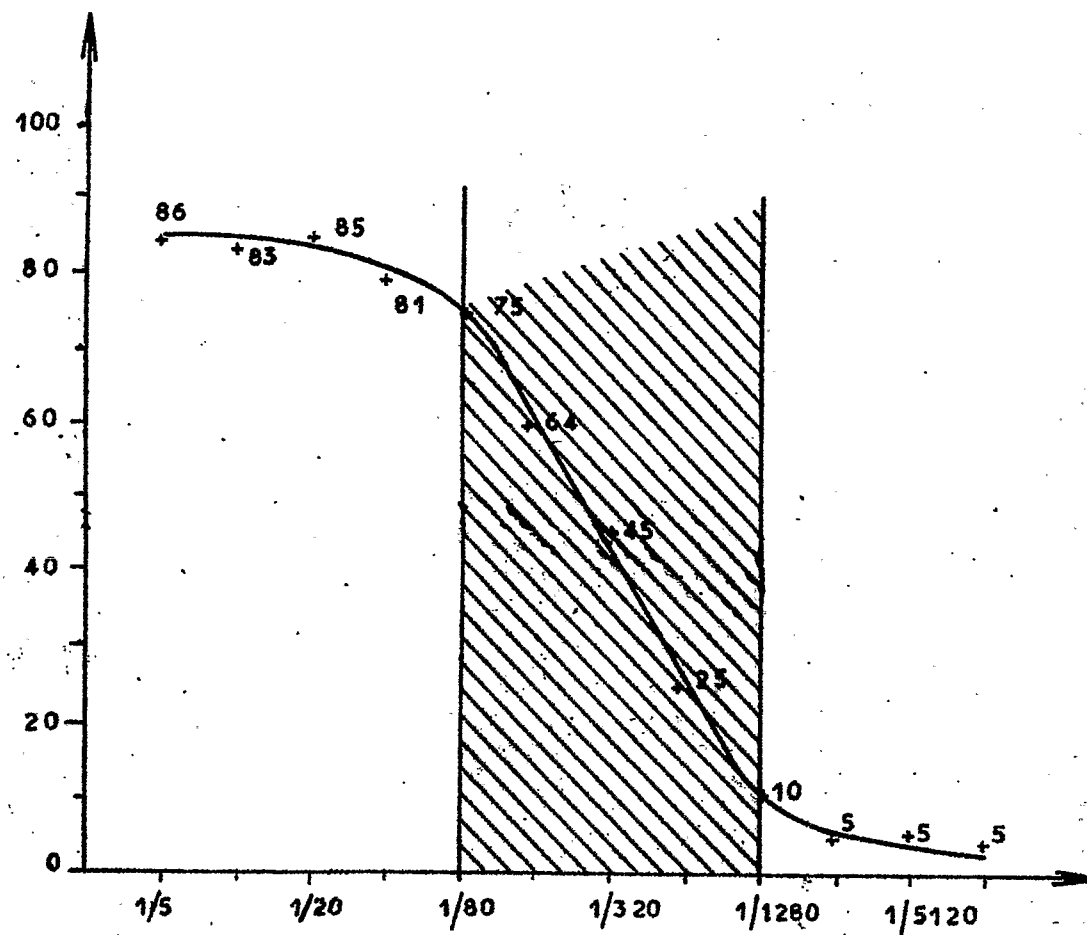
Courbe D - Dilutions optimales Ag/Ac



Conclusion -

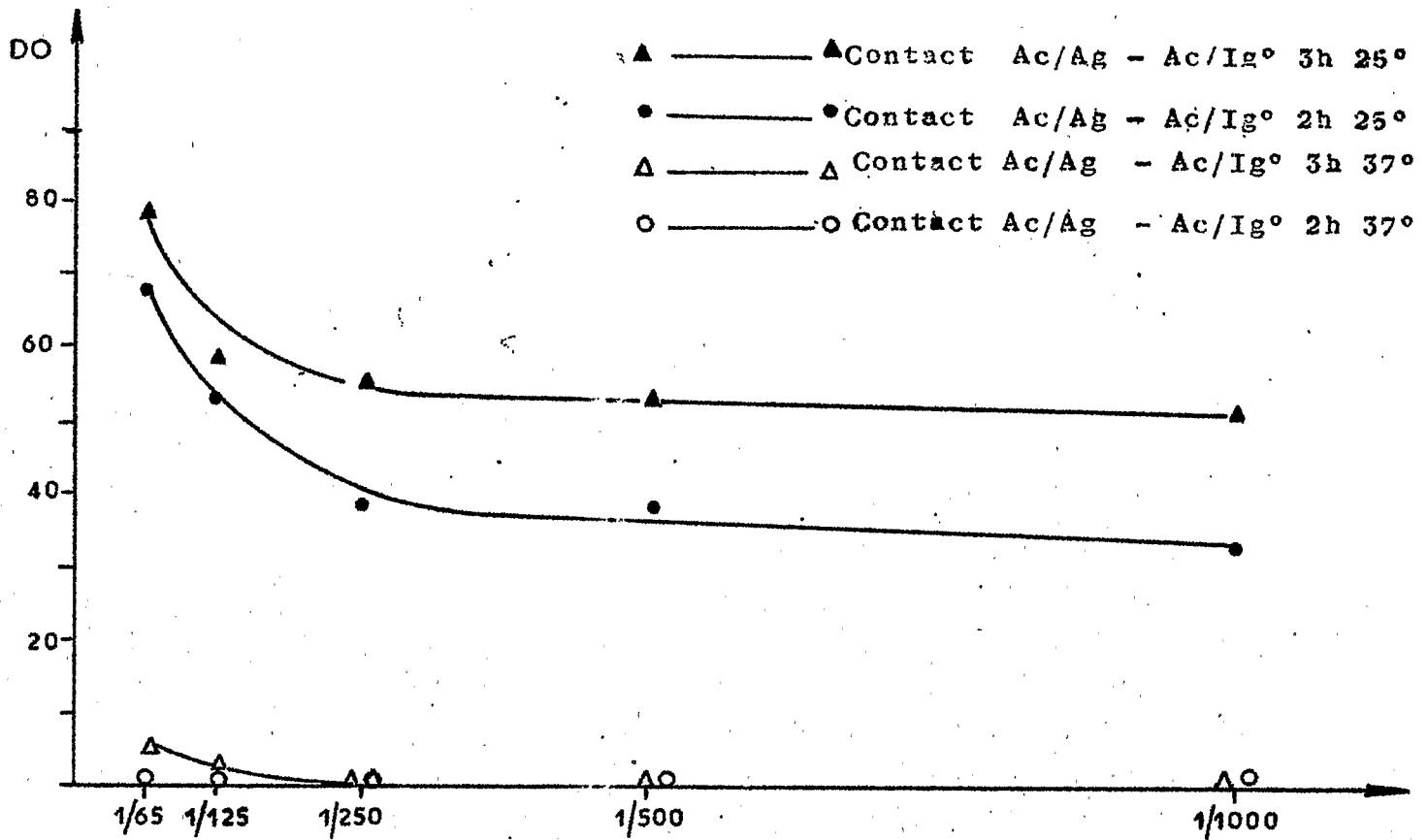
La meilleure dilution antigénique à utiliser c'est 5 microg/ml.

Courbe D 1 = Courbe des dilutions s eries



Conclusion - C'est pour des dilutions de 1/80   1/1280 que la variation des DO est la plus importante.

