

**Mise au point et étude des performances d'un test ELISA
pour la détection d'anticorps dirigés contre
Cysticercus cellulosae chez l'Homme**

Dr Eyaba TCHAMDJA



Thèse présentée pour l'obtention partielle du grade de Master of Science (M.Sc.) en Santé
Animale Tropicale

Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold,
Département de Santé Animale
Antwerpen(Anvers), Belgique

Thèse de Master of Science en Santé Animale Tropicale (MSSAT)

Présentée et défendue le 10 juillet 2007

A l'Institut de Médecine Tropicale(IMT) Prince Léopold
Antwerpen(Anvers), Belgique

Composition du jury

Prof Dr B.Losson, Université de Liège, Président

Prof Dr A.Zoli, Université de Dschang, Membre

Dr G. Hendrickx, Avia-GIS, Membre²

Prof Dr P.Dorny, Dpt Santé Animale, Promoteur

Dr J.Van Den Abbeele, Dpt Parasitologie, Membre

Dr D.Geysen, Dpt Santé Animale, Membre

Dr R. De Deken, Dpt Santé Animale, Membre

Dr M.Madder, Dpt Santé Animale, Membre

Dr N.Praet, Dpt Santé Animale, Secrétaire

Dédicace

Je dédie ce travail à mes Fils J.C. Mazabalo et S. Essomanda pour qu'un jour Ils parviennent Et dépassent là où Je suis arrivé...

Le Travail, le Courage et la Patience transforment la pierre brute en pierre cubique...

Remerciements

Je remercie de tout mon cœur le l'Etat Belge et la DGCD pour cette bourse qu'ils ont eu la générosité de m'accorder pour me permettre de suivre cette formation de Master of Science en Santé Animale Tropicale.

Je tiens à remercier également mon Promoteur le Pr Pierre Dorny et son Assistant Nicolas Praet pour l'encadrement rigoureux et très rapproché qu'ils m'ont donné lors de cette thèse.

Je remercie aussi tous les Enseignants du Département de Santé animale de l'IMT pour cette formation qu'ils ont dispensée à la promotion 2007 et pour la disponibilité dont ils ont fait preuve à notre égard.

Je dis aussi merci au personnel du Laboratoire du Département de Santé Animale de l'IMT pour l'appui technique spontané et enthousiaste qu'ils m'ont apporté.

Table des matières

Dédicace	i
Remerciements	i
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Liste des abréviations	vi
Résumé	vii
Contributions de tiers	vii
Summary	viii
Chapitre I : Introduction	1
Chapitre II : Revue bibliographique	2
2.1. La cysticerose à <i>Taenia solium</i> : définition-Cycle biologique-épidémiologie	2
2.2. Diagnostic de la cysticerose à <i>T.solium</i>	4
2.2.1. Langueyage (Chez le porc)	4
2.2.2. L'inspection des viandes (Chez le porc)	4
2.2.3. Diagnostic anatomopathologique (Chez l'Homme)	4
2.2.4. L'imagerie médicale (Chez l'Homme)	5
2.2.5. Les tests immunologiques	5
2.2.5.1. Enzyme ImmunoElectroTransfer Blot (EITB)	5
2.2.5.2. ELISA pour la détection d'antigène (Ag-ELISA)	5
2.2.5.3. ELISA pour la détection d'anticorps (Ab-ELISA)	5
2.3. Traitement de la cysticerose	6
2.4. Contrôle de la Cysticerose	6
2.5. Rappel des objectifs du travail	6
Chapitre III. Matériels et méthodes	8
3.1. Etude de faisabilité du test ELISA	8
3.1.1. Protocole N°1 (annexe 1)	8
3.1.1.1. Organisation de la plaque ELISA	8
3.1.1.2. Déroulement du test	8
3.1.2. Protocole N°2 (annexe 1)	9
3.1.3. Interprétation des résultats ; seuil de positivité et ratio	9
3.1.4. L'antigène	10
3.1.5. Les contrôles positifs et négatifs	10
3.2. Etude de la répétabilité du test	10
3.3. Etude de la spécificité analytique du test	10

3.4. Etude de la prévalence de la cysticerose au sein d'une population de patients épileptiques du Kenya à travers la détection d'anticorps et d'antigènes circulants	11
3.5. Analyse des données	11
3.5.1. Etude de la répétabilité	11
3.5.1.1. Le coefficient de variation.....	11
3.5.1.2. La Valeur Résiduelle Relative (VRR).....	12
3.5.2. Etude de la prévalence apparente de la cysticerose dans une population de patients épileptiques du Kenya.....	12
Chapitre IV : Résultats	13
4.1. La faisabilité	13
4.2. Répétabilité.....	13
4.2.1. Répétabilité intra-runs	13
4.2.2. Répétabilité entre-runs	13
4.3. Spécificité analytique	16
4.4. Etude de la prévalence apparente de la cysticerose dans une population de patients épileptiques du Kenya	17
Chapitre V : Discussions et conclusion.....	18
5.1. La faisabilité	18
5.2. La répétabilité.....	18
5.2.1. La répétabilité intra-run.....	18
5.2.2. La répétabilité entre-run	18
5.3. La spécificité analytique.....	19
5.4. Etude de la prévalence apparente de la cysticerose dans une population de patients épileptiques du Kenya	20
5.6. Conclusion et perspectives	21
Références bibliographiques	22

Liste des tableaux

Tableau I : Infections hétérologues, homologues (<i>C.cellulosae</i>) et coinfections des échantillons utilisés pour l'étude de la spécificité analytique.	11
Tableau II : Comparaison des résultats (densité optique) des protocoles N°1 et N°2 sur base des contrôles positif et négatifs.	13
Tableau III : Coefficient de variation moyen par catégories d'échantillons (CVmoyen type) et coefficient de variation total (CVmoyen total) de tous les échantillons dans la répétabilité intra – runs et la répétabilité entre- runs obtenus à partir des ratios et des densités optiques (DO). 14	
Tableau IV : Réaction des sera de patients présentant des infections hétérologues et homologues (<i>C. cellulosae</i>) connues avec l'antigène de <i>C. cellulosae</i>	16

Liste des figures

Figure I Cycle biologique de <i>Taenia solium</i>	3
Figure II : Distribution mondiale de la cysticercose	4
Figure III : Représentation schématique de l 'organisation d'une plaque pour la réalisation du test Ab-ELISA.....	8
Figure IV : Dispersion des Valeurs Résiduelles Relatives (VRR) intra-runs obtenues à partir des densités optiques	14
Figure V : Dispersion des Valeurs résiduelle relatives(VRR) entre-runs obtenues à partir des densités optiques	15
Figure VI : Dispersion des Valeurs Résiduelles Relatives(VVR) intra-runs obtenues à partir des ratios.....	15
Figure VII : Dispersion des Valeurs Résiduelles Relatives(VRRs) entre-runs obtenues à partir des ratios.....	16
Figure VIII : Représentation des infections hétérologues et homologues (<i>C. cellulosa</i>) utilisées pour l'étude de la spécificité analytique.....	17

Liste des abréviations

°C : Degré centigrade Celsius.

Ab-ELISA : (Antibody ELISA) : ELISA pour la détection d'anticorps.

pH : Acidité

Ag-ELISA : (Antigen ELISA) : ELISA pour la détection d'antigènes.

CV : coefficient de variation.

DO: Densité optique

g : Force centrifuge

Pa: Prévalence apparente

SD : déviation standard

VRR : Valeur Résiduelle Relative

EITB :Enzyme-linked immunoElectrotransfertBlot

Résumé

Les performances d'un test ELISA pour la détection d'anticorps dirigés contre *Cysticercus cellulosae* chez l'homme ont été évaluées à travers un protocole utilisant comme antigène le fluide vésiculaire brut des cysticerques de *Taenia solium*. L'objectif était de valider un test peu coûteux et facilement applicable sur le terrain. Deux protocoles ont été comparés. La répétabilité intra-run et entre-runs de la méthode ont été évaluées et la spécificité analytique étudiée à travers les réactions croisées éventuelles avec 8 infections hétérologues. Enfin une étude comparée de la prévalence apparente de la cysticerose avec un test ELISA pour la détection d'antigènes circulants (Ag-ELISA) a été réalisée sur 647 séra provenant de patients épileptiques du Kenya. Le test a présenté une répétabilité intra-run très satisfaisante (CVtotal = 9,67 %) mais a montré une grande variabilité dans la répétabilité entre-runs (CVtotal = 33,06 %). L'étude de la spécificité analytique a montré plusieurs réactions croisées. La prévalence apparente au sein de la population de patients épileptiques kényans était de 32,30 % alors qu'aucun individu ne s'est révélé positif pour la détection des antigènes ; ceci se traduisant soit par la présence de faux positifs à l'Ab-ELISA due aux réactions croisées, soit par la présence de faux négatifs à l'Ag-ELISA due à l'état de dégénérescence des cysticerques ou au faible nombre de cysticerques incriminés, indétectables par la technique. La nature brute de l'antigène peut expliquer les réactions croisées observées et sera très probablement la cause d'une faible spécificité diagnostique.

Les premières étapes du processus de validation du test ELISA entreprises dans cette étude montrent que celui-ci présente deux problèmes majeurs de répétabilité et de spécificité. Néanmoins, ce test à l'avantage d'être simple, facile à entreprendre et peu coûteux et représente ainsi une méthode intéressante de screening avec confirmation des positifs à l'aide d'un test plus spécifique.

Mots clés : Validation - ELISA - anticorps – *Cysticercus cellulosae-Taenia solium* – cysticerose - répétabilité- spécificité - Kenya

Contributions de tiers

Ce travail a vu la contribution de tierces personnes.

L'antigène du liquide vésiculaire de cysticerques de *Taenia solium* a été préparé et fourni par Dr Nicolas Praet, assistant au Département de Santé Animale de l'IMT. Il en de même pour le protocole Ab-ELISA de base.

Les échantillons de sera de même que les contrôles positifs et négatifs ont été fournis par le Département de Santé Animal de l'IMT.

L'analyse des 647 échantillons de Kenya par l'Ag-ELISA a été réalisée par le personnel technique du Laboratoire du Département de Santé animale de l'IMT.

Summary

The performances of an ELISA for the detection of the antibody response in humans against crude cyst fluid of cysticerci of *Taenia solium* were assessed. The objective was the validation of a cheap test easy to implement in the field. First, two ELISA protocols were compared. Next, the within-run and between-run repeatabilities were assessed and the analytical specificity evaluated by assessing the level of cross reactivity of the test with 8 heterologous infections. Finally, a study on the apparent prevalence of cysticercosis was performed by comparing the results of the Ab-ELISA with those of an ELISA for the detection of circulating antigen of the parasite (Ag-ELISA) on 647 human serum samples from Kenyan patients presenting signs of epilepsy. The test showed a very acceptable intra-run repeatability ($CV_{total} = 9,67\%$), however, the between-run repeatability was excessively high ($CV_{total} = 33,30\%$). The study of the analytical specificity showed several cross reactions. The Ab-ELISA gave an apparent prevalence of 32,30% among the Kenyan epileptic patients, while none of the patients had circulating antigens. This contrasting result may be explained, either by the presence of cross reactions, or by the characteristics of the Ag-ELISA that only detects the presence of viable cysticerci, while NCC is in most cases due to the presence of degenerating or dead cysts in the brain. In addition, the sensitivity of the Ag-ELISA may be lower in the case of light infections. The observed cross reactions may be explained by the use of a crude antigen preparation and are responsible for a low diagnostic specificity. The validation of the Ab-ELISA demonstrated major shortcomings of this test, i.e. a low repeatability and a low specificity. Nevertheless, this Ab-ELISA is a cheap and simple test that can be used as a screening tool for human cysticercosis. However, confirmation of positives should be done with a more specific test.

