

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2016

THESE 2016 TOU3 2086

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du

MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement
par

QUANCARD Sarah

DIAGNOSTIC DES SCHISTOSOMOSES :
EVALUATION DES TROUSSES COMMERCIALISEES POUR LE SERODIAGNOSTIC.

Vendredi 14 octobre 2016

Directeur de thèse : Fillaux Judith
Co-Directeur de thèse : Berry Antoine

JURY

Président : Mr le Professeur Valentin Alexis
1er assesseur : Mr le Professeur Berry Antoine
2ème assesseur : Mr le Docteur Martin-Blondel Guillaume
3ème assesseur : Mr le Docteur Boissier Jérôme
4ème assesseur : Mme le Docteur Fillaux Judith

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2015**

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CHATELUT E	Pharmacologie	Mme BARRE A	Biologie
M. FAVRE G	Biochimie	Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
M. HOUIN G	Pharmacologie	Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. PARINI A	Physiologie	M. BENOIST H	Immunologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie	Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie	Mme COUDERC B	Biochimie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie	M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique	Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. SIÉ P	Hématologie	M. FABRE N	Pharmacognosie
M. VALENTIN A	Parasitologie	M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
		Mme MULLER-STAUMONT C	Toxicologie - Sémiologie
		Mme NEPVEU F	Chimie analytique
		M. SALLES B	Toxicologie
		M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
		M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
		Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
		M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERA EVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. Olichon A	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2015

REMERCIEMENTS

A Judith Fillaux,

Sans toi, une grande partie de ce travail n'aurait pas été possible. Comment aurais-je fait sans tes dons en informatique et en statistiques... Merci pour ton aide précieuse quand j'étais dans le flou (c'est-à-dire souvent) et ta disponibilité.

A Antoine Berry,

Merci de m'avoir accordé votre confiance pour traiter ce sujet, pour votre aide et vos précieux conseils.

A Alexis Valentin,

Ce n'est pas un hasard si la parasitologie était mon sujet de prédilection et je pense que vos cours sur les bancs de la fac y sont pour beaucoup. Merci de m'avoir transmis la passion pour ces petites bêtes.

A Guillaume Martin-Blondel,

Merci d'avoir accepté mon invitation à faire partie de mon jury et de nous faire profiter de votre avis en tant que clinicien.

A Jérôme Boissier,

Merci à vous de participer à l'évaluation de ce travail et d'avoir fait le déplacement depuis Perpignan.

Je tiens également à remercier

Tous les techniciens de séro Eric, Delphine, Catherine, Linda, Françoise pour leurs conseils, leur patience et leur gentillesse. J'ai passé plusieurs semaines à envahir votre paillasse, voici enfin le résultat de ces longues semaines de manip.

Mes parents et Alex la ptite Bat, qui ont m'ont apporté leur soutien pendant ces années de labeur, je vous embrasse.

Tous mes co-internes et amis, que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces 8 semestres à Limoges, Bordeaux, Toulouse et Rodez. La liste est longue mais ils se reconnaîtront.

Amandine binôme, il y a 8 ans sur le parking du Ramier un premier regard s'échangeait entre un clown et Cléopâtre. Depuis beaucoup de casse d'Erlenmeyer, de colonnes de Vigreux et de bidouillages de résultats mais un binôme de choc toujours complémentaire.

Oliv, mon ptit F, merci pour tes précieux conseils sur les hommes et pour ces discussions ouvertes mais mince on est pharmaciens quoi !

Coco, ces années de fac auraient-elles été les mêmes sans tes colinades ? Merci pour ton sourire trop chou et notre amitié *ad vitam eternam*.

Marie ma loutre, merci pour ton soutien lors de notre exil à Limoges, pour nos bons moments passés et à venir, le T-Rex te remercie.

Tous les amis, de la facultat de farmacio ou d'ailleurs qui m'ont suivie pendant ses années : Flo, Gégé, Batnior, Claire, Marion et d'autres... Les années passent mais l'amitié perdure !

Et évidemment Stevie, merci de faire partie de ma vie et de me rendre heureuse depuis plus de 6 ans, de m'avoir supportée pendant cette année de concours, promis maintenant c'est fini ! Avec ton soutien et ton amour, la vie est tellement parfaite.

10 ans d'études qui sont passés en un rien de temps... C'est non sans un pincement au cours que la page de mes études se tourne mais je sais que ce n'est que pour vivre des choses plus belles encore...

LISTE DES ABREVIATIONS

CAA : Antigène Circulant Cathodique

CCA : Antigène Circulant Anionique

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

DO : Densité Optique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HA : Hémagglutination

IgE, G, M : Immunoglobulines E, G, M

kDa : kiloDaltons

PCR : Polymerase Chain Reaction

ROC : Receiver Operating Curves

TDR : Test de Diagnostic Rapide

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WB : Western Blot

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	11
Généralités sur la schistosomose	12
I. Historique	13
II. Classification	14
III. Epidémiologie	15
A. Répartition mondiale	15
B. Emergence de la schistosomose en Corse	17
IV. Cycle du parasite	19
A. Stade adulte	19
B. Stade œuf.....	20
C. Stade miracidium	21
D. Stade sporocyste.....	21
E. Stade cercaire	22
V. Manifestations cliniques.....	23
A. Schistosomose aiguë.....	23
B. Schistosomose chronique	24
1. Atteintes intestinales	25
2. Atteintes hépatospléniques	25
3. Atteintes uro-génitales.....	26
4. Autres localisations	27
VI. Traitement	29
VII. Diagnostic	31
A. Biologie non spécifique	31
B. Biologiespécifique	31
1. Diagnostic microscopique	31

2. Immunodiagnostic.....	33
3. Biologie moléculaire.....	37

Comparaison de 5 réactifs pour le sérodiagnostic de la schistosomose au CHU de Toulouse

.....	38
I. Contexte	39
II. Matériels et méthodes	40
A. Collecte des sérums	40
B. Trousses diagnostic évaluées.....	40
C. Analyse statistique	43
1. Population de l'étude	43
2. Détermination d'un test de confirmation	43
3. Performances statistiques des tests de dépistage	44
III. Résultats.....	45
A. Population de l'étude.....	45
B. Détermination d'un test de confirmation.....	48
C. Performances analytiques des tests de dépistage.....	51
IV. Discussion	54
V. Conclusion	59
VI. Références	60
VII. Annexes	65

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition géographiques des différentes espèces de <i>Schistosoma</i> , d'après Weerakon and al. (11)	15
Figure 2 : Prévalence et intensité de l'infection par <i>S. haematobium</i> et <i>S. mansoni</i> en fonction de l'âge d'après Colley et al. (12)	16
Figure 3 : Œufs de <i>Schistosoma</i> d'après Moné et al.(17) A droite : forme non-typique d'œufs de <i>S. haematobium</i> . A gauche : forme typique d'œufs de <i>S. haematobium</i>	18
Figure 4 : Cycle de <i>Schistosoma</i> d'après Shaker et al. (19).....	19
Figure 5 : Morphologie des schistosomes adultes d'après Gryseels et al. (20).....	20
Figure 6 : Hôtes intermédiaires de gauche à droite : <i>Bulinus</i> , <i>Onchomelania</i> et <i>Biomphalaria</i>	21
Figure 7 : Furcocercaire de <i>Schistosoma haematobium</i> (21).....	22
Figure 8 : Dermatite des nageurs (20) (26)	23
Figure 9 : <i>Schistosoma mansoni</i> . A gauche: Granulome autour d'un œuf de <i>S. mansoni</i> dans une sinusôide hépatique. A droite : Schistosomose hépatique chronique (20).....	26
Figure 10 : Œufs de <i>S. haematobium</i> , <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> et <i>S. intercalatum</i> (www.cdc.gov)	32
Figure 11 : Extrait de la notice fournisseur Bilharziose Fumouze®	35
Figure 12 : Bande de WB positive	43
Figure 13 : Répartition du nombre de sérums en fonction des groupes de patients.....	46
Figure 14 : Distribution des résultats des ELISA en fonction de l'espèce de <i>Schistosoma</i>	47
Figure 15 : Sensibilité des trousse en fonction de l'espèce.....	50
Figure 16 : Courbe ROC des trois tests quantitatifs.....	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux 1 et 2 : Classification taxonomique des schistosomes d'après Coon et al. (1).....	14
Tableau 3 : Seuils de positivité en fonction des techniques.....	43
Tableau 4 : Répartition des dosages de l' HAFumouze®, de l'ELISA Bordier® et de l'ELISA Novatec®.....	46
Tableau 5 : Répartition des résultats du Western-Blot et du TDR LDBio®.....	46
Tableau 6 : Comparaison des résultats des tests quantitatifs en fonction de l'espèce de <i>Schistosoma</i> , par technique.....	47
Tableau 7 : Spécificité de chaque trousse.....	48
Tableau 8 : Sensibilité de chaque trousse.....	49
Tableau 9 : Sensibilité et spécificité des différentes techniques par rapport au Western-Blot (au seuil de positivité du fournisseur).....	51
Tableau 10 : Rapport détaillé des sensibilités et spécificités de l'HA Fumouze®.....	53
Tableau 11 : Extrait du rapport détaillé des sensibilités et spécificités de l'ELISA Bordier®	53
Tableau 12 : Extrait du rapport détaillé des sensibilités et spécificités de l'ELISA Novatec®	53
Tableau 13 : Comparaison des sensibilités et spécificités des tests de dépistage aux seuils du fournisseur et aux nouveaux seuils de positivité.....	55
Tableau 15 : Sensibilité des tests de dépistage en association avec les seuils fournisseur et nouveaux seuils de positivité.....	56