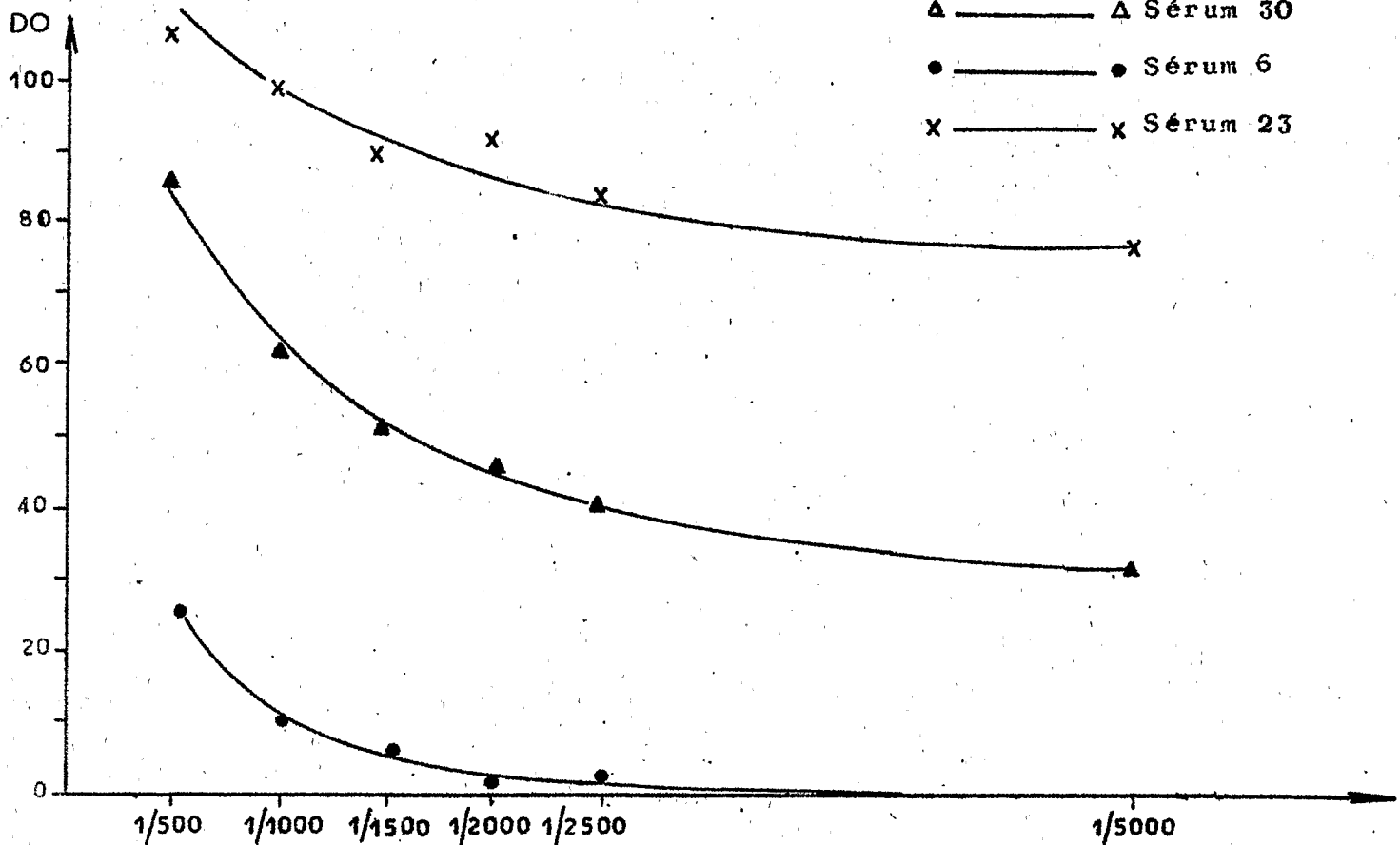
Courbe E - Etude des différents temps de contact Ag/Ac - Ac/Ig°