Key words: Validation - ELISA - antibody – *Cysticercus cellulosae-Taenia solium* – cysticercosis - repeatability- specificity - .Kenya

Chapitre I : Introduction

Cysticercus cellulosae ou cysticerque de *Taenia solium* est un métacestode qui cause une zoonose parasitaire appelée cysticercose. La cysticercose est une maladie importante du point de vue sanitaire et socioéconomique dans les pays d'Amérique Latine, d'Afrique et d'Asie (OMS, 2002; Sciutto *et al.*, 2000; Geerts, 1995). Dans ces pays, les conditions d'hygiène insuffisantes et l'élevage de porcs en divagation sont des facteurs qui favorisent le développement de la maladie (OMS, 2002; Assana *et al.*, 2001). Cette maladie peut être diagnostiquée chez un individu ou dans une population d'individus à l'aide des tests de mise en évidence des cysticerques ou de lésions de cysticerques, ou à l'aide des tests immunologiques de détection d'antigènes du parasite ou d'anticorps dirigés contre le parasite (Dorny *et al.*, 2003; White, 1997). Les tests immunologiques pour la détection d'antigènes permettent de faire le diagnostic des infections actives alors que les tests immunologiques pour la détection d'anticorps mesurent l'exposition au parasite. Les tests immunologiques pour la détection d'anticorps dirigés contre le parasite utilisent différents antigènes de cysticerque, allant des antigènes bruts aux antigènes purifiés. L'enzyme linked immunoelectrotransfert blot (EITB) qui utilise des antigènes purifiés sur gel (Tsang *et al.*, 1989) est le test qui donne les meilleurs résultats en terme de sensibilité et de spécificité dans la détection des anticorps dirigés contre les cysticerques. Cependant l'EITB est un test coûteux et laborieux pour son utilisation dans les laboratoires de routine ou dans les études épidémiologiques, particulièrement dans les pays en développement où la cysticercose est endémique (Arruda *et al.*, 2005). Au niveau des antigènes bruts, les antigènes de liquide vésiculaire ont montré dans les tests Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) de meilleures performances par rapport aux autres antigènes comme les antigènes du cysticerque entier, les antigènes membranaires et les antigènes de scolex (Arruda *et al.*, 2005). L'objectif de ce travail est de mettre au point un test de détection d'anticorps qu'on pourra utiliser sur le terrain pour un diagnostic épidémiologique de la cysticercose dans les populations humaines exposées. Pour cela, notre choix a porté sur un test ELISA pour la détection d'anticorps (Ab-ELISA) à base d'antigènes de liquide vésiculaire de cysticerques de *Taenia solium*. Les résultats attendus dans ce travail sont entre autre la détermination des caractéristiques préliminaires qui entreront par la suite dans le processus de validation du test. Pour ce faire nous mènerons dans un premier temps, une étude de répétabilité et de spécificité analytique. Nous examinerons en suite un lot de 647 sera provenant du Kenya prélevés chez de patients présentant des signes d'épilepsie. Ces sera qui seront examinés à l'aide du test ELISA pour la détection d'anticorps et du test ELISA pour la détection d'antigène (Ag-ELISA) nous permettra de juger la capacité diagnostique préliminaire de notre test.

Chapitre II : Revue bibliographique

2.1. La cysticerose à *Taenia solium* : définition-Cycle biologique-épidémiologie

La cysticerose à *T. solium* est une maladie parasitaire causée par la forme larvaire du parasite appelée *Cysticercus cellulosae*. L'hôte définitif est l'homme, et les hôtes intermédiaires sont le porc domestique, le sanglier et l'homme. Chez le porc les œufs ingérés vont éclore dans le tube digestif et les onchosphères libérées vont migrer dans les muscles où ils se transformeront en larves appelées cysticerques (*Cysticercus cellulosae*). L'homme s'infecte en ingérant la viande de porc ladre mal cuite et développe la forme adulte du parasite appelée ténia. Dans certains cas, l'homme peut également s'infecter en ingérant des œufs et développer la forme larvaire de la maladie (Figure I). Les larves migrent préférentiellement dans les muscles (causant la cysticerose) ainsi que dans le système nerveux central (causant la neurocysticerose) (OMS, 2002).

La cysticerose est une maladie cosmopolite retrouvée davantage dans les pays en voie de développement (Figure II). En effet dans ces pays, le manque d'hygiène, le caractère traditionnel de l'élevage, les abattages clandestins, l'insuffisance de couverture de l'inspection vétérinaire et la méconnaissance de la maladie sont des facteurs qui favorisent son développement (Phiri *et al.*, 2003; OMS , 2002 ; Assana *et al.*, 2001)

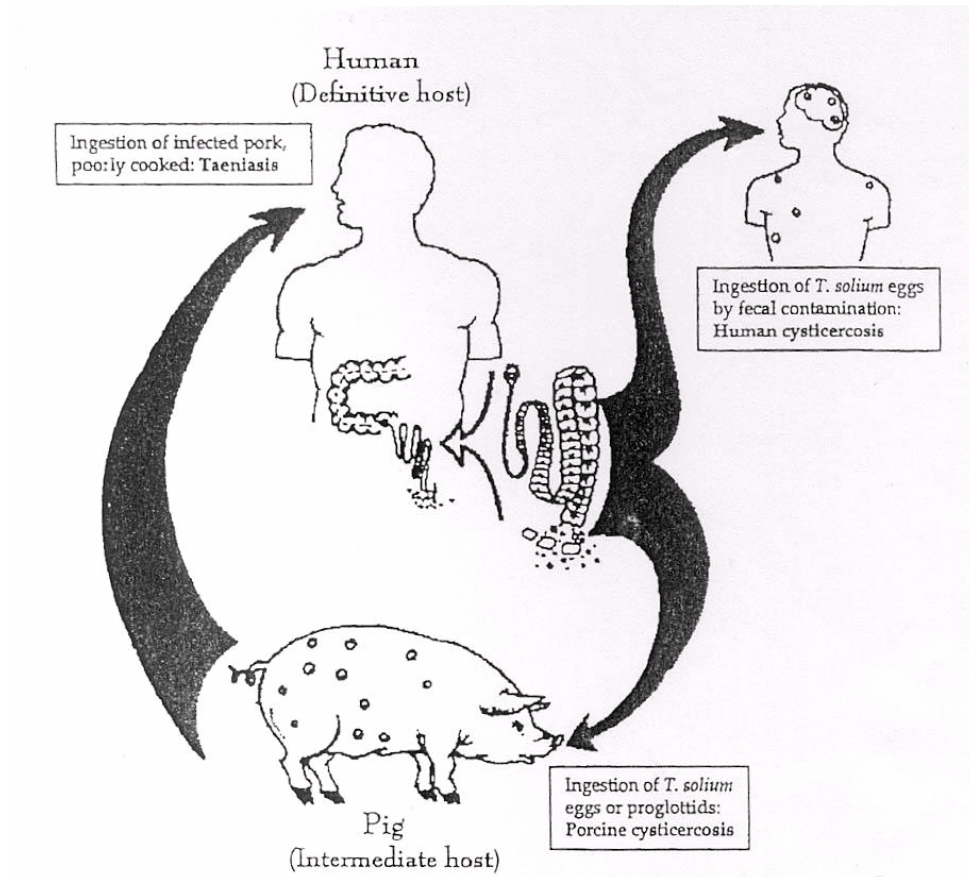


Figure I Cycle biologique de *Taenia solium*.
 Source : Garcia *et al* (2003)

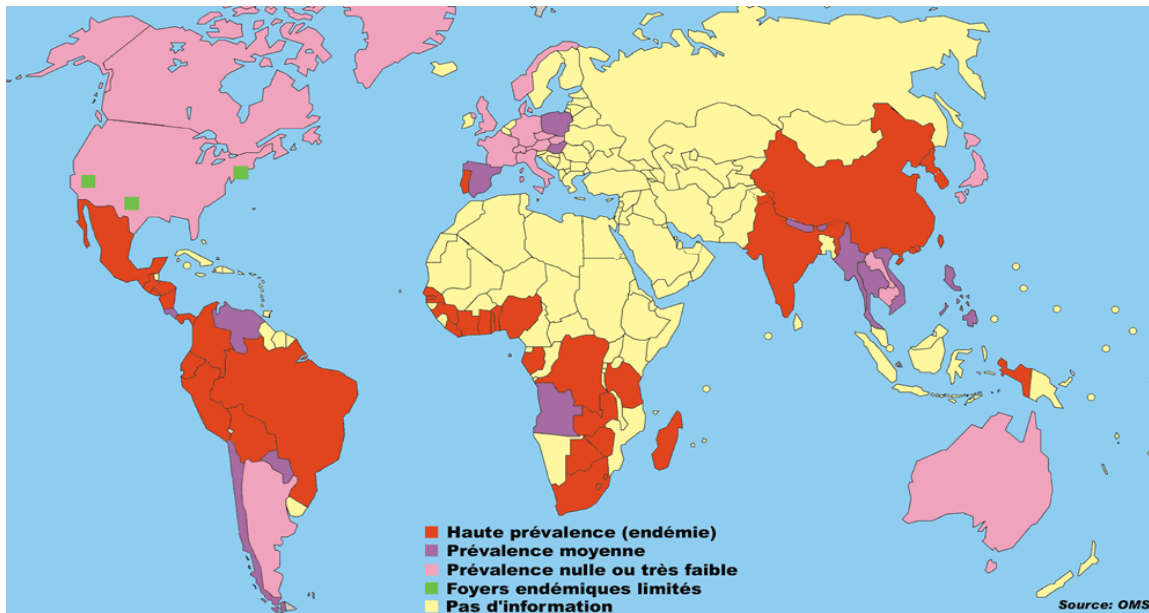


Figure II : Distribution mondiale de la cysticerose
 Source : OMS(2002)

2.2. Diagnostic de la cysticerose à *T.solium*

Le diagnostic de la cysticerose chez le porc ou chez l'homme peut se faire par des tests visuels, anatomopathologique, d'imagerie médicale et des tests immunologiques.

2.2.1. Languageage (Chez le porc)

Le languageage consiste à palper et à explorer la face ventrale de la langue de l'animal à la recherche des cysticerques (Gonzalez, 1990). Des études menées par Dorny *et al.* (2004) ont montré une sensibilité et une spécificité du languageage respectivement de 16,1% et 100%. Le languageage ne permet qu'une détection des animaux massivement infectés et son efficacité dépend de l'expérience de l'explorateur (Phiri *et al.*, 2006).

2.2.2. L'inspection des viandes (Chez le porc)

Elle consiste en une incision des localisations électives, notamment les masséters, la langue, le diaphragme, le cœur et les muscles striés pour la recherche des vésicules ladres. Dorny *et al.* (2004) ont rapporté pour cette méthode une sensibilité de 38,7% et une spécificité de 100%.

2.2.3. Diagnostic anatomopathologique (Chez l'Homme)

Chez l'Homme, l'examen de choix dans les formes extraneuronales de la cysticerose est l'examen anatomopathologique des biopsies des nodules sous-cutanés ou intramusculaires. Il met en évidence une vésicule contenant un liquide et un scolex unique invaginé porteur d'une double couronne de crochets caractéristiques. Cette vésicule, de la taille d'un grain de riz, est contenue dans une enveloppe kystique de structure fibreuse pouvant mesurer 0,5 à 2 cm de long (Aubry., 2005).

2.2.4. L'imagerie médicale (Chez l'Homme)

L'imagerie médicale est utilisée dans le diagnostic de la neurocysticercose chez l'homme. Il s'agit de la Tomodensitometrie et de la Résonance Magnétique qui permettent de mettre en évidence le nombre, la topographie des lésions ainsi que le degré des réactions inflammatoires dans le cerveau du patient. (Garcia & Del Brutto, 2003). Toutefois, l'accès à ces techniques modernes dans les pays pauvres reste très limité et financièrement peu abordables (Mandal *et al.*, 2006 ; Garcia & Del Brutto, 2003).