Introduction

La schistosomose est une maladie parasitaire qui touche plus de 200 millions de personnes à travers le monde, en particulier en Afrique Sub-saharienne. Le diagnostic de certitude de cette maladie se fait par microscopie. Cette méthode, peu sensible, s'applique surtout aux maladies à forte charge parasitaire ou en zone d'endémie. Pour les schistosomoses à faible charge parasitaire ou chez les voyageurs revenant de zone d'endémie, le diagnostic se fait plutôt par recherche d'anticorps. Cependant, aucun algorithme n'est clairement recommandé concernant les tests à utiliser pour le sérodiagnostic et il est difficile de savoir quelles techniques peuvent servir de test de dépistage ou de confirmation.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux différentes trousse de sérologie commercialisées en France dans le but d'étudier leurs performances et de savoir quelle stratégie adopter pour le diagnostic sérologique d'une schistosomose.

Généralités sur la schistosomose

I. Historique

En 1851, Theodore Bilharz est le premier à décrire la schistosomose humaine en découvrant des adultes mâles et femelles dans la veine porte et la vessie de patients égyptiens lors d'autopsies(1). Il décrit également les œufs de schistosomes en notant la présence d'un éperon terminal. Il nomme, alors, l'espèce *Distomum haematobium*, renommée *Schistosoma* par Weiland en 1858 sur la fausse impression que le trématode est fendu en deux.

Le papyrus Ebers, découvert à Louxor en 1862 fait mention des premiers cas de schistosomose remontant à 1550 avant J.C. en Egypte. Il décrit une maladie dont le principal symptôme était l'hématurie(2). En 1910, des œufs de *Schistosoma* calcifiés sont retrouvés dans des momies égyptiennes de la XX^{ème} dynastie par Ruffer confirmant l'hypothèse de schistosomose en Egypte à cette époque (3).

En 1904, Fujiro Katsurada découvre l'agent causal de la fièvre de Katayama, responsable de rash cutané, fièvre, diarrhée chez les paysans travaillant dans les champs de riz dans la région de Katayama au Japon. Il distingue l'espèce en cause de *Schistosoma haematobium* et la dénomme *Schistosoma japonicum*.

Une troisième espèce est décrite en 1907 par Luigi Westenra Sambon à la London School of Tropical Medicine qu'il nomme *Schistosoma mansoni* (1).

Schistosoma intercalatum est isolée en 1934 au Congo par Fisher alors que *Schistosoma mekongi* est découverte plus tardivement au Laos en 1978 (4). Plus récemment, une nouvelle espèce, *Schistosoma guineensis* est caractérisée, en 2003, en République démocratique du Congo. A ce jour, 21 espèces de schistosomes ont été répertoriées dont 7 sont capables d'infecter l'homme (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. guineensis*, *S. malayensis*) (5).

II. Classification

Le genre *Schistosoma* est divisé en 4 groupes (Tableaux1 et 2). Plusieurs espèces sont pathogènes pour l'Homme (Tableaux1 et 2) (1). Les espèces se différencient par leur localisation finale chez l'hôte définitif, l'espèce de l'hôte intermédiaire, le type de pathologie, la taille et forme des œufs... Les plus répandues à-travers le monde sont *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*(6).

Tableaux1 et 2 : Classification taxonomique des schistosomes d'après Coon et al. (1)

matida has cercariae with simple tails and includes the species *Fasciola hepatica*, a liver fluke of humans and domestic animals. Members of the order *Plagiorchiida* have cercariae with unforked tails that lack excretory vessels. This order includes the species *Paragonimus westermani*, a lung fluke in humans and carnivores. The order *Opisthorchiida* includes genera that have cercariae with unforked tails and excretory vessels and includes the species *Heterophyes heterophyes* and *Opisthorchis sinensis*, parasitic flukes of the small intestines and bile ducts, respectively. The order *Strigeida*, to which schistosomes belong, have cercariae with forked tails.

The order *Strigeida* includes several families. Schistosomes belong to the family *Schistosomatidae*, which includes those species that have separate sexes and whose adult forms live in the host's circulatory system, hence the term "blood flukes." Schistosomes also belong to the subfamily *Schistosomatinae*, which includes those species with a well-developed gynecophoral canal extending to the posterior end of the body. The gynecophoral (Gr: gyn, female; phoros, to carry) canal is a deep groove in the body of the male worm into which the female inserts herself. There she remains for life in ongoing copulation while the male carries her about.

The subfamily *Schistosomatinae* includes many genera. The genus *Schistosoma* (Gr: schisto, cleft; soma, body) includes approximately 19 species that have historically been divided into

Table 1. Taxonomic classification of schistosomes

Kingdom:	<i>Animalia</i>
Phylum: (Flatworms)	<i>Platyhelminthes</i>
Class:	<i>Trematoda</i> (Flukes)
Subclass:	<i>Digenea</i>
Order:	<i>Strigeida</i>
Family:	<i>Schistosomatidae</i>
Subfamily:	<i>Schistosomatinae</i>
Genus:	<i>Schistosoma</i>
Species:	<i>S. mansoni</i> group <i>S. japonicum</i> group <i>S. haematobium</i> group <i>S. indicum</i> group

Table 2. Representative and important species of schistosomes in each species group

<i>Schistosoma mansoni</i> group
<i>S. mansoni</i> ^a
<i>Schistosoma japonicum</i> group
<i>S. japonicum</i> ^a
<i>S. mekongi</i> ^a
<i>S. malayensis</i> ^a
<i>Schistosoma haematobium</i> group
<i>S. haematobium</i> ^a
<i>S. intercalatum</i> ^a
<i>S. mattheei</i> ^a
<i>S. bovis</i>
<i>Schistosoma indicum</i> group
<i>S. indicum</i>
<i>S. nasale</i>

^aParasitic in humans.

III. Epidémiologie

A. Répartition mondiale

La schistosomose est une maladie tropicale et subtropicale. Il s'agit de la seconde maladie parasitaire la plus répandue dans le monde après le paludisme (7). 700 millions d'individus dans 74 pays seraient exposés au risque d'infection (8).

L'OMS estime le nombre de personnes touchées à travers le monde à 200 millions dont plus de 90% des cas en Afrique sub-saharienne, 95% des cas étant imputés à *S. mansoni* et *S. haematobium*. Le nombre de décès par an est estimé à 41 000 (9). La répartition du parasite est liée à la présence de son hôte intermédiaire et du contact de l'Homme avec l'eau (Figure 1). En fonction de ces facteurs, la répartition de la maladie peut fortement varier d'une localité à une autre. *S. haematobium* est endémique dans 53 pays, principalement en Afrique sub-saharienne, au Maghreb, le long du Nil, et en Arabie Saoudite. *S. mansoni* est endémique dans 54 pays, dans les mêmes pays d'Afrique que *S. haematobium* et en Amérique du Sud (Brésil, Venezuela, Surinam, Caraïbes). *S. japonicum* est localisé en Asie, principalement en Chine et aux Philippines (10).