Conclusion -

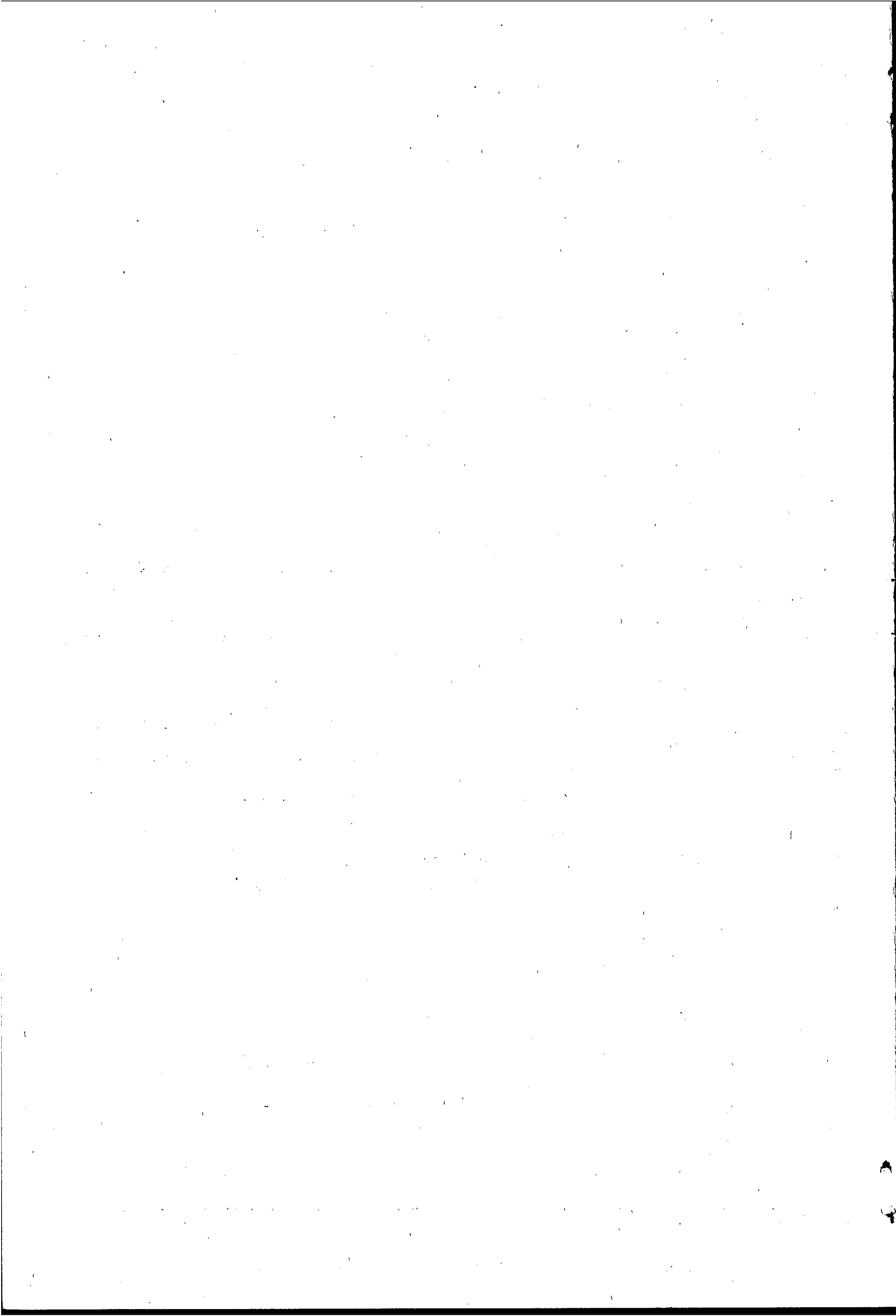
Bons résultats avec un temps de contact de 3h à 25°; résultats nuls à 37°.

Courbe F - Dilution optimale du conjugué.



Conclusion -

La meilleure dilution du conjugué 1/2000



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 (mésio-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 E.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).

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 considererons 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.