2.2.5. Les tests immunologiques

Plusieurs techniques immunologiques ont été décrites pour le diagnostic de la cysticercose. On retrouve entre autre la fixation du complément, l'hémagglutination, l'agglutination sur latex les techniques immunoblot et les techniques ELISAs (Mandal *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1997; Brandt *et al.*, 1992; Garcia & Sotelo, 1991; Tsang *et al.*, 1989; Rosas *et al.*, 1986). A l'exception de l'Enzyme-linked Immuno-electro Transfer Blot (EITB), les performances du test Ab-ELISA restent supérieures aux autres techniques (Arruda *et al.*, 2005).

2.2.5.1. Enzyme-linked Immuno-electro Transfer Blot (EITB)

L'Enzyme-linked Immuno-electrotransfer Blot est un Western Blot modifié qui consiste à révéler sur papier nitrocellulose les bandes de glycoprotéines spécifiques au *Taenia solium* à travers une réaction avec les anticorps contenus dans le sérum du patient. Le test utilise des antigènes glycoprotéiques purifiés (lentil lectin-purified glycoprotein ou LLPG). La sensibilité et la spécificité sont respectivement de 98% et 100% chez l'homme (Tsang *et al.* 1989). Chez le porc la sensibilité et la spécificité sont de 100% (Tsang *et al.*, 1991). Malgré ses bonnes performances, l'EITB reste une technique laborieuse et coûteuse pour les laboratoires dans les pays en voie de développement où la cysticercose est endémique (Arruda *et al.*, 2005).

2.2.5.2. ELISA pour la détection d'antigène (Ag-ELISA)

C'est un ELISA développé pour la détection d'antigènes circulants de cysticercose en utilisant des anticorps monoclonaux (Brandt *et al.*, 1992). Dorny *et al.*, (2004) ont noté une sensibilité et une spécificité de l'Ag-ELISA respectivement de 86,7% et 94,7% chez le porc. Chez l'homme, la sensibilité et la spécificité du test sont respectivement de 85% et 92% (Garcia *et al.*, 2000). Cette technique a l'avantage d'identifier les sujets porteurs d'infection active (Nguekam *et al.*, 2003 ; Erhart *et al.*, 2002 ; Garcia *et al.*, 2000). Toutefois, elle présente des réactions croisées avec *Taenia hydatigena* chez le porc (Rodriguez-Hidalgo *et al.*, 2006; Dorny *et al.*, 2004).

2.2.5.3. ELISA pour la détection d'anticorps (Ab-ELISA)

Cette technique permet la détection des anticorps dirigés contre le métacyste de *T. solium* pour le diagnostic de la cysticercose. Elle est basée sur l'utilisation d'antigène de cysticercose de *T. solium* ou de *Taenia crassiceps* (Arruda *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000). Les préparations de ces antigènes peuvent être faites à base du kyste entier ou des parties du kyste comme le fluide vésiculaire, le scolex et la membrane. Les performances de ces tests sont très variables suivant le type d'antigène utilisé, les techniques de préparation de l'antigène et selon qu'il s'agisse des infections de terrains ou

expérimentales. Les auteurs ont ainsi observé des valeurs allant de 35,8 à 100 % pour la sensibilité et de 91,7 à 100 % pour la spécificité chez le porc (Dorny *et al.*, 2004 ; Nunes *et al.*, 2000 ; Pinto *et al.*, 2000) . Chez l'homme, ces performances sont de 47,8 à 95 % pour la sensibilité et de 81 à 96,2% pour la spécificité (Arruda *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2000 ; Mandal *et al.*, 2006). Les meilleures performances sont obtenues avec les antigènes de fluide vésiculaire bien que, comme avec les autres antigènes, des réactions croisées avec des infections hétérologues aient été observées (Arruda *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000 ; Baily *et al.*, 1988).

2.3. Traitement de la cysticercose

Le traitement de la cysticercose humaine fait appel à l'utilisation de médicaments antiparasitaires (albendazole à 15mg/kg/jour pendant 7 à 15 jours ou du praziquantel à 50 mg/kg/jour pendant 15 jours) associés aux anti-inflammatoires. Dans certains cas, une intervention chirurgicale s'avère nécessaire (Garcia *et al.*, 2003).

Le traitement de la cysticercose chez le porc fait appel à l'oxfendazole à 30 mg/Kg en dose unique (Gonzalez *et al.*, 1997)

2.4. Contrôle de la Cysticercose

Les stratégies de contrôle de la cysticercose reposent sur les actions à mener pour rompre le cycle biologique de *T. solium* dans un milieu donné. Le cycle biologique du parasite se maintient quand les porcs ont accès aux matières fécales humaines et la viande de porc ladre est consommée par les humains.

Différentes stratégies de contrôle ont été proposées par plusieurs auteurs et revues par Gonzalez *et al.*(2003) et Sarti & Rajshekhar (2003). Les stratégies proposées sont les suivantes:

- la sensibilisation et l'éducation des populations pour la connaissance de la maladie et la pratique de l'hygiène ;
- le traitement de masses des populations humaines à l'aide de l'albendazole ou du praziquantel pour tuer le parasite adulte et arrêter la contamination de l'environnement par les œufs;
- le traitement de masse de la cysticercose porcine à l'aide de l'oxfendazole ;
- mesures économiques: ces mesures concernent le développement d'infrastructures et de services comme les latrines, les abattoirs, l'inspections vétérinaires, l'élevage des porcs en claustration ainsi qu'une bonne indemnisation des saisies de carcasses porcines atteintes de cysticercose ;
- perceptive de contrôle par la vaccination des porcs: plusieurs vaccins ont montré une efficacité expérimentale (Guo *et al.*, 2007; Sciutto *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2005 ; Lightowlers *et al.*, 2003). Ces vaccins pourraient un jour être utilisés pour rompre le cycle en limitant le nombre de porcs infectés.

2.5. Rappel des objectifs du travail

Le présent travail s'inscrit dans l'objectif global de validation d'un test ELISA pour la détection d'anticorps dirigés contre *C. cellulosae* chez l'homme en utilisant comme antigène le liquide vésiculaire du kyste du parasite. Vu le prix et la lourdeur de l'EITB, nous désirons évaluer les performances d'un test moins cher et facile à réaliser dont la validation devrait

permettre son utilisation pour un screening épidémiologique dans les populations exposées au parasite.

Les objectifs spécifiques sont de faire une évaluation de la répétabilité intra-runs et entre-runs; d'étudier la spécificité analytique à travers une étude réactions croisées sur des sera provenant de patients présentant des infections hétérologues.

Nous jugerons ensuite la capacité diagnostique préliminaire du test en faisant un essai de diagnostic de la neurocysticercose sur des sera de terrain provenant de patients présentant des signes d'épilepsie. Cet essai de diagnostic à l'aide du test Ab-ELISA et du test Ag-ELISA selon Dorny *et al.*(2000) nous permettra de comparer la prévalence apparente d'infection active par rapport à la prévalence apparente de l'exposition à la cysticercose sur un échantillon de 647 patients de Kenya.

Chapitre III. Matériels et méthodes

3.1. Etude de faisabilité du test ELISA

La faisabilité du test a tout premièrement été investiguée. A cette fin, deux protocoles ont été testés dans le but de choisir le plus adéquat.

3.1.1. Protocole N°1 (annexe 1)

3.1.1.1. Organisation de la plaque ELISA

Des plaques de 96 cupules Nunc® Immuno plate Maxisorb ont été utilisées et organisées de la manière suivante (Figure II).

Les 2 premières cupules de la première colonne ont été destinées au contrôle du substrat .Les 2 cupules suivantes de la première colonne ont été destinées au contrôle du conjugué. Le contrôle positif à été placé dans les 4 dernières cupules de la première colonne. Les 8 contrôles négatifs ont été placés dans les 8 cupules de la deuxième colonne. Le reste des cupules de la plaque ont été destinées aux échantillons à tester.

Chaque échantillon ainsi que le contrôle du conjugué et le contrôle du substrat ont été testés en double. Le contrôle positif a été testé en 4 réplicats. Les contrôles négatifs ont été testés en un seul réplicat.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CS	CN1	e1	e5								
B	CS	CN2	e1	e5								
C	CC	CN3	e2	...								
D	CC	CN4	e2									...
E	CP	CN5	e3									e39
F	CP	CN6	e3									e39
G	CP	CN7	e4									e40
H	CP	CN8	e4									e40

Figure III : Représentation schématique de l'organisation d'une plaque pour la réalisation du test Ab-ELISA.

CS, contrôle substrat ; CC, contrôle conjugué ; CP, contrôle positif ; CN1 à CN8, contrôles négatifs 1 à 8 ; e1 à e40, échantillons 1 à 40

3.1.1.2. Déroulement du test

Le test a été conduit selon da Silva *et al.* (2000) avec quelques modifications.

Les cupules ont été sensibilisées avec 100µl d'antigène dilué à 1µg/ml dans une solution de carbonate bicarbonate 0,05 M, PH 9,6 à l'exception des cupules du contrôle substrat dans lesquels ont été mis 100 µl de solution de carbonate bicarbonate. Les plaques ont par la suite été incubées pendant 1h à 37° C puis à 4°C pendant toute une nuit.

Les plaques ont été ensuite lavées une fois avec du tampon de lavage (PBS 0,172 M contenant 0,05 % de Tween 20). Puis les cupules ont été bloquées avec 150 µl du tampon de blocage (tampon de lavage supplémenté de 1% en volume de sérum de veau nouveau né NCBS). Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 heure puis vidées sans être lavées.

Les sera dilués à 1/500 dans du tampon de blocage ont été distribués à 100µl par cupules. Le contrôle substrat et le contrôle conjugué ont reçu 100 µl de tampon de blocage par cupule. Les plaques ont été incubées pendant 1h à 37°C puis lavées trois fois avec du tampon de lavage.

Ensuite un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (Goat Anti-Human IGg, Jackson Immunoresearch Lab) dilué à 1/20000 dans du tampon de blocage a été distribué à 100µl par cupules sauf dans les cupules du contrôle substrat qui ont reçu 100 µl de tampon de blocage par cupule. Les plaques ont été incubées 1h à 37°C puis lavées trois fois avec du tampon de lavage.

Une solution de substrat, ortho-phenylenediamine dihydrochloride (o-PD) obtenue en dissolvant 1 tablette d'o-PD pour 6 ml d'eau distillée ajoutée de 2,5 µl de H₂O₂ 30% juste avant l'emploi, a été distribuée à 100 µl dans toutes les cupules. Puis les plaques ont été incubées pendant 15 minutes à 30 °C à l'obscurité.

La réaction a été arrêtée en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ 4N à chaque cupule puis les plaques ont été lues à 490 / 655nm. Dans un lecteur ELISA (Thermo Labsystems Multiskan ex model 355).

3.1.2. Protocole N°2 (annexe 1)

Ce protocole a été conduit selon Dorny *et al.* (2004) avec quelques modifications.

Le protocole N°2 diffère du protocole N°1 par le type et les temps d'incubation appliqués à chaque étape. Pour la sensibilisation, les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 30 minutes dans un incubateur-agitateur. Aux étapes de blocage des cupules, de distribution de sera et de la distribution de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, les incubations ont été de 15 mn à 37°C dans l'incubateur-agitateur. L'incubation finale du substrat reste identique au protocole N°2 : 30 °C pendant 15 minute dans l'obscurité.