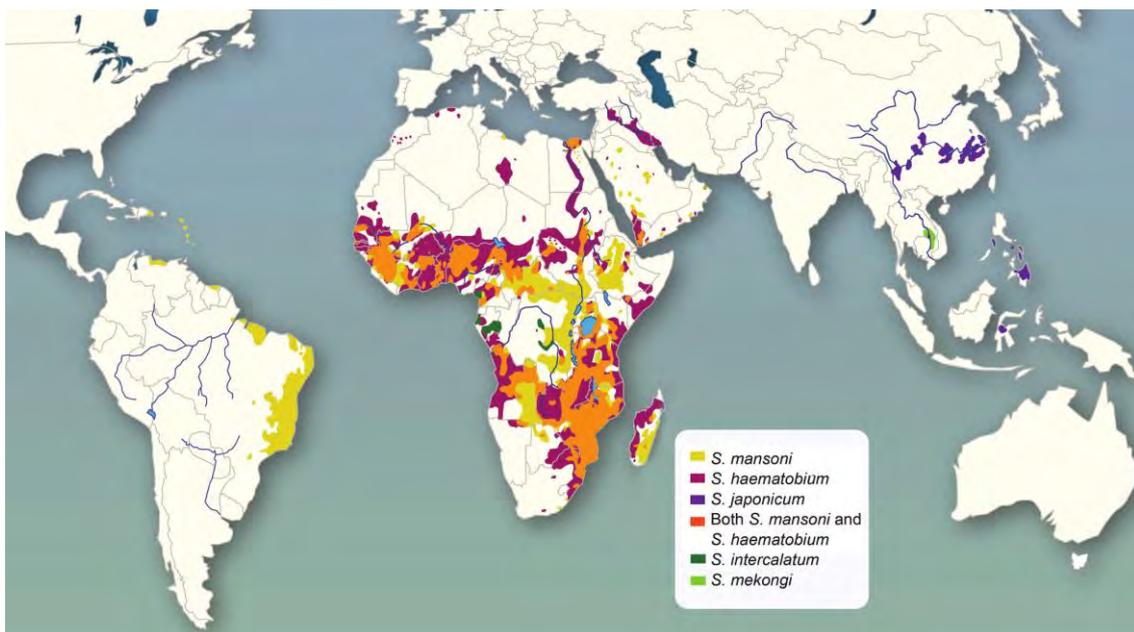


Figure 1 : Répartition géographique des différentes espèces de *Schistosoma*, d'après Weerakon and al. (11)

Dans les régions endémiques, la forme de la maladie la plus courante est la forme chronique, due à une exposition répétée au parasite. Les jeunes enfants s'infectent pour la première fois autour de l'âge de 2 ans. Les baignades répétées vont intensifier l'infection avec la pénétration dans le corps de nouveaux parasites. Il existe ainsi un pic de prévalence et d'intensité de l'infection chez les jeunes adolescents de 10 à 14 ans (12) (Figure 2).

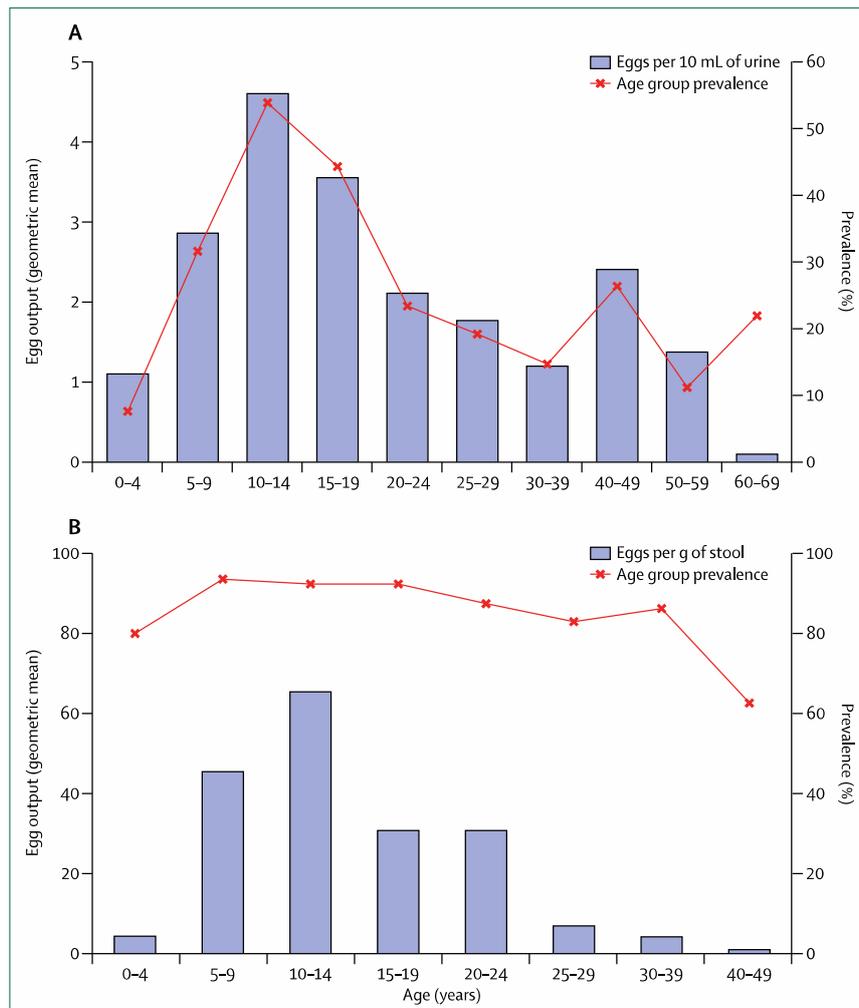


Figure 2 : Prévalence et intensité de l'infection par *S. haematobium* et *S. mansoni* en fonction de l'âge d'après Colley et al. (12)

La répartition de la schistosomose varie aussi selon les individus. Elle sévit principalement chez les populations pauvres et rurales et les personnes pouvant être en contact avec de l'eau infectée (agriculteurs, pêcheurs, enfants, habitudes de baignade, pratiques religieuses...). L'Homme a largement modifié l'épidémiologie de cette parasitose. Le développement de

l'irrigation et la migration des populations ont facilité la dissémination de la maladie dans de nouvelles régions rurales mais également en régions urbaines dans des bidonvilles. L'augmentation de la population dans des zones endémiques entraîne un accroissement du risque de contamination et de plus en plus de touristes sont touchés du fait du développement de l'éco-tourisme.

B. Emergence de la schistosomose en Corse

Des cas de schistosomose ont été observés en Europe au cours du siècle dernier au Portugal, mais elle a été éradiquée d'Europe dans les années 1940 (13). Elle n'avait jamais été observée en Corse bien que toutes les conditions soient réunies pour le cycle de vie du parasite (présence de bulins, présence de l'Homme, température de l'eau suffisamment élevée en été) (14). Les deux premiers cas de schistosomose urinaire autochtone ont été reportés, concomitamment, à Toulouse et à Dusseldörf, chez deux enfants présentant une hématurie macroscopique et des lésions vésicales polypoïdes. Ces deux enfants ne s'étaient jamais rendus en zone d'endémie de la schistosomose mais avaient pour point commun de s'être rendus en vacances dans la région de Sainte-Lucie de Porto-Vecchio et de s'être baigné dans la rivière du Cavu(15)(16). Le diagnostic microscopique a montré la présence de morphotypes d'œufsdans des prélèvements d'origine vésicale (urine, biopsie) : l'un correspondant au morphotype de *S. haematobium* et l'autre apparenté à *S. haematobium* avec un éperon terminal plus allongé et moins typique de l'espèce (17) (Figure 3).



Figure 3 : Œufs de *Schistosoma* d'après Moné et al.(17)
A droite : forme non-typique d'œufs de *S. haematobium*.
A gauche : forme typique d'œufs de *S. haematobium*.

Une étude moléculaire par séquençage a prouvé que l'espèce en cause était en réalité un hybride de deux espèces : *S. haematobium* et *S. bovis*. Cette dernière espèce est responsable de schistosomose chez les bovins, les ovins et les petits rongeurs. Cet hybride avait déjà été détecté au Sénégal (18). Un individu ayant contracté une bilharziose au Sénégal aurait pu ainsi contaminer le Cavu par ses urines. L'hybridation aurait pu également se dérouler en Corse directement mais cette hypothèse a été réfutée en raison de l'absence de contamination des bovins et rongeurs riverains du Cavu. Depuis, plus de 120 cas ont été diagnostiqués chez des patients ayant eu un contact avec l'eau de cette même rivière. Un dépistage a été recommandé par les autorités sanitaires pour toutes les personnes ayant eu un contact avec la rivière du Cavu en période estivale à partir de 2011.