REPRODUCTIBILITE

(Etude sur serums)

VARIATION DES LOIS 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 |
| 2ème lot | 22 | 29 | 28 | 34 | 60 | 47 | 39 | 39 | 80 | 49 |
| 3ème 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 |

\overline{II} OUPLE \overline{II} SIBILITE - \overline{II} ECIFICITE
 =00=0

\overline{II}) (-) 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 %

\overline{II}) (-) 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 %

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 BOUT 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. LEBEVRE-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 mansoniennne 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 Etat n° 75 n° 6234
- (7) BOUT D. DUGIMONT 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.-

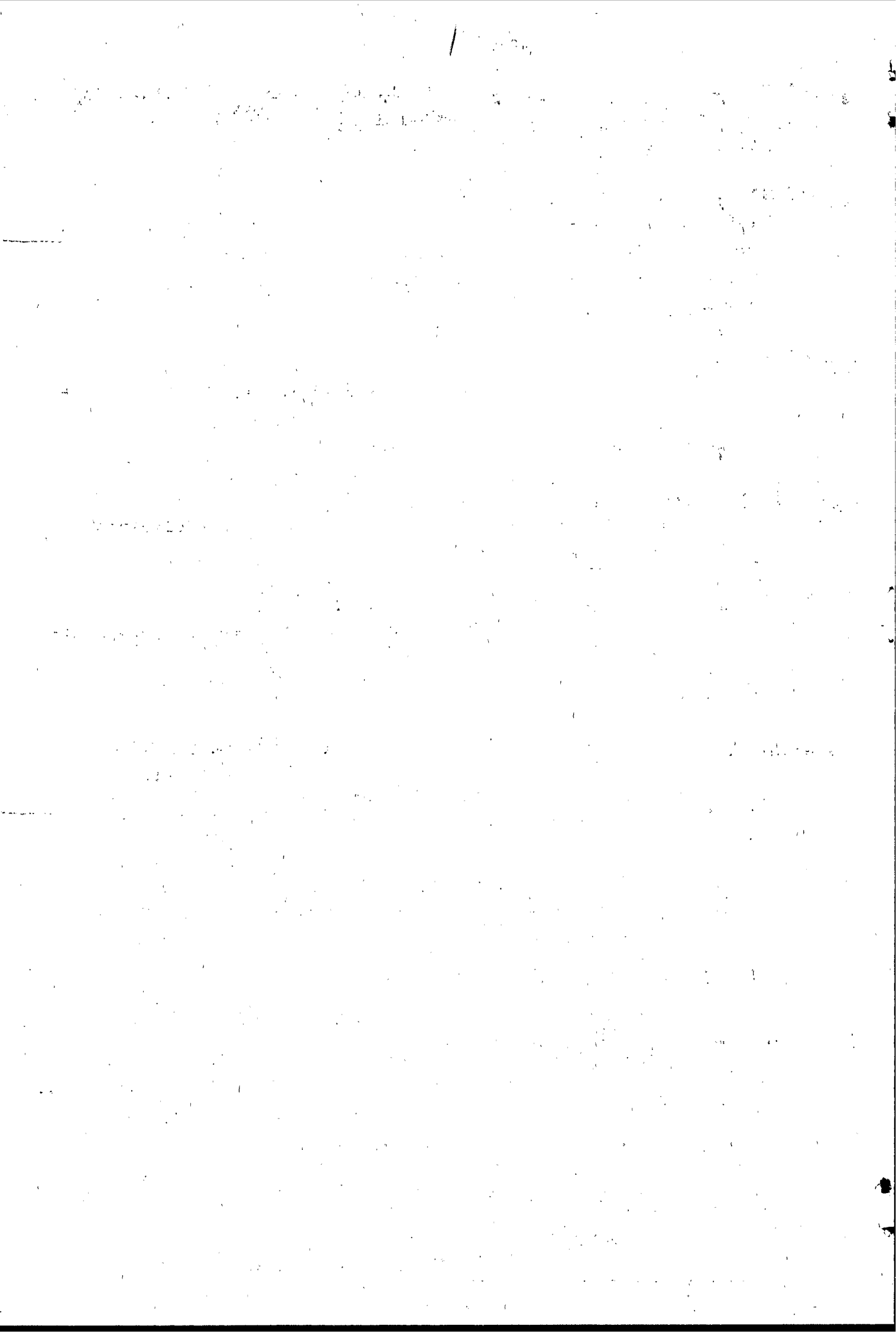
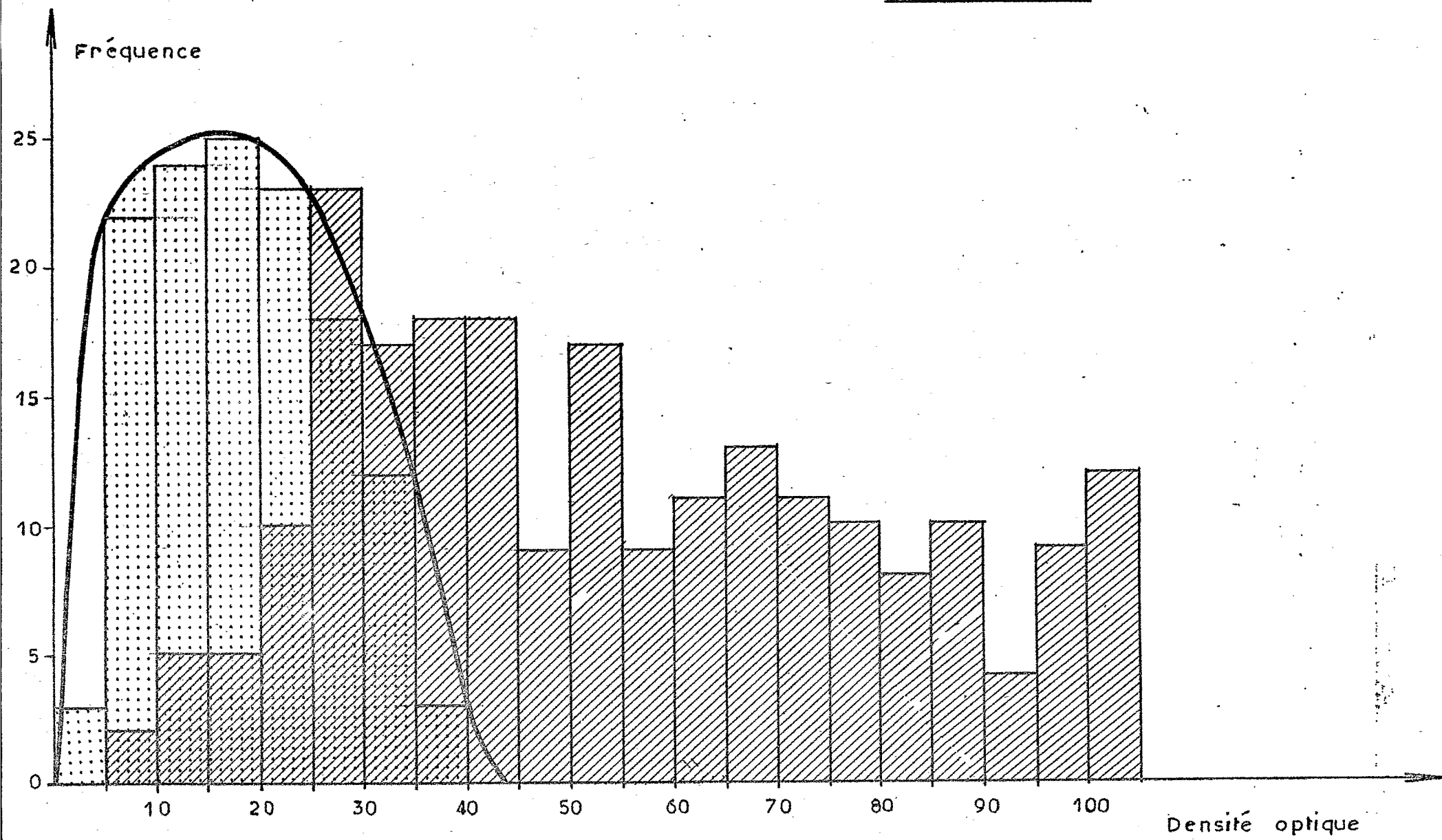


Diagramme - I - distribution des sérums.



Commentaire du Diagramme II

Le seuil supérieur de lecture des D.O. est de 107, ce qui explique la forme tronquée de la courbe observée.

Diagramme II - Courbe de distribution de sérums