3.1.3. Interprétation des résultats ; seuil de positivité et ratio

Le seuil de positivité correspond à la valeur supérieure de l'intervalle de confiance (alpha = 0.001) calculé à partir d'une distribution t autour de la moyenne des 8 contrôles négatifs (Sokal *et al.*, 1981).

$$S = Moy + T_{0,001} \times SD \sqrt{\frac{(n+1)}{n}}$$

S est le seuil de positivité Moy est la moyenne des contrôles négatifs

T est une valeur donnée dans la table de student (alpha = 0.001)

SD est la déviation standard de la distribution des contrôles négatifs

n est le nombre de contrôles négatifs

Pour chaque échantillon un ratio est calculé comme suit :

Ratio = Moy.DO/S

Moy.DO est la moyenne des 2 valeurs de densités optiques (DO) de chaque échantillon.

Un ratio supérieur à 1 indique un échantillon positif avec une certitude de 99,9%.

3.1.4. L'antigène

L'antigène brut de fluide vésiculaire a été préparé selon Arruda *et al.* (2005). Les cysticerques de *T. solium* récoltés dans une boîte de Petri ont été soigneusement lavés dans du Phosphate Buffered Saline 0,172M (PBS). Le fluide vésiculaire a été collecté dans des tubes Eppendorf à l'aide d'aiguille de seringue puis centrifugé à 10000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Au surnageant collecté ont été ajoutés des inhibiteurs de protéases, le phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) et la leupeptine pour atteindre respectivement une concentration de 5 mM (0,87 mg/ml) et 0,0025 mM (0,0012 mg/ml). La préparation a été conservée à -80 °C.

3.1.5. Les contrôles positifs et négatifs

Le contrôle positif est un pool de séra obtenu en mélangeant des séra humains positifs à la cysticercose. C'est le contrôle positif de référence utilisé au laboratoire de Santé Animale de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (IMT).

Les contrôles négatifs au nombre de 8, sont des séra humains provenant de la Belgique, un pays non endémique pour la cysticercose. Ceux-ci ont en outre donné un résultat négatif à la détection des antigènes circulants du métacestode de *T. solium* par la méthode d'ELISA antigène.

3.2. Etude de la répétabilité du test

La répétabilité est l'accord entre des échantillons analysés en parallèle lors d'un même test ou de la répétition de différents tests (Jacobson, 1998). Pour évaluer la répétabilité intra et inter « run », 20 séra de ratios différents ont été utilisés : 5 séra à ratios très faibles ($0 < \text{Ratio} \leq 0,5$) ; 5 séra à ratios faibles ($0,5 < \text{Ratio} \leq 1,5$) ; 5 séra à ratios moyennement élevés ($1,5 < \text{Ratio} \leq 4$) et 5 séra à ratios élevés ($4 < \text{Ratio} \leq 15$). Ces échantillons proviennent d'Inde, un pays endémique pour la cysticercose. Chacun d'entre eux a été testé en 4 réplicats et placé de façon aléatoire sur la plaque ELISA afin d'éviter tout biais dû à l'emplacement des échantillons sur la plaque. Un « run » correspond donc à l'analyse d'une plaque entière un jour donné. Trois runs ont ainsi été réalisés pendant trois jours consécutifs.

3.3. Etude de la spécificité analytique du test

La spécificité analytique désigne l'aptitude d'une épreuve à ne pas présenter des réactions croisées avec d'autres analytes (Jacobson, 1998). L'évaluation de la spécificité analytique a été réalisée à travers une étude des réactions croisées. Cinquante six séra humains présentant 8 infections hétérologues différentes ont été utilisés. Ils ont été obtenus auprès du service médical de l'IMT d'Anvers.

Ces infections hétérologues étaient les suivantes : *Filaria* (n= 8 échantillons) ; *Strongyloides* (n=5 échantillons) ; *Amoeba* (n=5 échantillons) ; *Fasciola* (n=5 échantillons) ; *Schistosoma* (n=5 échantillons) ; *Echinococcus* (n=6 échantillons) ; *Cysticercus cellulosae* (n=7 échantillons) ; *Toxocara* (n=8 échantillons) ; *Plasmodium* (n=7 échantillons). Certains de ces échantillons présentent des infections mixtes (Tableau I).

Tableau I : Infections hétérologues, homologues (*C.cellulosae*) et coinfections des échantillons utilisés pour l'étude de la spécificité analytique.

Infection	Coinfections
Fil (n= 8)	Fas n*=2; Toxc n*=2; Str n*=2 ; Toxp n*=1; Plas n*=1
Str (n=5)	Fi n*=1 ; Toxp n*= 1
Amo (n= 5)	Fil n*= 1 ; Str n* = 1 ; Asc n*=1
Fas (n=5)	Fil n* = 2 ; C.cel n*=2 ; Str n*=2; Tri n* = 2; Amo n*= 1
Schi (n=5)	Fil n*= 1 ; Str n*= 1 ; Gia n*=1
Echi (n=6)	Str n* =1
C. cel (n=7)	Fas n*= 1 ; Fil n*= 3; Str n*=2 ; Tri n*=2 ; Echi n*= 1; Schi n*=1
Toxc (n=8)	
Plas (n=7)	Fil n*=1

Fi, Filaria ; Str, Strongyloides ; Amo, Amoeba ; Fas, Fasciola ; Schi, Schistosoma ; Ech, Echinococcus ; C. cel, Cysticercus cellulosae ; Toxc, Toxocara ; Plas, Plasmodium ; Toxp, Toxoplasma ; Gia, Giardia ; Asc, Ascaris ; n, nombre d'échantillons présentant l'infection étudiée ; n, nombre d'échantillons présentant une coinfection.*

3.4. Etude de la prévalence de la cysticercose au sein d'une population de patients épileptiques du Kenya à travers la détection d'anticorps et d'antigènes circulants

Une étude basée sur une population de patients épileptiques kényans a été réalisée afin d'estimer l'impact de la neurocysticercose en tant qu'agent responsable de l'épilepsie.

647 sera issus du district de Busia ont été soumis à la détection des anticorps (ELISA anticorps) et des antigènes (ELISA antigène). Ce double diagnostic a été réalisé dans le but de comparer le taux de cysticercose active et le taux d'exposition des patients à la maladie.

3.5. Analyse des données

3.5.1. Etude de la répétabilité

3.5.1.1. Le coefficient de variation

Le coefficient de variation (CV) a été utilisé dans l'étude de la répétabilité, pour quantifier la variabilité entre les réplicats au cours des différents runs. Le CV exprime la variabilité comme un pourcentage de la moyenne (Dohoo *et al.*, 2003).

A partir des DOs brutes :

$$CV = SD/MoyDO \text{ avec } SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{ni=1}^n (DOi - Moy_{DO})^2}$$

A partir des ratios :

$$CV = SD /MoyRatio \text{ avec } SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{ni=1}^n (Ri - Moy_{Ratio})^2}$$

CV est le coefficient de variation de la distribution d'un échantillon.

SD est la déviation standard de la distribution d'un échantillon

n est le nombre de réplicats d'un échantillon.

DOi est la densité optique d'un réplicat et MoyDO est la moyenne des densités optiques

DOi sont des réplicats d'un échantillon et Ri est le ratio DOi/S pour un réplicat. S est le seuil de positivité d'une épreuve. MoyRatio est la moyenne des ratios Ri des réplicats d'un échantillon.

Les CV ont été calculés par échantillons et ce, intra et entre les runs. La moyenne des CV a ensuite été calculée par type d'échantillons (CVmoyen_type), et pour l'ensemble de échantillons (CVmoyen total_intra-run et CVmoyen total_entre-runs) (Sanchez *et al.*, 2002).

3.5.1.2. La Valeur Résiduelle Relative (VRR)

Cette valeur a été utilisée dans l'évaluation de la répétabilité pour comparer la variabilité entre les réplicats des différents types d'échantillons et mettre en évidence les valeurs extrêmes, et ce par run et entre les différents runs. Les valeurs résiduelles relatives(VRR) ont été représentées graphiquement selon Charlier *et al* (2005). Ce graphique permet de visualiser la dispersion de chaque point par rapport à la moyenne des valeurs résiduelles relatives. Les VRR ont été calculées à partir des densités optiques et des ratios selon les formules suivantes :

A partir des DOs : $VRR = (DOi - MoyDO) / MoyDO$

A partir des ratios : $VRR = (Ri - MoyRatio) / MoyRatio$

VRR est la valeur résiduelle relative d'un réplicat

DOi est la densité optique d'un réplicat

MoyDO est la moyenne des densités optiques DOi des réplicas d'un échantillon

Ri est le ratio d'un réplicat

MoyRatio est la moyenne des ratios des réplicats d'un échantillon

3.5.2. Etude de la prévalence apparente de la cysticerose dans une population de patients épileptiques du Kenya

La prévalence apparente (Pa) a été utilisée pour exprimer la proportion des échantillons positifs dans le lot de sera de terrain en provenance du Kenya.

$$Pa = (\text{nombre de positifs} / \text{nombre d'échantillons testés}) \times 100$$

Chapitre IV : Résultats

4.1. La faisabilité

Les résultats (en densité optique) des analyses des séra de contrôle positif et négatifs sont décrits dans le tableau II.

Tableau II : Comparaison des résultats (densité optique) des protocoles N°1 et N°2 sur base des contrôles positif et négatifs.

Contrôle	Protocole N°1 (Densité optique)	Protocole N°2 (Densité optique)
Négatif 1	0.027	0.027
Négatif 2	0.022	0.013
Négatif 3	0.044	0.016
Négatif 4	0.031	0.011
Négatif 5	0.027	0.024
Négatif 6	0.037	0.01
Négatif 7	0.037	0.022
Négatif 8	0.034	0.024
Positif	0.656	0.214

Les valeurs relativement faibles du contrôle positif obtenues à partir du protocole N°2 ont permis d'écarter celui-ci en faveur du protocole classique (N°1).

4.2. Répétabilité

4.2.1. Répétabilité intra-runs

Le coefficient de variation moyen intra-run ($CV_{moyen_intra-run}$) pour le 1er, 2ème et 3ème runs est respectivement de 12,51%, 13,10% et 3,42%. La moyenne de ces trois CV donne un $CV_{moyen_total_intra-run}$ de 9,67% et ce, aussi bien calculé à partir des ratios qu'à partir des DOs. Les coefficients de variation moyens par catégorie d'échantillons (CV_{moyen_type}) vont de 7,68 % (pour les échantillons à Ratios élevés) à 12,5% pour les échantillons à Ratios très faibles (Tableau III).

Les figures IV et VI montrent la dispersion des VRR par run calculées à partir des densités optiques et des ratios respectivement. Dans les deux cas, la dispersion des VRR du 3ème run est très faible en comparaison avec les deux premiers, indiquant une très faible variabilité dans ce 3ème run. Notons que ces représentations graphiques ont permis de mettre en évidence quelques valeurs extrêmes s'éloignant fortement de la moyenne des réplicats et étant très certainement due à des contaminations lors d'erreurs de manipulations.

4.2.2. Répétabilité entre-runs

Entre les runs, les coefficients de variation moyens calculés à partir des DOs sont nettement supérieurs aux coefficients de variation moyens calculés à partir des ratios (Tableau III). Les CV_{moyen_type} obtenus à partir des DOs vont de 58,80% (échantillons à ratios élevés) à 101,41% (échantillons à ratios faibles) avec un $CV_{moyen_total_entre-runs}$ de 77,73%. Les CV_{moyen_type} obtenus à partir des ratios vont de 18,18% (échantillons à ratios moyennement élevés) à 51,88% (échantillons à ratios faibles) avec un $CV_{moyen_total_entre-runs}$ de 33,06%. Les figures V et VII montrent la dispersion des VRR entre runs calculées à partir des densités optiques et des ratios respectivement. L'utilisation des valeurs normalisées

en ratios (figure VII) montre que la quasi totalité des valeurs du premier et deuxième runs sont négatives ; ce qui se traduit par des ratios inférieurs à la moyenne dans les 1e et 2e runs et supérieurs à la moyenne dans le 3e run.