IV. Cycle du parasite

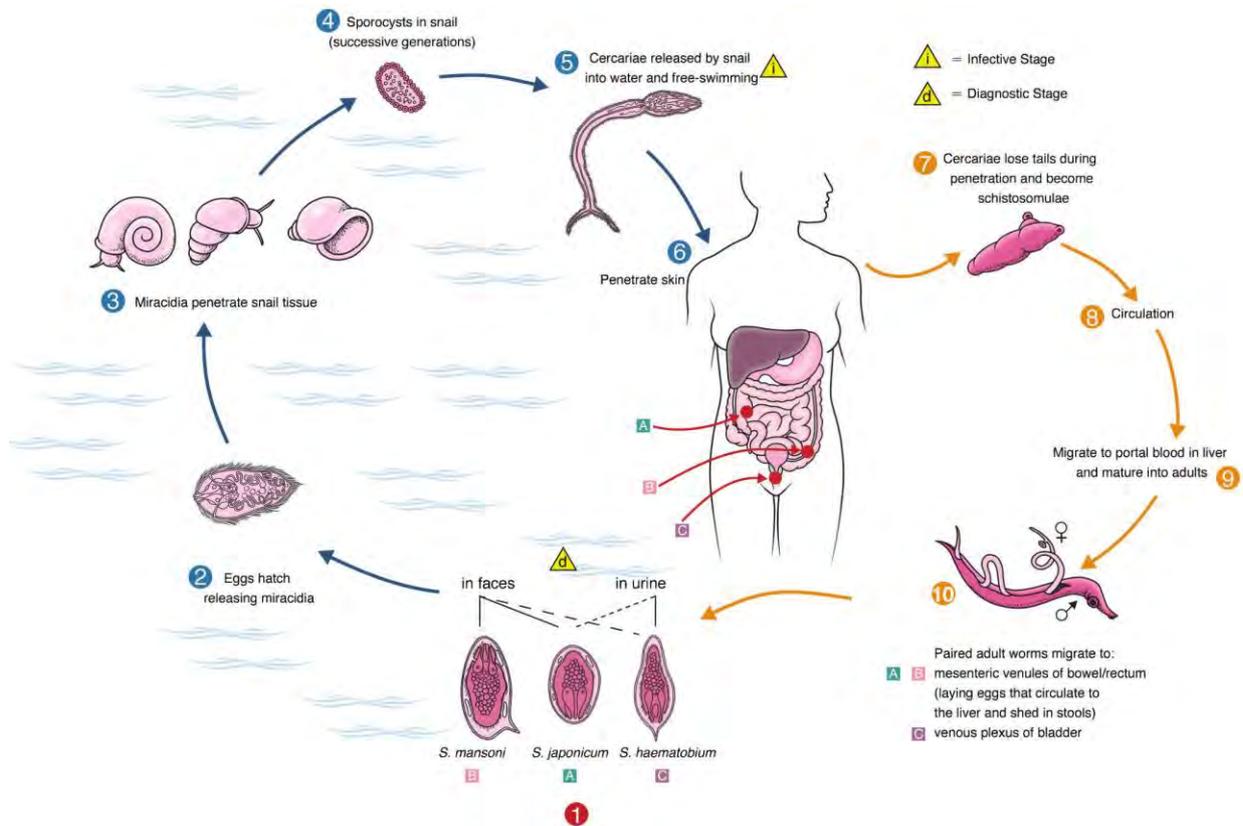


Figure 4 : Cycle de *Schistosoma* d'après Shaker et al. (19)

A. Stade adulte

Les vers adultes sont de couleur blanc-grisâtre, de forme cylindrique et mesurent 1 à 1,5 cm de longueur. Ils vivent dans le plexus veineux péri-vésiculaire (*S. haematobium*) ou mésentérique (*S. mansoni* et *S. japonicum*) de leur hôte, l'Homme, et y vivent en moyenne de 3 à 10 ans, et peuvent survivre jusqu'à 40 ans(12). Ils possèdent deux ventouses, un système digestif et des organes reproducteurs. Il s'agit d'une espèce gonochorique. Le mâle transporte la femelle en formant un cylindre avec son corps, le canal gynécophore (Figure 5). La femelle pond plusieurs centaines (*S. haematobium* et *S. mansoni*) à plusieurs milliers (*S. japonicum*) d'œufs par jour et le mâle les fertilise (20).

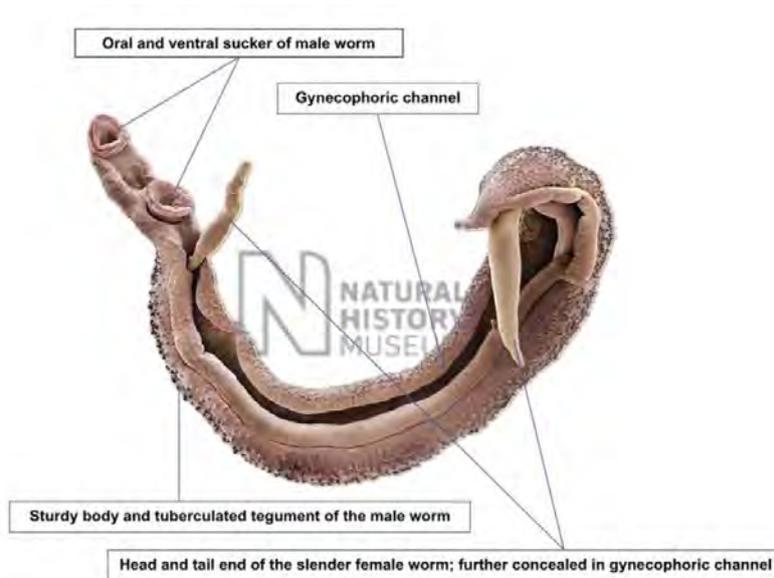


Figure 5 : Morphologie des schistosomes adultes d'après Gryseels et al. (20)

Les adultes se nourrissent de globules rouges et tirent leur énergie du métabolisme du glucose. N'ayant de système excréteur, ils régurgitent les déchets dans la circulation sanguine de l'Homme.

B. Stade œuf

Chaque œuf renferme une larve ciliée, le miracidium, qui sécrète des enzymes permettant à l'œuf de migrer à-travers les tissus du plexus veineux péri-vésiculaire vers la vessie ou du plexus mésentérique vers les intestins selon l'espèce. Pendant leur migration, la plupart des œufs restent bloqués dans les tissus, où ils vont induire une réaction inflammatoire puis mourir en une à deux semaines. Mais plus d'un sur trois atteint la vessie ou la lumière intestinale et peut être excrété dans le milieu extérieur avec l'urine ou les selles (20). Une fois pondus, les œufs bloqués dans les tissus ou excrétés dans le milieu extérieur peuvent survivre 1 à 2 semaines (12).

C. Stade miracidium

Une fois dans le milieu extérieur, au contact de l'eau, l'œuf libère le miracidium dont la durée de vie est très brève (quelques heures). Le pH de l'eau doit être proche de la neutralité et la température comprise entre 18 et 33°C(21). Capable de nager, grâce à sa ciliature locomotrice, le miracidium va infecter son hôte intermédiaire, un gastéropode qui varie selon l'espèce infestante : *Biomphalaria* pour *S. mansoni*, *Bulinus* pour *S. haematobium* et *Oncomelania* pour *S. japonicum* (Figure 6). L'épiderme de la masse pédieuse et la base des tentacules sont les zones de pénétration les plus fréquentes. Le miracidium s'installe au voisinage de son point de pénétration et se loge dans une cavité en écartant les fibres musculaires du mollusque. A partir de la 24^{ème} heure, il commence son développement pour se transformer en sporocyste (22).



Figure 6 : Hôtes intermédiaires de gauche à droite : *Bulinus*, *Oncomelania* et *Biomphalaria*

D. Stade sporocyste

Avant le 5^{ème} jour d'infection du mollusque, le sporocyste émet des bourgeons sporocystiques sous la forme de petites masses sphériques de diamètre variable qui vont se détacher et devenir libres dans la cavité formée précédemment par le miracidium. Entre le 9^{ème} et le 12^{ème} jour, les sporocystes secondaires commencent leur migration et se logent dans de nombreux tissus et organes du mollusque (branchies, tissu cardiaque, espace lymphatique...). A partir du

10^{ème} jour, ils envahissent l'hépatopancréas du mollusque. Ils émettent ensuite des bourgeons cercariens qui envahissent la totalité du corps du mollusque(22).

E. Stade cercaire

En 4 à 6 semaines, le mollusque libère des centaines de cercaires mûres dans le milieu extérieur par stimulation de la lumière. L'émission des cercaires a donc lieu le plus souvent entre 10h00 et 16h00, période où la stimulation lumineuse est la plus intense. Il s'agit également de la période où l'Homme est le plus en contact avec l'eau (20). Les cercaires mesurent 0,5 mm et possèdent une queue bifide (furcocercaires - Figure 7).