Tableau III : Coefficient de variation moyen par catégories d'échantillons (CVmoyen type) et coefficient de variation total (CVmoyen total) de tous les échantillons dans la répétabilité intra – runs et la répétabilité entre- runs obtenus à partir des ratios et des densités optiques (DO).

Echantillons	A partir des DOs		A partir des ratios	
	Répétabilité Intra-runs	Répétabilité Entre-runs	Répétabilité Intra-runs	Répétabilité Entre-runs
	CVmoyen type (%)	CVmoyen type (%)	CVmoyen type (%)	CVmoyen type (%)
Ratios élevés	7,68	58,80	7,6	21,69
Ratios moyennement élevés	9,51	68,98	9,51	18,18
Ratios faibles	8,92	101,41	8,92	51,88
Ratios très faible	12,5	81,74	12,5	40,48
Ensemble des échantillons	CVmoyen total (%) 9,67	CVmoyen total (%) 77,73	CVmoyen total (%) 9,67	CVmoyen total (%) 33,06

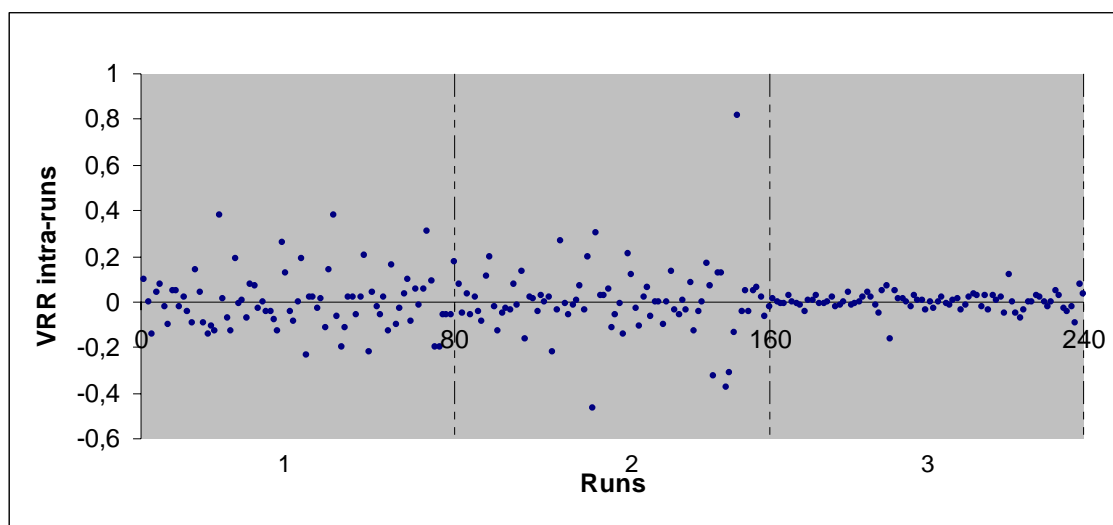


Figure IV : Dispersion des Valeurs Résiduelles Relatives (VRR) intra-runs obtenues à partir des densités optiques

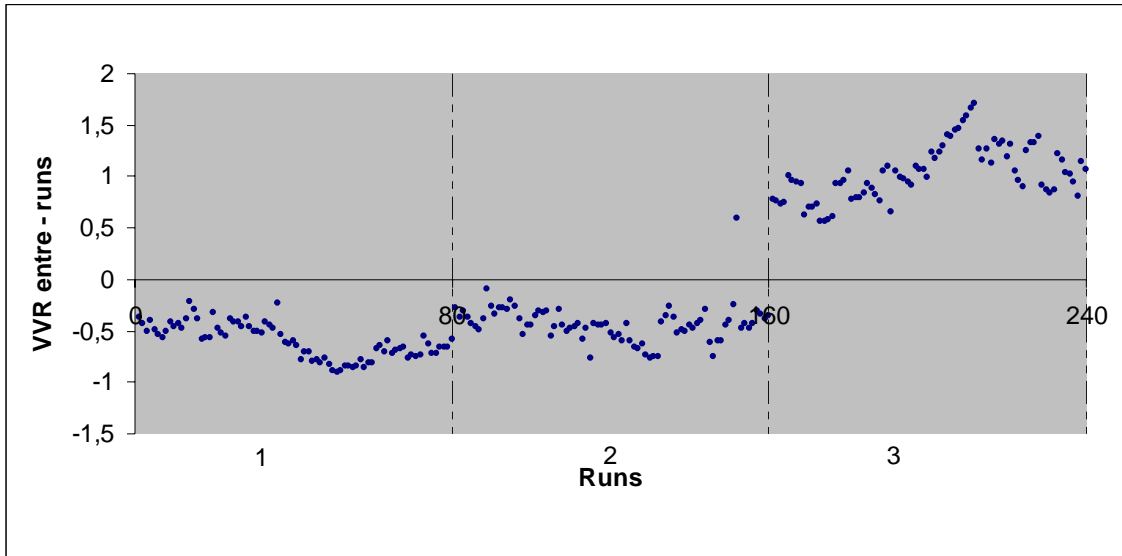


Figure V : Dispersion des Valeurs résiduelle relatives(VRR) entre-runs obtenues à partir des densités optiques

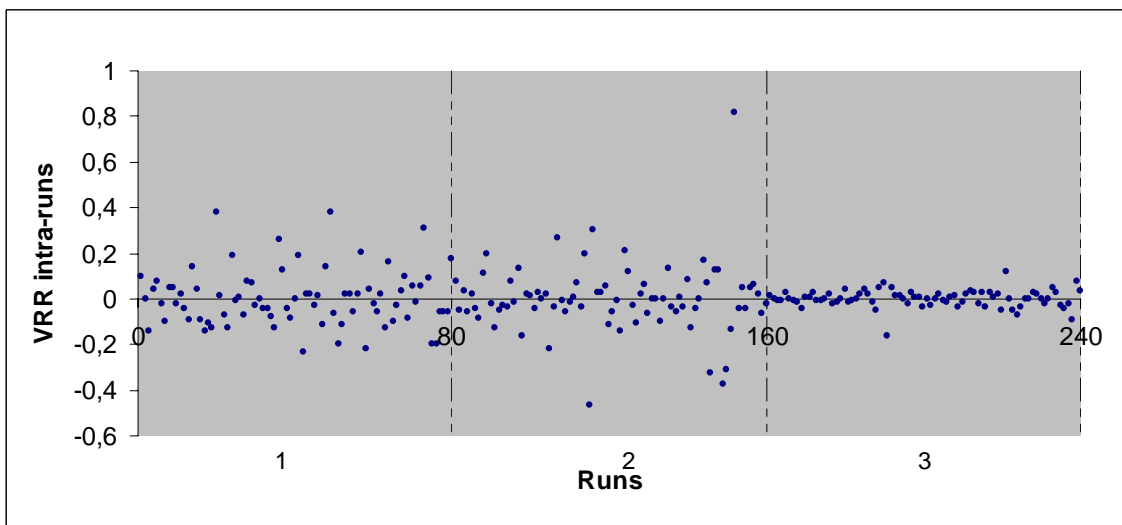


Figure VI : Dispersion des Valeurs Résiduelles Relatives(VRR) intra-runs obtenues à partir des ratios

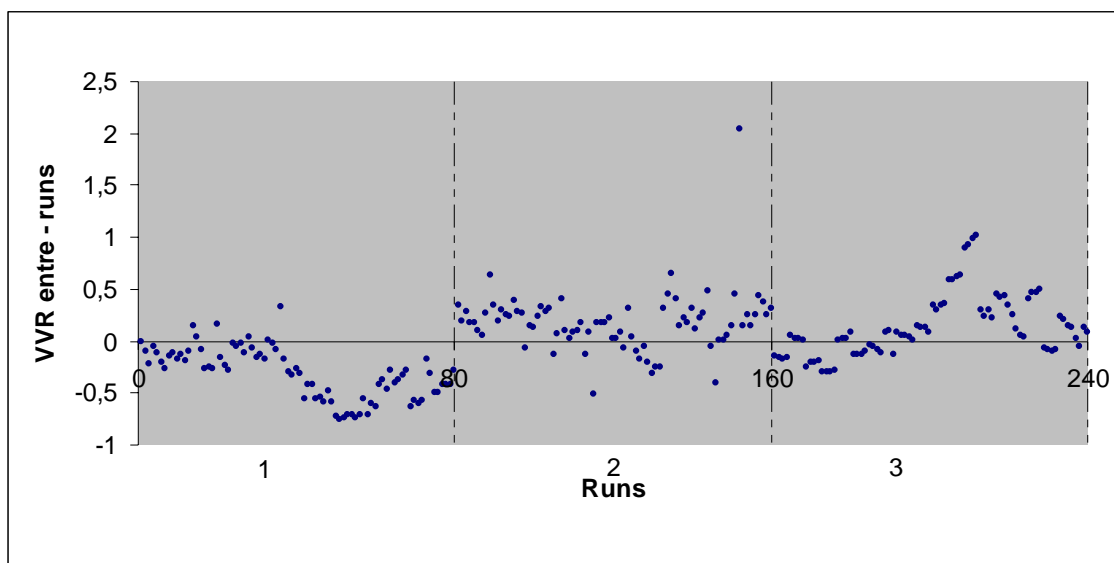


Figure VII : Dispersion des Valeurs Résiduelles Relatives(VRRs) entre-runs obtenues à partir des ratios

4.3. Spécificité analytique

Huit infections hétérologues et une série d'infection homologue (*C. cellulosa*) ont servi à l'étude des réactions croisées avec l'antigène brut du fluide vésiculaire de *C. cellulosa*. Le tableau IV montre que toutes les infections hétérologues ont eu des réactions croisées avec l'antigène utilisé mais à des degrés divers. *Echinococcus* et *C. cellulosa* ont réagi à 100% ; *Filaria* à 75% ; *Fasciola* à 60% ; *Strongyloides*, *Amoeba* et *Schistosoma* ont réagi à 40 % ; *Toxocara* a réagi à 25 % tandis que *Plasmodium* a réagi à 14,28%.

Tableau IV : Réaction des sera de patients présentant des infections hétérologues et homologues (*C. cellulosa*) connues avec l'antigène de *C. cellulosa*

Infections connues	Nombre de sera testés	Nombre de sera positifs (%)
<i>Filaria</i>	08	06 (75)
<i>Strongyloides</i>	05	02 (40)
<i>Amoeba</i>	05	02 (40)
<i>Fasciola</i>	05	03 (60)
<i>Schistosoma</i>	05	02 (40)
<i>Echinococcus</i>	06	06 (100)
<i>C. cellulosa</i>	07	07 (100)
<i>Toxocara</i>	08	02 (25)
<i>Plasmodium</i>	07	01 (14,28)

La figure VIII permet également d'observer l'intensité de la réaction par type d'infection hétérologue. Pour chaque infection hétérologue, au moins un sérum présente un ratio élevé excepté pour les amibes qui ne répondent que très faiblement au test.