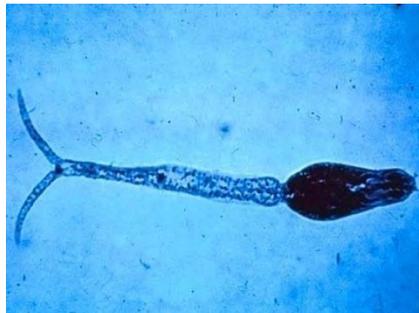


Figure 7 : Furcocercaire de *Schistosoma haematobium*(21)

Elles peuvent survivre dans l'eau jusqu'à 72 heures (20). Elles sont attirées par chimiotactisme vers leur hôte définitif, l'Homme, et pénètrent le derme par effraction cutanée(21). Elles perdent alors leur queue et deviennent des schistosomules. Ces dernières gagnent le système lymphatique puis le cœur droit, les poumons et le cœur gauche. Elles atteignent ensuite le système porte hépatique où elles deviennent adultes, en 5 à 7 semaines, et les couples se forment. Les femelles étant positionnées dans le canal gynécophore des mâles, les couples vont migrer, remonter la circulation porte à contre-courant vers leur destination finale : plexus veineux péri-vésical ou mésentérique selon l'espèce. Les femelles se séparent alors des mâles pour aller pondre leurs œufs dans les vaisseaux de la sous-muqueuse vésicale ou digestive.

V. Manifestations cliniques

A. Schistosomose aiguë

La schistosomose aiguë peut se manifester sous deux formes : la dermatite des nageurs ou le syndrome de Katayama.

La dermatite des nageurs (Figure 8) ou dermatite cercarienne est une réaction d'hypersensibilité à IgE provoquée par la pénétration des cercaires à travers la peau (23). Elle apparaît quelques minutes après l'infection sous la forme d'un rash prurigineux et peut durer quelques heures jusqu'à plusieurs jours en formant des maculo-papules sur les zones du corps qui ont été immergées dans l'eau contaminée. Ces symptômes peuvent s'amplifier en cas d'exposition répétée à la même espèce (24). Cette réaction peut aussi s'observer pour des espèces non pathogènes pour l'Homme. Les lésions sont en général plus marquées car les schistosomules pénètrent la peau mais ne migrent pas, contrairement aux espèces pathogènes(25).



Figure 8 : Dermatite des nageurs (20)(26)

Le syndrome de Katayama est causé par *S. mansoni*, *S. japonicum* et plus rarement par *S. haematobium* (27). La maladie a été observée pour la première fois en 1847 dans la région de Katayama au Japon chez des femmes arrivées d'autres régions pour être mariées et qui ont déclenché une fièvre après contact avec de l'eau douce(28).

Le syndrome de Katayama est une réaction d'hypersensibilité retardée qui apparaît 14 à 84 jours après une première infection ou une ré-infection massive. Elle résulte de la migration des schistosomules et de la ponte des œufs par les femelles arrivées à maturité (26). Les symptômes varient selon les individus, on retrouve en général une fièvre nocturne, toux, myalgies, céphalées, douleurs abdominales, infiltrats pulmonaires diffus, hyperéosinophilie, rash cutané, diarrhées (26). Ces symptômes se résolvent en 2 à 8 semaines avec l'adaptation du système immunitaire de l'hôte (1). La quasi-totalité des cas de syndrome de Katayama s'observent généralement chez des voyageurs non-immunisés. Ils s'observent rarement dans la population locale exposée de façon chronique, possiblement du fait d'une immunisation *in utero* des enfants nés de mères infectées (29).

Au stade aigu de la maladie, le diagnostic est souvent clinique et sera confirmé plus tard lorsque les tests sérologiques se positiveront (28). A cause du délai d'apparition et de la non-spécificité des symptômes, il s'agit de la forme de schistosomose dont le diagnostic est le plus difficile chez les voyageurs de retour en pays non-endémiques (26).

B. Schistosomose chronique

Les symptômes de la schistosomose chronique ne sont pas dus aux adultes mais aux œufs qui vont rester piégés dans les tissus de l'hôte pendant leur migration et induire une réponse immunitaire inflammatoire locale. La nature et l'intensité des symptômes va dépendre de trois facteurs : la localisation des œufs et donc de l'espèce de *Schistosoma* en cause, de la charge parasitaire et de la réponse immunitaire de l'hôte.

La réponse inflammatoire locale médiée par les lymphocytes et la production de cytokines et interleukines induit une accumulation de cellules mononucléées, de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, formant un granulome, qui sont ensuite remplacés par des histiocytes et cellules épithéliales. Une zone de fibrose va se créer autour de ces cellules avec une accumu-

lation de fibrocytes et de fibres de collagène à leur périphérie(23). Le granulome va ainsi s'épaissir et peut atteindre 100 fois la taille de l'œuf(1).La création du granulome inflammatoire empêche la diffusion dans les organes des enzymes protéolytiques produites par les œufs et prévient la nécrose des tissus. En revanche, il va induire des dysfonctionnements de l'organe dans lequel il se situe, voire bloquer le retour veineux vers le système porte(30).En fonction de la localisation des granulomes, différents organes peuvent être touchés.

1. Atteintes intestinales

Ces complications apparaissent en général avec *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. intercalatum*. La migration des œufs à-travers la paroi intestinale provoque une réaction inflammatoire granulomateuse avec formation de pseudopolypes, micro-ulcérations, saignements... Ces lésions se situent en général sur le gros intestin et le rectum, moins souvent sur l'intestin grêle.Cela se traduit au niveau clinique par des douleurs abdominales chroniques ou intermittentes, perte d'appétit, diarrhées avec, éventuellement, présence de sang dans les selles. Les saignements digestifs à répétition entraînent souvent une anémie (20).

2. Atteintes hépatospléniques

Les espèces en cause sont *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. mekongi*. Les œufs sont emportés par la circulation du système porte et se retrouvent piégés dans le foie. La réaction inflammatoire induit dans un premier temps une hépatosplénomégalie, en particulier chez les enfants et adolescents, qui peut renforcer l'anémie(31). La persistance de l'infection sur plusieurs années (5 à 15 ans pour *S. mansoni*, beaucoup plus rapide voire immédiate pour *S. japonicum*) entraîne une fibrose périportale pathognomonique appelée fibrose de Symmer. La fibrose va progresser jusqu'à obstruer la veine porte et provoquer une hypertension portale, splénomégalie, ascite, varices gastro-œsophagiennes avec un risque hémorragique important. A ce stade de la

maladie, la fibrose hépatique est en général irréversible. En revanche, les fonctions hépatiques sont globalement conservées (31). Ces symptômes s'observent chez des adolescents plus âgés ou chez de jeunes adultes infectés depuis 5 à 10 ans (Figure 9). La complication la plus redoutée de la schistosomose hépatique est la rupture des varices gastro-œsophagiennes avec hémorragie digestive massive et potentiellement fatale (20). Ces complications hépatiques peuvent être majorées en cas de co-infection avec le VHB ou le VHC qui accélèrent la progression de la maladie et majorent la fibrose (23).



Figure 9 : *Schistosoma mansoni*.
A gauche: Granulome autour d'un œuf de *S. mansoni* dans une sinusoïde hépatique.
A droite : Schistosomose hépatique chronique (20)

3. Atteintes uro-génitales

S. haematobium est la seule espèce qui touche le système génito-urinaire(32). Le symptôme le plus courant est en général l'hématurie qui apparaît 10 à 12 semaines après l'infection (24) et s'observe volontiers chez les enfants de moins de 15 ans. L'hématurie peut être uniquement terminale dans les formes débutantes ou apparaître dès le début de la miction dans les cas d'infections massives, avec dysurie. En région endémique, l'hématurie est tellement répandue qu'elle est parfois considérée comme un signe de puberté chez les garçons et confondue avec

les règles chez les filles (33). Des surinfections bactériennes peuvent s'ajouter dans 30 à 80% des cas, avec le plus souvent des bactéries uropathogènes en cause mais aussi des infections à *Salmonella*(7). Chez 58% des hommes en zone endémique, la prostate et les glandes séminales sont touchées(24). On observe des hémospémies, oligospémies, orchites, prostatites, dyspaneuries qui régressent généralement sous traitement (12). Chez la femme, on retrouve des atteintes vaginales et vulvaires, des lésions au niveau du col de l'utérus et des trompes de Fallope avec un risque accru de saignements, surinfections, diminution de la fertilité, avortements... (32). Ces lésions peuvent parfois être confondues avec d'autres infections génitales (condylomatose, syphilis...)(24). Les lésions urogénitales chez la femme représentent un risque accru d'infection par le VIH. Chez les individus infectés par le VIH, la co-infection avec *S. haematobium* accélère la progression du virus et facilite la transmission aux partenaires sexuels (34).