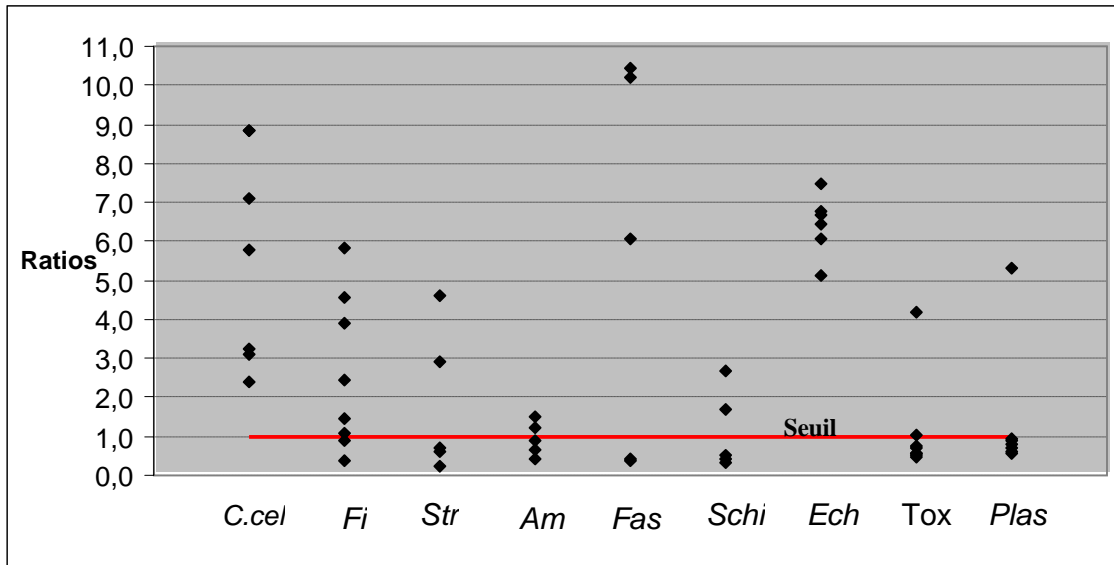


Figure VIII : Représentation des infections hétérologues et homologues (*C. cellulosa*) utilisées pour l'étude de la spécificité analytique.

L'axe des X montre les différentes infections étudiées. L'axe des Y montre les valeurs des ratios = densité optique divisée par le seuil de positivité (en rouge). *Fi*, *Filaria* ; *Str*, *Strongyloides* ; *Amo*, *Amoeba* ; *Fas*, *Fasciola* ; *Schi*, *Schistosoma* ; *Ech*, *Echinococcus* ; *C. cel*, *Cysticercus cellulosa* ; *Toxc*, *Toxocara* ; *Plas*, *Plasmodium*

4.4. Etude de la prévalence apparente de la cysticercose dans une population de patients épileptiques du Kenya

209 échantillons sur 647 ont été positifs à l'Ab-ELISA ; ce qui donne une prévalence apparente (Pa) de 32,30%. Tandis que pour Ag-ELISA aucun échantillon sur les 647 n'a été positif au test ce qui se traduit par une prévalence apparente de 0%.

Chapitre V : Discussions et conclusion

5.1. La faisabilité

Deux protocoles Ab-ELISA ont été testés dans l'étude de la faisabilité : le protocole N°1 et le protocole N°2 qui diffèrent l'un de l'autre par les temps et le type d'incubation. Dans le protocole N°1, l'incubation de l'antigène après sensibilisation des plaques se fait 1h à 37°C dans un incubateur normal puis toute la nuit à 4°C alors que dans le protocole N°2 l'incubation de l'antigène se fait seulement pendant 30 mn dans un incubateur-agitateur. Aux autres étapes l'incubation est de 1h à 37°C pour le protocole N°1 mais de 15 mn à 37°C dans un incubateur- agitateur pour le protocole N°2. A la suite de l'essai des deux protocoles, le protocole N°2 a été abandonné car il donnait des densités optiques relativement faibles par rapport au protocole N°1.

Cette différence dans les densités optiques peut s'expliquer par la différence dans les temps d'incubation car ceux-ci, dans le protocole N°1, permettent un plus long contact entre les différents réactifs. Si le protocole N° 2 avait donné des densités optiques identiques il aurait été une alternative intéressante car il aurait permis de réduire le temps nécessaire à la réalisation d'un test et de le limiter à environ une demi-journée de travail de laboratoire comme cela est déjà décrit pour l'ELISA antigène par Dorny *et al* (2004).

5.2. La répétabilité

5.2.1. La répétabilité intra-run

Dans ce travail le test Ab-ELISA a une répétabilité intra run acceptable. Les valeurs de CV obtenues sont inférieures au 20 % suggéré par Jacobson (1998) pour les DOs brutes (Tableau III). On note une haute répétabilité au niveau du 3e run (CV du 3e run = 3,42 %) avec un profil de dispersion qui montre une répartition des VRR proche de 0 (Figures IV et VI). Toutefois, dans ce travail et pour des raisons de temps, nous n'avons réalisé que 3 runs en 3 occasions différentes alors que Jacobson (1998) préconise 5 plaques en 5 occasions différentes.

5.2.2. La répétabilité entre-run

On note une grande variabilité dans la répétabilité entre-runs. En considérant les DOs brutes on note un CVtotal de 77,73% alors que cette valeur est de 33,06 % en considérant les DOs normalisées en ratios (Tableau III). De même, la figure V montre pour des VRR calculées à partir des DOs une différence entre les profils de dispersion du 3e run par rapport au 1e et au 2e run. Par contre en considérant les ratios (Figure VII), la différence entre les profils des VRR du 3e run par rapport au 1e et 2e run, bien qu'elle existe toujours est moins grande qu'en considérant les DOs brutes. Ainsi donc les ratios permettent de normaliser les valeurs et d'améliorer la répétabilité de la méthode, comme l'ont déjà démontré Sanchez *et al.*(2002). Leur utilisation est donc primordiale afin de pouvoir comparer les résultats issus de runs différents.

Cette grande variabilité entre les runs peut s'expliquer soit par les erreurs du manipulateur (erreurs du technicien), soit par le manque de précision des appareils de mesures utilisés, soit par des facteurs biologiques (Jacobson, 1998). Concernant ceux-ci, Kenny & Dunsmoor (1983) ont souligné certains problèmes liés à l'utilisation d'antigènes bruts comme celui utilisé dans cette étude. Ces auteurs pensent que l'antigène brut est un mélange de beaucoup

d'antigènes qui entrent en compétition pour se fixer sur la plaque lors de la sensibilisation et donc seulement certains vont s'y fixer en quantité suffisante. De ce fait, si les anticorps sont spécifiques à certains de ces antigènes la réponse du test dépendra alors de la quantité des antigènes réactifs fixés sur la plaque.

5.3. La spécificité analytique

Dans ce travail nous avons observé des réactions croisées de l'antigène brut de fluide vésiculaire de *C. cellulosa* avec *Echinococcus*, *Filaria*, *Fasciola*, *Strongyloides*, *Amoeba*, *Schistosoma*, *Toxocara* et *Plasmodium*.

La réaction croisée avec *Echinococcus* était une réaction attendue et prévisible puisque *Echinococcus* est un Taeniidae dont la réaction croisée avec *T. solium* se retrouve dans toutes les études sur les Ab-ELISA utilisant des antigènes bruts de cysticerques de *T. solium* (Mandal *et al.*, 2006 ; Ishida *et al.*, 2003 ; Dekumyoy *et al.*, 2000 ; Sloan *et al.*, 1995 ; Ng & Ko, 1994 ; Diaz *et al.*, 1992).

Un échantillon sur 7 ayant comme infection *Plasmodium* a été positif au test. Cet échantillon présentait également une infection mixte avec *Filaria*, la réaction croisée franche pourrait donc être due à une co-infection à *Filaria* plutôt qu'à *Plasmodium*. De même, en observant la figure VIII, nous constatons par leurs ratios que toutes les réactions croisées sont franches et nettes sauf pour *Amoeba* où les positifs se situent juste au dessus du seuil de positivité. Il semble donc que les infections aux amibes ne font qu'augmenter le bruit de fond de la réaction. Mandal *et al.* (2006) ont observé que sur 5 échantillons présentant comme infection *Amoeba* aucun ne donnait une réaction croisée avec l'antigène brut de cysticerques de *T. solium*. Par contre ils ont observé que 1 cas sur 5 échantillons avec infection à *Plasmodium* donnait une réaction croisée avec l'antigène de cysticerque de *T. solium*.

D'autres auteurs ont montré que l'utilisation des antigènes bruts de cysticerques de *T. solium* donnait beaucoup de réactions croisées avec d'autres infections comme *Echinococcus*, *Strongyloides*, *Schistosoma*, *Fasciola*, *Filaria*, *Toxoplasma*, syphilis, hépatite B, (Mandal *et al.*, 2006 ; Arruda *et al.*, 2005 ; Ishida *et al.*, 2003 ; da Silva *et al.* 2000 ; Dekumyoy *et al.*, 2000 ; Sloan *et al.*, 1995 ; Ng & Ko, 1994 ; Diaz *et al.*, 1992).

Il ressort de ce travail que l'antigène brut de fluide vésiculaire présente des réactions croisées franches avec 6 infections (*Echinococcus*, *Filaria*, *Fasciola*, *Strongyloides*, *Schistosoma*, *Toxocara*) et des réactions croisées douteuses avec 2 infections (*Plasmodium* et *Amoeba*). Cependant, les informations disponibles au sujet de ces séra hétérologues étant limitée quant à l'origine des patients échantillonnés, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que certains d'entre eux proviennent de personnes originaires de zones endémiques ayant été en contact avec *T. solium*.

Nos observations portent à croire que l'Ab-ELISA utilisant comme antigène le fluide vésiculaire brut de cysticerques de *T. solium* pourrait avoir une faible spécificité diagnostique. (Selon Jacobson (1998), la spécificité diagnostique désigne le pourcentage d'individus de référence non infectés par l'agent étudié donnant des résultats négatifs lors de l'épreuve). Cette spécificité diagnostique peut être vérifiée soit en utilisant les séra de références, soit en comparant le test Ab-ELISA à l'EITB pour calculer la sensibilité et la spécificité diagnostiques relatives.

5.4. Etude de la prévalence apparente de la cysticerose dans une population de patients épileptiques du Kenya

Pour étudier la prévalence apparente de la cysticerose dans une population de 647 patients du Kenya présentant les signes d'épilepsie, le test Ab-ELISA décrit dans ce travail et le test Ag-ELISA selon Dorny *et al.* (2000) ont été utilisés. Les objectifs étaient de quantifier le taux d'exposition des patients à la cysticerose et d'avoir une idée préliminaire des performances de diagnostic du test Ab-ELISA en les comparant aux résultats obtenus avec l'Ag-ELISA.

La prévalence apparente obtenue avec l'Ab-ELISA est de 32,30% (209 échantillons sur 647 ont été positifs au test) tandis qu'avec l'Ag-ELISA aucun échantillon n'a été positif ce qui donne une prévalence apparente nulle.

Le résultat obtenu contraste avec les résultats obtenus par Prado-Jean *et al.* (2007) sur des sera de patients épileptiques du Burundi. Dans cette étude 58,7% (178/303 patients épileptiques) ont été trouvés positifs au test Ab-ELISA utilisant comme antigène l'extrait brut de cysticerque de *T. solium* contre 38,3% (116 /303 patients épileptiques) positifs au test Ag-ELISA de Dorny *et al.* (2000).

Ce contraste entre haut taux d'exposition à la maladie et taux de cysticerose active (cysticerques viables) plus réduit se retrouve également et de façon plus marquée dans des études transversales étudiant l'entière d'une population à risque (Zoli *et al.*, 2003 ; de Rodriguez-Hidalgo *et al.*, 2006). Dans l'étude de Zoli *et al.* (2003) faite au Cameroun sur 504 patients épileptiques les antigènes de *T. solium* ont été détectés seulement chez 1,2 % des patients par l'Ag-ELISA alors que 44% des patients étaient reconnus positifs au parasite par un Ab-ELISA utilisant un antigène recombinant de *T. solium*. Dans l'étude de Rodriguez-Hidalgo *et al.* (2006) réalisée dans un village endémique en Equateur, seulement 2,25% (18 personnes sur 800 testées) étaient positives à l'Ag-ELISA alors que 40 personnes sur 100 testées à l'EITB étaient positives aux anticorps dirigés contre les cysticerques de *T. solium*.

Ces différentes observations montrent que les résultats obtenus dans ce travail ne sont ni une contre performance de l'Ag-ELISA ni une mauvaise performance du test Ab-ELISA. Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats.

Une partie des résultats positifs obtenus par l'Ab-ELISA seraient des faux positifs dus aux réactions croisées avec d'autres infections comme nous l'avons trouvé dans l'étude de la spécificité analytique. Une telle hypothèse peut être vérifiée en soumettant les sera à un test plus performant en termes de spécificité comme l'EITB. Cependant, une assez haute prévalence de cysticerose porcine a été démontrée dans la région de laquelle sont issus les patients (A.L. Willingham, communication personnelle) réfutant le manque de spécificité comme unique facteur explicatif de ce haut pourcentage de cas positifs.

L'Ag-ELISA ne détectant que des infections actives (Garcia *et al.*, 2000 ; Erhart *et al.*, 2002 ; Nguekam *et al.*, 2003) le résultat dans ce travail laisse penser à des patients dont les kystes de cysticerques seraient calcifiés ou morts. Une telle situation se retrouverait selon Prado-Jean *et al.* (2007) dans une population où la transmission de la cysticerose est moins active. Rodriguez-Hidalgo *et al.* (2006) ont émis l'hypothèse qu'une telle population serait dans une zone de stabilité endémique où il y aurait une forte immunité acquise. Il est également utile de rappeler que la population testée dans ce travail constitue un ensemble de patients épileptiques connus et suivis par les services médicaux locaux et que la « chronicité » de leur maladie pourrait expliquer l'absence de cysticerose active et donc, d'antigène circulants.

Une dernière explication possible à cette absence de positivité serait la présence de cysticerques viables uniques chez ces patients. Dans ce cas, la sensibilité de l'ELISA antigène chute causant ainsi de la fausse négativité (Garcia *et al.*, 2000).

5.6. Conclusion et perspectives

Le test ELISA de détections d'anticorps dirigés contre *Cysticercus cellulosae* chez l'homme que nous avons évalué dans ce travail, est un test simple, peu coûteux, facile à entreprendre. Ce test semble utilisable pour faire le screening d'une population pour la détection de la cysticercose mais présente deux faiblesses majeures : un manque de répétabilité entre-runs et surtout, une faible spécificité analytique. Celle-ci porte à croire que le test présente également une faible spécificité diagnostique qu'il va falloir investiguer soit en testant des sera de référence soit en les comparant avec un test de référence comme l'EITB.

Une possibilité d'améliorer la spécificité du test serait la purification de l'antigène comme l'ont montré Assana *et al.* (2007), Espindola *et al.* (2005) et da Silva *et al.* (2000); ceci nécessitant des moyens financiers et logistiques plus importants.

Toutefois une perspective d'utilisation sur le terrain de ce test Ab-ELISA peut être envisageable après avoir investigué la sensibilité et spécificité diagnostiques et suivi tous le processus de validation d'un test comme le suggère Jacobson (1998). Dans cette perspective si le test montre une bonne sensibilité diagnostique il pourra servir comme un test de screening avec confirmation des positifs à un test plus spécifique comme l'EITB.

Références bibliographiques

- Arruda GC., da Silva AD., Quagliato EM., Maretti MA. & Rossi CL. 2005. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. **10**: 1005-1012
- Assana E, Kanobana K, Tume CB, Zoli PA, Nguekam , Geerts S, Berkvens D & Dorny P. 2007. Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine cysticercosis. *Research in veterinary science*. **82**: 370-376.
- Assana E.; Zoli P.A.; Sadou H.A.; Nguekam; Vondou L.; Pouedet M.S.R.; Dorny P.; Brandt J. & Geerts S. 2001. Prévalence de la cysticercose porcine dans le Mayo-Danay (nord Cameroun) et le Mayo-Kebbi (sud-ouest du Tchad). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. **54**: 123-127
- Aubry P. 2005. Cysticercose .Actualités . <http://medecinetropicale.free.fr/cours/cysticercose.htm>
- Baily GG, Mason PR, Trijssenar FE & Lyons NF.1988. Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA tests using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien*. **82**: 295-299
- Brandt JR, Geerts S, De Deken R , Kumar V, Ceulemans F, Brijs L & Falla N.1992 A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *International journal for parasitology* **22**: 471-477.
- Charlier J, Duchateau L, Claerebout E & Vercruyse J.2005. Assessment of the repeatability of a milk *Ostertagia ostertagi* ELISA and effects of sample preparation. *Preventive veterinary medicine*. **68**: 277-288.
- da Silva AD., Quagliato EM. & Rossi CL. 2000. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *Taenia solium* cysticerci. *Diagnostic microbiology and infectious disease* . **37**: 87-92
- Dekumyoy P, Anantaphruti MT, Nuamtanong S, Watthanakulpanich D, Waikagu J & Danis M.2000. Neurocysticercosis: utilizing the cystic fluid antigen from *Taenia solium* metacestodes for diagnosis by IgG-ELISA. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* . **31**: 21-25.
- Diaz JF, Verastegui M, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Gallo C, Garcia HH, Torres P, Montenegro T & Miranda E.1992. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *The American journal of tropical medicine and hygiene* . **46**: 610-615
- Dohoo I., Wayne M. & Stryhn H.2003. *Veterinary epidemiologic research*. S.Margaret Mc Pike.Island, Canada
- Dorny P, Phiri IK, Vercruyse J, Gabriel S, Willingham AL 3rd, Brandt J, Victor B, Speybroeck N & Berkvens D. 2004. A Bayesian approach for estimating values for prevalence and diagnostic test characteristics of porcine cysticercosis. *International journal for parasitology*. **34**: 569-576
- Dorny P., Brandt J., Zoli A. & Geerts S. 2003. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Tropica*. **87**: 79-86
- Dorny P., Vercammen F., Brandt J, Vansteenkiste W., Berkvens D. & Geerts S. 2000. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. *Veterinary Parasitology*. **88**:43-49
- Erhart A, Dorny P, Van De N, Vien HV, Thach DC, Toan ND, Cong le D, Geerts S, Speybroeck N, Berkvens D & Brandt J.2002. *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Viet Nam: seroprevalence study using an ELISA for detecting circulating antigen. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **96**: 270-272
- Espindola NM, Iha AH, Fernandes I, Takayanagui OM, Machado Ldos R, Livramento JA, Mendes Maia AA, Peralta JM & Vaz AJ.2005. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *Journal of clinical microbiology*. **43**: 3178-3184.
- Ferreira AP, Vaz AJ, Nakamura PM, Sasaki AT, Ferreira AW & Livramento JA. 1997 Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **39**: 29-33

- Garcia E & Sotelo J. 1991. A new complement fixation test for the diagnosis of neurocysticercosis in cerebrospinal fluid. *Journal of neurology*.**238**: 379-382
- Garcia HH. & Del Brutto OH. 2003. Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Tropica* .**87**:71-78
- Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH & Cysticercosis Working Group in Peru. 2003. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. *Current opinion in infectious diseases*. **16**: 411-419
- Garcia HH, Parkhouse RM, Gilman RH, Montenegro T, Bernal T, Martinez SM, Gonzalez AE, Tsang VC, Harrison LJ & Cysticercosis Working Group in Peru.2000. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* .**94**: 673-6.
- Geerts S. 1995. Cysticercosis in Africa. *Parasitology Today* **11**: 389-390
- Gonzalez AE, Gauci CG, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, Garcia HH, Verastegui M & Lightowers MW.2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. **72**: 837-839
- Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, Tsang VC & Cisticercosis Working Group in Peru. 2003 Control of *Taenia solium*. *Acta Tropica* .**87**: 103-109.
- Gonzalez AE, Falcon N, Gavidia C, Garcia HH, Tsang VC, Bernal T, Romero M & Gilman RH.1997. Treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole: a dose-response trial. *The Veterinary record*. **141**:420-422
- Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, Castro M, Montenegro T, Verastegui M, Miranda E, *et al*. 1990 Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene* . **43**:194-199
- Guo A., Jin Z., Zheng, Y., Hai G., Yuan G., Li H. & Cai X. 2007 Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine*. **25**: 170-175
- Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S & Vaz AJ.2003. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Tropica*. **89** : 73-84
- Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY, Liu YH, Kamhawi S, Lightowers MW & Schantz PM. 1998.Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. **59**: 291-294
- Jacobson RH, 1998.Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* . **17**: 469-526.
- Kenny GE & Dunsmoor CL.1983. Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology*. **17**: 655-665
- Lightwolders M.W., Gauci C.G., Chow C., Drew D.R., Gauci S.M., Health D.D., Jackson D.C., Dadley-Moore D.L. & Read A.J. .2003. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites. *International journal for parasitology* . **33**: 1207-1217
- Mandal J, Singhi PD, Khandelwal N & Malla N. 2006. Evaluation of ELISA and dot blots for the serodiagnosis of neurocysticercosis, in children found to have single or multiple enhancing lesions in computerized tomographic scans of the brain. *Annals of tropical medicine and parasitology* . **100**: 39-48
- Ng TF & Ko RC. 1994. Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien* .**88**: 421-422.
- Nguekam , Zoli AP, Ongolo-Zogo P, Dorny P, Brandt J & Geerts S.2003. Follow-up of neurocysticercosis patients after treatment using an antigen detection ELISA. *Parasite*.**10**: 65-68.
- Nunes CM, Biondi GF, Heinemann MB & Richtzenhain LJ. 2000. Comparative evaluation of an indirect ELISA test for diagnosis of swine cysticercosis employing antigen from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes. *Veterinary parasitology* .**93**: 135-140
- OMS.2002.Cinquante-cinquième Assemblée Mondiale de la Santé Lutte contre la cysticercose: http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/fa5523.pdf

- Phiri IK, Dorny P, Gabriel S, Willingham AL, Sikasunge C, Siziya S & Vercruyse J. 2006. Assessment of routine inspection methods for porcine cysticercosis in Zambian village pigs. *Journal of helminthological*. **80**: 69-72
- Phiri IK, Ngowi H., Afonso S., Matenga E., Boa M., Mukaratirwa S., Githigia S., Saimo M., Sikasunge C., Maingi N., Lubega GW., Kassuku A., Michael L., Siziya S., Krecek RC., Noormahomed E., Vilhena M., Dorny P. & Willingham AL 3rd. 2003 The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern and Southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. *Acta Tropica*. **87**: 13-23
- Pinto PS., Vaz AJ., Germano PM. & Nakamura PM. 2000. ELISA test for the diagnosis of cysticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **42**: 71-79.
- Prado-Jean A., Kanobana K., Druet-Cbanac M., Nsengiyumva G., Dorny P., Preux P.M. & Geerts S. 2007. Combined use of an antigen and antibody detection ELISA for cysticercosis as tools in an epidemiological study of epilepsy in Burundi. (in press)
- Rocha SM., Suzuki LA., Silva AD, Arruda GC & Rossi CL. 2002 .A rapid latex agglutination test for the detection of anti-cysticercus antibodies in cerebrospinal fluid (CSF). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **44**: 57-58
- Rodriguez-Hidalgo R, Benitez-Ortiz W, Praet N, Saa LR, Vercruyse J, Brandt J & Dorny P. 2006 Taeniasis-cysticercosis in Southern Ecuador: assessment of infection status using multiple laboratory diagnostic tools. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* . **101**: 779-782.
- Rosas N, Sotelo J & Nieto D. 1986. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Archives of neurology* . **43**: 353-356
- Sanchez J, Dohoo IR, Markham F, Leslie K & Conboy G. 2002. Evaluation of the repeatability of a crude adult indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA and methods of expressing test results. *Veterinary parasitology*. **109**: 75-90.
- Sarti E & Rajshekhar V. 2003. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Tropica* . **87**: 137-143
- Sciutto E., Rosas G., Hernandez M., Morales J., Cruz-Revilla C., Toledo A., Manoutcharian K., Gevorkian G., Blancas A., Acero G., Hernandez B., Cervantes J., Bobes R.J., Goldbaum F.A., Huerta M., Diaz-Orea A., Fleury A., de Aluja A.S., Cabrera-Ponce J.L., Herrera-estrella L., Fragosso G. & Larralde C. 2007. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine*. **25**: 1368-1378
- Sciutto E., Fragosso G., Fleury A., Lacleste JP., Sotelo J., Aluja A., Vargas L. & Larralde C. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. **2**: 1875-1890
- Sloan L, Schneider S & Rosenblatt J. 1995. Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis. *Journal of clinical microbiology* . **33**: 3124-3128.
- Sokal R.R. & Rohlf J.F. 1981. *Biometry: the principals and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman, New York.
- Tsang VC, Pilcher JA, Zhou W, Boyer AE, Kamango-Sollo EI, Rhoads ML, Murrell KD, Schantz PM & Gilman RH. 1991. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Veterinary immunology and immunopathology* . **29**: 69-78
- Tsang VC, Brand JA & Boyer AE. 1989 An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of infectious diseases*. **159**: 50-9
- White AC Jr. 1997. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* . **24**: 101-113
- Zoli AP, Nguokam, Shey-Njila O, Nsame Nforinwe D, Speybroeck N, Ito A, Sato MO, Dorny P, Brandt J & Geerts S. 2003. Neurocysticercosis and epilepsy in Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* . **97**: 683-686.