A un stade avancé de l'infection, la réaction inflammatoire due au dépôt des œufs dans la paroi vésicale et les uretères, crée des zones de fibrose et de calcifications avec des signes d'uropathie obstructive. L'ensemble de l'arbre urinaire peut être touché : urétérohydronéphrose, lithiase vésiculaire, glomérulonéphrite...(35). La mortalité directement liée à la schistosomose urinaire est rare. Cependant, elle représente un facteur de risque de carcinome épidermoïde de la vessie (6).

4. Autres localisations

Les localisations ectopiques sont dues soit à une migration aberrante du parasite soit à des œufs emportés par la circulation sanguine via les anastomoses porto-cave. On retrouve le plus souvent des atteintes cardio-pulmonaires, neurologiques ou cutanées (35). La neuroschistosomose est la forme la plus grave avec des atteintes cérébrales (le plus souvent dues à *S. japonicum*) et/ou de la moelle épinière (préférentiellement dues à *S. mansoni* et *S. haema-*

tobium) (36)(37)avec des signes de compression médullaire, radiculite, myélite, troubles sensitifs et cutanés (35).

VI. Traitement

Le praziquantel est la principale molécule utilisée dans le traitement de la bilharziose depuis les années 1970. Ses nombreux avantages (efficacité après une seule prise orale, peu d'effets indésirables, faible coût...) permettent son utilisation à grande échelle.

Avec une biodisponibilité de 80%, le praziquantel est rapidement absorbé par voie orale, la $[C]_{\max}$ (concentration maximale de la molécule dans le sang) est atteint en 1 à 2 heures. Il est métabolisé par le foie par le cytochrome P450 et éliminé par voie urinaire (60-80%) et par voie biliaire (15-35%) avec une demi-vie de 1 à 2h. Il est actif sur toutes les espèces mais est actif uniquement sur les formes matures de 5 semaines ou plus. Il agit sur les deux sexes mais devient moins actif lorsque le mâle et la femelle sont séparés (38). Le mécanisme d'action exact reste encore inconnu mais son action a pu être observée *in vitro* et *in vivo* sur *S. mansoni* (39). Après contact avec la molécule, le ver adulte se contracte et de nombreuses vacuoles se créent au niveau du tégument. Des antigènes de surface ont ainsi démasqués et le ver devient plus susceptible aux anticorps de l'hôte (40).

Pour *S. haematobium* et *S. mansoni*, une dose de 40mg/kg *per os* en une ou deux prises le même jour est recommandée pour les bilharzioses uro-génitales et intestinales(41).Cependant, les réinfections sont fréquentes dans les zones d'endémie et un traitement répété sera nécessaire pour prévenir la progression de la maladie(19).En cas de schistosomose en phase d'invasion, un traitement par corticoïdes est préconisé et le praziquantel est déconseillé car il peut déclencher ou majorer des manifestations allergiques ou toxiques graves de type encéphalites (42).L'efficacité du traitement doit être vérifiée à 2, 6 et 12 mois avec des examens parasitologiques des selles ou des urines et la numération formule sanguine. Les polynucléaires éosinophiles et les anticorps anti-schistosomes augmentent souvent 2-3 mois après le traitement à cause de la lyse des vers puis se normalisent en 10-12 mois. Les anticorps peuvent persister plusieurs mois voire plusieurs années même après un traitement efficace, il est

donc inutile de vérifier l'efficacité du traitement par une sérologie. Si l'examen parasitologique est toujours positif au bout de 3 mois, le traitement doit être répété (35).

VII. Diagnostic

A. Biologie non spécifique

Au cours de la phase d'invasion, une hyperéosinophilie sanguine peut être observée, avec des polynucléaires éosinophiles supérieurs à 500 éléments/ μL de sang. Le taux sérique des IgE totales peut aussi augmenter (≥ 150 KUI/L pour un adulte). Ces marqueurs sont moins élevés au cours de la phase d'état de la maladie.

En cas de schistosomose uro-génitale, une hématurie est présente dans 40% des cas, bien que non spécifique (43).

B. Biologie spécifique

1. Diagnostic microscopique

Pendant la phase d'invasion, le diagnostic microscopique n'est pas contributif. En effet, le parasite doit arriver à maturité pour pondre (4 à 6 semaines après l'infection pour la bilharziose intestinale et 3 mois pour la bilharziose urinaire), et les œufs doivent transiter à travers la paroi de la vessie ou de l'intestin. Les œufs ne sont excrétés que 5 à 10 semaines après l'infection. Aucun diagnostic ne peut se faire en phase pré-patente pour cette technique (11).

La forme et la taille des œufs varient selon l'espèce (Figure 10) :

- *S. haematobium* : les œufs sont de forme ovale avec un pôle se terminant par une pointe, l'éperon. Lorsqu'ils sont mûrs, leur taille s'échelonne entre 120-160 μm x 55-65 μm .
- *S. mansoni* : ovoïdes présentant un éperon latéral. Taille de 130 à 160 μm de long sur 60 à 70 μm de large.

- *S. intercalatum*: très proches morphologiquement de ceux de *S. haematobium*, 140 à 240 μm de long sur 50 à 85 μm de large, avec un éperon terminal et le pôle opposé à l'éperon est souvent rétréci.
- *S. japonicum* : les œufs sont petits (60 à 78 μm de long sur 45 à 55 μm de large) globuleux avec un petit éperon latéral, parfois absent.



Figure 10 : Œufs de *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. intercalatum* (www.cdc.gov)

a) Examen microscopique des urines

L'examen se fait sur des urines de 24h ou sur la première miction matinale ou sur une miction après un effort physique (marche par exemple). Les urines sont acheminées rapidement à température ambiante au laboratoire. Après deux heures de décantation, le culot urinaire est centrifugé et observé au microscope au grossissement $\times 10$. Seul *S. haematobium* est retrouvé dans les urines.

b) Examen microscopique des selles

L'examen se fait préférentiellement sur la partie supérieure de la matière fécale. Des techniques de concentrations sont nécessaires pour augmenter la sensibilité : techniques de sédimentation, de flottation (recueil de la partie superficielle), diphasiques (recueil du culot). L'examen doit se faire au minimum sur 3 selles à des moments différents pour avoir une sensibilité correcte. La recherche dans les selles s'effectue pour toutes les espèces sauf *S. haema-*

tobium, bien que des œufs de cette espèce puissent être retrouvés exceptionnellement dans les selles (44).

Ces méthodes ont pour avantages d'avoir un faible coût, d'avoir une bonne spécificité et d'être facile à réaliser en raison du peu de matériel requis. La sensibilité est meilleure pour les infections à charges parasitaires élevées, elle est moindre pour les infections à faibles charges parasitaires (ce qui est souvent le cas chez les bilharzioses d'importation des voyageurs) et dans les régions de basse prévalence. La sensibilité moyenne de cette technique est de 15 à 40% (45). On peut augmenter cette sensibilité en répétant la recherche plusieurs jours d'affilée (46) mais cela peut poser un problème de compliance pour le patient. L'excrétion des œufs peut aussi varier d'un jour à l'autre, en particulier pour les infections de faible intensité (47) ou après un traitement par praziquantel, mais cela permet aussi de vérifier l'efficacité du traitement par la décroissance de la quantité d'œufs (48).

c) Examen anatomopathologique d'une biopsie

La recherche d'œufs peut également se faire avec une biopsie colique, rectale ou vésicale par examen anatomo-pathologique en cas de lésions macroscopiques suspectes ou de symptômes évocateurs associés à un diagnostic microscopique et sérologique négatif.

2. Immunodiagnostic

a) Détection des anticorps

La production d'anticorps débute en moyenne 4 à 7 semaines après l'infection et la majorité des patients font leur séroconversion dans les 3 mois (49). Le pic d'immunoglobulines M (IgM) s'observe 12 à 16 semaines après l'infection et le pic d'immunoglobulines G (IgG) à 20 semaines (11). Les anticorps peuvent persister plusieurs mois voire plusieurs années même après un traitement efficace. Les techniques de diagnostic sérologique ne permettent donc pas

de dater une infection mais ont l'avantage de pouvoir détecter les infections débutantes et les infections de faible intensité. En cas d'un premier dépistage négatif, si le délai entre l'exposition et le prélèvement est inférieur à 10 semaines, il faut réitérer le dépistage.