Annexes 1

CYSTICERCOSIS ANTIBODY ELISA

Sujet

Mise en évidence d'anticorps dirigés contre le métacestode de *Taenia solium* chez l'homme.

DEFINITIONS AND ABBREVIATIONS

PBS: phosphate buffered saline

SC: substrate control

CC: conjugate control

NBCS: sérum de veau nouveau-né (new born calf serum) (inactivé par la chaleur ; remarque : cette inactivation est obtenue par incubation du sérum à 56°C pendant une heure)

o-PD: ortho-phenylenediamine dihydrochloride (2mg de substrat/tablette)

DO: densité optique

Principe du test

L'antigène brut issu de liquide vésiculaire de cysticerques de *Taenia solium* est coaté sur un support solide (une microplaque de polystyrène). Le sérum à tester est alors ajouté. L'anticorps, s'il est présent dans le sérum, va se lier à l'antigène pour former un complexe immun. Les produits qui ne se sont pas liés sont évacués par le lavage. Un anticorps marqué par la peroxidase et dirigé contre les immunoglobulines G humains est ensuite ajouté et se lie aux Ig G présentes. Un substrat incolore réagissant avec la peroxidase est ajouté ; le produit de la réaction est coloré. L'intensité de cette couleur peut être mesurée par spectrophotométrie sous forme de densité optique (DO). Le résultat est ensuite interprété par comparaison avec une série de contrôles positifs et négatifs.

Reactifs

PBS : Oxoid Br0014G (100 tablettes)

Tween 20: Merck 8.22184.0500

Antigènes bruts de *T. solium* (IMT, cc : 4579µg/ml)

Anticorps secondaires conjugués à la peroxidase Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch Lab 109-035-003)

Eau distillée : RO-DI water (Reversed osmotic De-Ionised water)

Conductivité < 5µS/cm 25°C

NBCS: Gibco 16010-167

H2O2 30%(perhydrol®): Merck 1.07210.0250

H₂SO₄: Merck 1.09981 Titrisol

o-PD: Dako S2045

Carbonate-bicarbonate buffer capsules: Sigma C-3041

pH-mètre (Hanna Instruments APH211 ou équivalent)

Matériel

pH-mètre (Hanna Instruments APH211 ou équivalent)

Sterilin pipettes stériles en plastic jetables (1- , 5- , 10 et 25 ml)

Multipipette 4780 (Eppendorf 4780 000 010)

Pipettes automatiques (0.5 µl – 10 µl, 50 µl – 200 µl, 100 µl – 1000 µl) + tips

Plaques ELISA (Nunc Immuno Plate Maxisorp F 96 439454)

Feuilles couvrantes autocollantes pour plaques ELISA (Costar Plate sealers 3095)

Lecteur ELISA avec filtres de 490 et 655 nm (Thermo Labsystems multiskan ex model 335 ou équivalent)

Incubateurs à 37°C et 30°C (Jouan ou équivalent) pour le protocole N°1

Incubateur-agitateur pour le protocole N°2

Vortex (Labinco L24 ou équivalent)

Agitateur magnétique (Hanna Instruments HI 300N ou équivalent) + barreau magnétique

Balance (précision: 0.0001 g Sartorius Analytic 120S ou équivalent) + spatules

Récipient foncé pour la préparation du substrat

Tubes Eppendorf (1.5 ml) + présentoirs

Seringues jetables de 20 ml

Béchers gradués et fioles Erlenmeyer

Parafilm

Tubes Falcon (15 et 50 ml)

Echantillons

Une quantité minimale de 10µl de sérum ou plasma est nécessaire pour réaliser le test.

Procédures

Solutions

PBS-T

Dissoudre 10 tablettes de PBS dans 1 litre d'eau distillée. Ajouter 0,555g de Tween 20 et agiter à l'aide de l'agitateur magnétique. La concentration poids/volume finale de la solution est de 0,05% Tween 20 dans le PBS.

Cette solution doit être préparée avant chaque test.

Blocking buffer

La solution de blocage est préparée à base de PBS-T supplémentée de 1% poids/volume de NBCS. Pour 100ml de PBS-T, ajouter 1ml de NBCS et mélanger. Cette solution doit être préparée avant chaque test.

Coating buffer (Carbonate Bicarbonate buffer 0.05 M, pH 9.6)

Dissoudre le contenu d'une capsule dans 100ml d'eau désionisée pour atteindre une concentration de 0,05M de carbonate-bicarbonate buffer à pH 9,6.

H2SO4 4N

Pour obtenir 4N H2SO4 solution: diluer le Titrisol dans 250 ml d'eau distillée

Lavage

Le lavage des plaques est réalisé avec du PBS-T à l'aide d'une seringue de 20 ml

Chaque cupule est lavée individuellement en évitant de les remplir jusqu'au sommet afin d'écartier tout risque de contamination entre cupules.

Protocole de base (Protocole N°1)

Coater la plaque avec 100 µl d'antigènes bruts par cupule (1µg /ml de carbonate buffer)

→ cupules de contrôle (cf. section 8 : Contrôle de qualité):

SC: coating buffer and CC: antigènes

incuber à 37°C pendant 1h puis une nuit à 4°C

Laver une fois avec du PBS-T

Bloquer toutes les cupules avec 150 µl de blocking buffer

Incuber à 37°C pendant 1h.

!Vider les cupules mais NE PAS laver !

Ajouter les séra dans les cupules ; 100 µl de sérum dilué dans du blocking buffer 1/500 par cupule. Chaque sérum est testé deux fois, excepté les contrôles négatifs.

→ Cupules de contrôles :

SC et CC: blocking buffer

Incuber à 37°C pendant 1h

!Sortir l' o-PD du réfrigérateur 20' avant son utilisation !

Laver 3 fois avec du PBS-T

Ajouter 100 µl d'anticorps conjugués à la peroxidase (dilution 1/20000 dans du tampon de blockage)

→ cupules de contrôles :

SC: Blocking buffer et CC: Mab

Incuber à 37°C pendant 1h

Laver 3 fois avec du PBS-T

Ajouter 100 µl d'o-PD substrat solution dans toutes les cupules

(Dissoudre 1 tablette d'o-PD dans 6 ml d'eau distillée (dans un récipient foncé).
Ajouter 2.5 µl H₂O₂ 30% dans l'o-PD substrat solution juste avant l'emploi

Incuber à 30°C pendant 15 minutes dans l'obscurité.

Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ (4N) dans chaque cupule

Lire la plaque à 490 / 655 nm

Protocole N° 2

Coater la plaque avec 100 µl d'antigènes bruts par cupule (1µg /ml de carbonate buffer)

→ Cupules de contrôle (cf. section 8 : Contrôle de qualité):

SC: coating buffer and CC: antigènes

incuber à 37°C pendant 30 mn dans un incubateur-agitateur

Laver une fois avec du PBS-T

Bloquer toutes les cupules avec 150 µl de blocking buffer

Incuber à 37°C pendant 15 mn

!Vider les cupules mais NE PAS laver !

Ajouter les séra dans les cupules ; 100 µl de sérum dilué dans du blocking buffer 1/500 par cupule. Chaque sérum est testé deux fois, excepté les contrôles négatifs.

→ Cupules de contrôles :

SC et CC: blocking buffer

Incuber à 37°C pendant 15 mn

!Sortir l' o-PD du réfrigérateur 20' avant son utilisation !

Laver 3 fois avec du PBS-T

Ajouter 100 µl d'anticorps conjugués à la peroxidase (dilution 1/20000 dans du tampon de blockage)

→ cupules de contrôles :

SC: Blocking buffer et CC: Mab

Incuber à 37°C pendant 15 mn

Laver 3 fois avec du PBS-T

Ajouter 100 µl d'o-PD substrat solution dans toutes les cupules

(Dissoudre 1 tablette d'o-PD dans 6 ml d'eau distillée (dans un récipient foncé).
Ajouter 2.5 µl H₂O₂ 30% dans l'o-PD substrat solution juste avant l'emploi

Incuber à 30°C pendant 15 minutes dans l'obscurité.

Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de H₂SO₄ (4N) dans chaque cupule

Lire la plaque à 490 / 655 nm

control de qualité

Contrôle de qualité interne

Au moins deux contrôles positifs et huit contrôles négatifs sont utilisés par plaque

Les contrôles négatifs sont utilisés pour calculés le seuil de positivité et correspondent à l'espèce des échantillons à tester pour éviter tout biais dans l'interprétation des résultats

Chaque plaque comprend un conjugate- et un substrate-control (CC et SC, respectivement). Les réactions aspécifiques entre le coating/blocking et le conjuqué sont vérifiées par le conjugate-control. La qualité du substrat est testée par le substrate-control. Ces deux contrôles doivent être négatifs (en dessous du seuil de positivité).

Contrôle de qualité externe

Comme étude préliminaire des caractéristiques du test, une série d'échantillons de référence (A1,..., A10) sont testés et leur résultats comparés à ceux obtenus au sein du laboratoire du département de Santé Animale de l'IMT.

Validation technique

Les résultats des huit contrôles négatifs sont testés selon : $100 \times \frac{SD}{Mean} < 100$

Cette formule est également appliquée aux autres échantillons testés en duplicat

La positivité des contrôles positifs est vérifiée

Traitement et interprétation des résultats

Le seuil de positivité est calculé à l'aide d'un test t de student (cf. feuille Excel) et la densité optique de chaque échantillon est comparée à ce seuil (Sokal & Rohlf, 1981).

Pour chaque échantillon, un ratio est calculé comme suit :

$$ratio = \frac{OD}{seuil\ de\ positivité}$$

Un ratio supérieur à 1, indique un échantillon positif avec une certitude de 99,9%.

Securité

Le port de gants en latex est obligatoire lors de la manipulation de séra humains

Le TCA et l'H₂SO₄ peuvent causer de graves brûlures ; le port de gants en latex est donc fortement conseillé et éviter tout dépôt dans l'environnement. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondement avec de l'eau claire et consulter un médecin.

L'o-PD peut causer une sensibilisation par contact avec la peau et est un carcinogène ; le port de gants est donc fortement conseillé et éviter tout dépôt dans l'environnement

CURRICULUM VITAE

Nom : TCHAMDJA Eyaba

Date et lieu de naissance : 1^{er} juin 1972 à Djamdé (TOGO)

Nationalité : TOGOLAISE

Diplôme principal : Docteur vétérinaire obtenu à l'Ecole Inter-Etats des Sciences et
Médecine Vétérinaires de Dakar en 2001

Expérience professionnelle : Novembre 2003 à ce jour : Chef Division contrôle vétérinaire
à la Direction Régionale de l'Agriculture, de l'Elevage et de la
Pêche des Savanes - Togo