- Immunofluorescence indirecte : Cette technique utilise des coupes de vers adultes mis en contact avec les anticorps du patient puis révélés par fluorescence. La présence d'IgG est détectée grâce à une fluorescence localisée au niveau du parenchyme et du tube digestif du ver tandis que les IgM sont détectées avec une fluorescence uniquement au niveau du tube digestif du ver(50). D'autres techniques utilisent des coupes d'œufs ou de cercaires. Malgré une bonne sensibilité, le coût de cette méthode, la nécessité d'un microscope à fluorescence et d'un personnel expérimenté rendent cette technique peu utilisée.
- Hémagglutination indirecte : Cette technique permet la quantification des anticorps sériques anti-schistosome. Différentes dilutions du sérum du patient sont mises en contact avec des hématies sensibilisées recouvertes par un antigène de *Schistosoma*(51) dans des cupules à fond en U. En cas de présence d'anticorps, une réaction d'hémagglutination se produit et un voile rouge-marron se crée dans la cupule. En cas d'absence d'anticorps, les hématies sédimentent au fond de la cupule en formant un point ou un anneau. Le titre d'anticorps présents dans le sérum est donné par la 1^{ère} dilution présentant un anneau large et périphérique (Figure 11). Ce test a l'avantage d'être facile à réaliser et applicable sur de grandes séries d'échantillons.

Exemple :

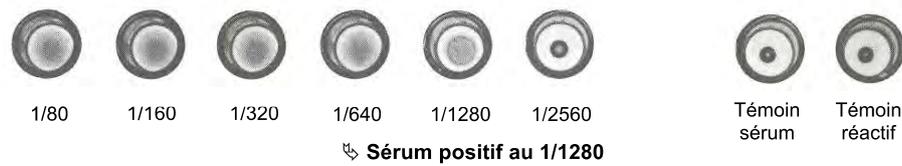


Figure 11 : Extrait de la notice fournisseur Bilharziose Fumouze®

- ELISA : Pour ce test, le sérum du patient est déposé dans des puits recouverts d'antigènes solubles de *Schistosoma* et les anticorps vont se lier aux antigènes. Les puits sont lavés pour éliminer les anticorps, non spécifiques, non liés. Après lavage, un conjugué est ajouté et va se lier aux complexes antigènes-anticorps. Puis un substrat est ajouté pour visualiser la réaction. La densité optique (DO) du puits est ensuite mesurée au spectrophotomètre, elle sera proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le sérum. La DO d'un témoin faible est également mesurée et le test est considéré comme positif lorsque le ratio DO patient / DO témoin faible est supérieur au seuil fixé par le fabricant. Les antigènes utilisés sont généralement des antigènes d'adultes ou d'œufs mais des antigènes de cercaires donnent des résultats similaires (52).
- Test de diagnostic rapide d'anticorps : Ce type de test se présente sous la forme de cassettes unitaires immuno-chromatographiques où des antigènes sont déposés sur une bandelette de nitrocellulose. Une solution éluante permet de faire migrer l'échantillon. Les anticorps de l'échantillon se complexent aux antigènes et la réaction est visualisée par l'apparition d'une bande. En zone d'endémie, ce test s'est montré au moins aussi sensible que deux examens parasitologiques des selles pour les infections à *S. mansoni* et aussi sensible qu'un examen parasitologique des urines pour les infections à *S. haematobium*(53). L'avantage est qu'il peut être réalisé directement auprès du malade à

partir d'un prélèvement au bout du doigt. Cependant, en zone non endémique, il a été peu étudié et d'autres tests sont nécessaires pour l'évaluer (54).

- Western Blot : Des antigènes de *Schistosoma* sont séparés par électrophorèse puis fixés sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane est découpée en bandes-lettes qui sont mises en contact avec le sérum. Si l'échantillon contient des anticorps, ceux-ci se fixent aux antigènes et le complexe apparaît sous forme de bandes. En fonction de la présence de bandes spécifiques, le sérum est diagnostiqué positif. Suivant les antigènes utilisés, des réactions croisées peuvent se produire entre différentes espèces (55). Cette technique semble être la plus sensible et la plus spécifique (56) et est, actuellement, utilisée en deuxième intention comme test de confirmation d'un dépistage positif ou douteux.

b) Détection d'antigènes

Deux principaux antigènes peuvent être détectés dans la circulation sanguine ou dans les urines : l'antigène circulant anodique (CCA) et l'antigène circulant cathodique (CAA), protéoglycanes nommés selon leur migration en électrophorèse. Ces antigènes ne sont pas spécifiques d'espèces car ils présentent des carbohydrates communs entre les différentes espèces (48). La sensibilité du CAA peut être comparé à celle d'un examen parasitologique au microscope, sa limite de détection correspondant à 10 œufs par gramme de fèces (57). Comme pour l'examen microscopique, l'avantage est de pouvoir évaluer l'efficacité du traitement. Pour les infections récentes ou de faible intensité, le diagnostic sérologique reste plus sensible (58). Cette technique nécessite d'autre part l'utilisation de matériel de filtration particulier (59) ce qui ne lui confère pas de supériorité par rapport au diagnostic microscopique.

3. Biologie moléculaire

Différentes études sur des techniques de PCR en temps réel ont été menées (60)(61)(62). La recherche d'ADN de *Schistosoma* est possible dans le sang, les urines et les selles avec de bonnes sensibilités et spécificités, y compris pour les infections de faibles intensités. Bien qu'encore peu utilisée en routine, son utilisation devrait se développer dans les années à venir.

Comparaison de 5 réactifs
pour le sérodiagnostic de la schistosomose
au CHU de Toulouse

I. Contexte

Comme nous l'avons vu précédemment et malgré le grand nombre de techniques disponibles, aucun algorithme n'est clairement établi concernant le dépistage et la confirmation du diagnostic sérologique de schistosomose. Le diagnostic s'établit avec certitude lorsque des œufs sont observés mais cette technique reste peu sensible et pose problème pour le diagnostic des infections à faible charge parasitaire (zones non-endémiques ou voyageur). Pour ces cas-là, le diagnostic sérologique reste plus approprié. Le dépistage sérologique se fait en général par deux techniques différentes (63).

L'épidémie de schistosomose en Corse survenue en 2013 a été le facteur déclenchant de ce travail. En effet, outre l'existence de sujets infectés par une espèce hybride, le grand nombre de tests réalisés a suscité de nombreuses interrogations. Antérieurement à cet épisode, un patient était considéré comme atteint de schistosomose si l'un des deux tests de dépistage était positif. L'observation d'un grand nombre de discordances entre les tests chez les patients infectés en Corse a entraîné une remise en question de la stratégie mise en œuvre pour le sérodiagnostic des schistosomoses au CHU de Toulouse, avec la nécessité, éventuelle, de mettre en place un test de confirmation. Par ailleurs, la majorité des kits commercialisés utilisent des antigènes de *S. mansoni* qui présentent une meilleure sensibilité pour les infections à *S. mansoni* que pour les autres espèces (49).

Peu de publications ont comparé ces différentes techniques sérologiques. La plupart ont étudié des techniques « maison » (non commercialisées)(54)(64)(65). Il n'existe aucun algorithme de diagnostic clairement recommandé. L'objectif de cette étude était donc d'évaluer les réactifs commercialisés en France en termes de sensibilité et de spécificité afin de proposer une stratégie analytique pour le sérodiagnostic de schistosomoses au retour de voyage.

II. Matériels et méthodes

A. Collecte des sérums

Les sérums de patients ayant bénéficié d'une recherche de schistosomose par immunodiagnostic ont été prospectivement conservés dans une sérothèque. Les sérums étudiés sont issus des sérothèques des Services de Parasitologie des CHU de Toulouse, Angers, Nice, Avicenne, Marseille, de l'Hôpital d'Instruction des Armées de Laveran (Marseille) et de la société LDBio Diagnostic®. Les sérums ont été conservés à -20°C.

La sélection des sérums a été faite dans le but de créer trois groupes de patients :

- Patients avec une infection prouvée : l'examen parasitologique à la recherche d'œufs ou la biologie moléculaire ont permis d'établir avec certitude le diagnostic de schistosomose (présence d'œuf ou présence d'ADN).
- Patients avec une infection possible : un des tests sérologiques était positif sans notion d'examen parasitologique positif, qu'il ait été réalisé ou non.
- Patients non atteints par une schistosomose : patients dont les 3 tests sérologiques réalisés en routine au laboratoire du CHU de Toulouse (HA Fumouze®, ELISA Bordier® et Western-BlotLDBio®) étaient négatifs et des patients ayant une sérologie positive pour un autre pathogène (exploration des réactions croisées).

B. Trousses diagnostic évaluées

Cinq trousse de diagnostic ont été évaluées. Il s'agit de techniques disponibles en France. Certaines d'entre elles sont commercialisées par plusieurs fournisseurs. Pour l'étude, un seul fournisseur par technique a été choisi. Toutes ces trousse ont été testées de janvier 2016 à mai 2016 à selon les recommandations du fournisseur :

- BILHARZIOSE FUMOUCZE® (HAFumouze®) : ce kit d'hémagglutination indirecte utilise des hématies de mouton sensibilisées avec des antigènes de *S. mansoni* adultes (65). Celles-ci ont été mises au contact des 3 dilutions de chaque sérum : au 1/80, au 1/160 et au 1/320. La réaction a été lue après une incubation de 2h à température ambiante. Le titre du sérum était donné par la dernière dilution qui ne présentait pas un point de sédimentation des hématies au fond du puits (Tableau 3)(Annexe 1).
- SCHISTOSOMA MANSONI BORDIER® (ELISABordier®) : Dans ce test immunoenzymatique, les puits sont recouverts d'antigènes d'œufs et d'adultes de *S. mansoni*. La DO a été mesurée à 405 nm. Pour chaque plaque, un témoin négatif, un témoin négatif et un témoin sérum seuil ont également été testés. Le résultat est rendu sous forme d'un index correspondant au rapport de la DO du patient sur la DO seuil (Tableau 3)(Annexe 2).
- NOVALISA SCHISTOSOMA MANSONI IgG/IgM ELISA (ELISA Novatec®) : Dans ce test immunoenzymatique, les puits sont recouverts d'antigènes solubles d'adultes de *S. mansoni* (49). La DO des puits a été mesurée à 450 et à 620 nm. Pour chaque plaque, un témoin négatif, un témoin négatif et deux témoins seuil sont testés. Le résultat est rendu sous forme d'un index correspondant au rapport de la DO du patient sur la DO seuil $\times 10$ (Tableau 3) (Annexe 3).
- SCHISTOSOMA ICT IgG-IgM LDBio Diagnostics® (TDR LDBio®) : Test immunochromatographique de diagnostic rapide unitaire basé sur le principe du sandwich homogène. Sur une bandelette de nitrocellulose, deux bandes réactives contiennent des antigènes d'adultes de *S. mansoni* (bande T « test ») et des gammaglobulines de lapin

(bande C « contrôle »). Le sérum est déposé dans un puits avec une solution éluante qui va permettre la migration du sérum ainsi que des particules de latex rouges couplées à l'antigène *S. mansoni* (latex T) et des particules de latex bleues couplées à un sérum de chèvre anti-IgG de lapin (latex C). La migration dure 20 à 30 minutes. La capture du latex par la bande C provoque l'apparition d'une bande colorée en bleu, témoin du bon fonctionnement de la chromatographie. En cas de présence d'anticorps dans l'échantillon, un complexe se forme entre les anticorps du patient et le latex T. Ce complexe est capturé par la bande T et se traduit par l'apparition d'une bande colorée en rouge. Aucune lecture de bande ne doit se faire avec un temps de migration supérieur à 30 minutes (Tableau 3).

- SCHISTO II Western Blot IgG LDBio Diagnostics® (WB LDBio®) : des antigènes de vers adultes de *S. mansoni* et *S. haematobium* ont été séparés par électrophorèse puis fixés par électro-transfert à la surface d'une feuille de nitrocellulose. Les anticorps du sérum du patient se fixent sélectivement sur les antigènes. Les anticorps sont ensuite liés par un conjugué puis un substrat permet de révéler les antigènes reconnus sous forme de bandes transversales violettes. Les bandes vont de 8 à 24 kDa. Huit bandes sont le plus souvent présentes : P8, P9, P10, P12-13, P14-15, P18, P22-24 et P30-34. Les bandes de bas poids moléculaire sont habituellement fines. Les autres bandes peuvent prendre la forme d'une seule bande large, d'une bande fine ou de deux bandes fines. La présence de l'une des bandes P30-34 ou P22-24 est indicative d'une bilharziose. Une bande P28 peut apparaître, elle est non spécifique de *Schistosoma* (Figure 12 : Bande de WB positive) (Tableau 3) (Annexe4).

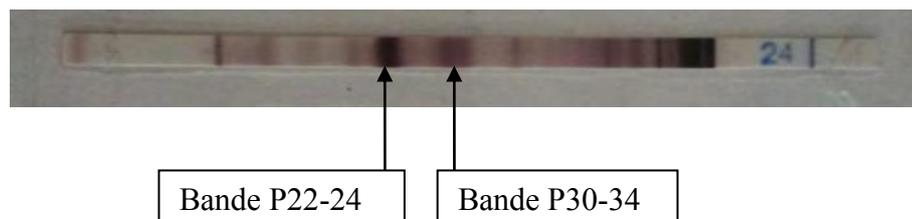


Figure 12 : Bande de WB positive

Tableau 3 : Seuils de positivité en fonction des techniques

Réactifs	Seuil négatif	Zone grise	Seuil positif
HA Fumouze® (Titre)	< 160	NA	≥ 160
ELISA Bordier® (Index)	< 1	NA	≥ 1
ELISA Novatec® (Index)	< 9	9-11	≥ 11
TDR LDBio®		Bande T gris pâle	Bandes C et T
WB LDBio®		NA	Bandes P30-34 et P22-24 ou 1 bande P30-34 large

C. Analyse statistique

1. Population de l'étude

Les caractéristiques de la population et les résultats des différentes techniques ont été décrits en utilisant les pourcentages ou la médiane et son intervalle interquartile (IQR) au vu des distributions non gaussiennes.

2. Détermination d'un test de confirmation

Afin de choisir le ou les tests qui auraient les meilleures performances analytiques pour être utilisés comme techniques de confirmation, une évaluation des sensibilités et spécificités de chaque test a été faite à partir des sérums de patients vrais positifs (groupe infection prouvée) et des patients ayant une sérologie positive pour un autre pathogène (non malades, exploration des réactions croisées). Lorsqu'un même patient possédait plusieurs sérums, seul le pre-

mier sérum prélevé a été étudié. Les sérums ont été considérés comme positifs dès leur entrée en zone grise (s'il en existait une) selon les seuils recommandés par les différents fournisseurs (Tableau 3). Les sensibilités de chaque test ont été ensuite à nouveau calculées en fonction des espèces.

3. Performances statistiques des tests de dépistage

Une fois le test de confirmation choisi, les tests restants ont de nouveau été évalués en prenant comme test de référence le test de confirmation. Un calcul de sensibilité et de spécificité a alors été réalisé sur tous les sérums sélectionnés (infection prouvée, infection possible et non malade avec ou sans autre pathogène) en prenant uniquement le premier sérum prélevé par patient. L'analyse des résultats a été faite à l'aide de courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) afin de déterminer, pour chaque test quantitatif, quel seuil serait le plus adapté pour le dépistage des schistosomoses.

Les résultats des dosages ont été comparés en fonction de l'espèce en cause en utilisant un test du χ^2 pour les tests qualitatifs et un test de Kruskal-Wallis pour les variables quantitatives. La comparaison des sensibilités et des spécificités a été faite par un test d'égalité des proportions. Les aires sous la courbe ROC des trois réactifs quantitatifs ont été comparées par un test du χ^2 . Le seuil de significativité était fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel : Intercooled Stata 9.2 statistical package (StataCorp, College Station, TX).

III. Résultats

A. Population de l'étude

Au cours de la période d'étude, 468 sérums ont été analysés provenant de 399 patients

Seul le 1^{er} sérum de chaque patient a été inclus dans l'évaluation des tests diagnostics.

Parmi les 399 sérums étudiés :

- 144 provenaient de patients appartenant au groupe « infection prouvée ». La répartition entre les espèces est représentée sur la Figure 13. Chez deux patients des œufs ont été observés mais l'espèce n'a pas pu être identifiée. 12 de ces patients avait été contaminés en Corse par *S. haematobium* ou un hybride *S. haematobium-bovis*, ils ont été classés avec les *S. haematobium*.
- 81 provenaient de patients non atteints par une schistosomose, sérums dits « négatifs ». Ils étaient répartis comme suit : 32 ayant une sérologie positive pour un autre pathogène (5 sérums avec une sérologie filaire positive, 5 à anguillule, 5 à ascaris, 5 à Toxocara, 1 à paludisme, 1 à leishmanie, 1 à amibe, 3 à VHB, 3 à VHC et 3 à VIH) et 49 pour qui les 3 tests sérologiques réalisés en routine au laboratoire du CHU de Toulouse (HA Fumouze®, ELISA Bordier® et Western-Blot LDBio®) étaient négatifs.
- 174 sérums provenaient de patients appartenant au groupe « infection possible ».

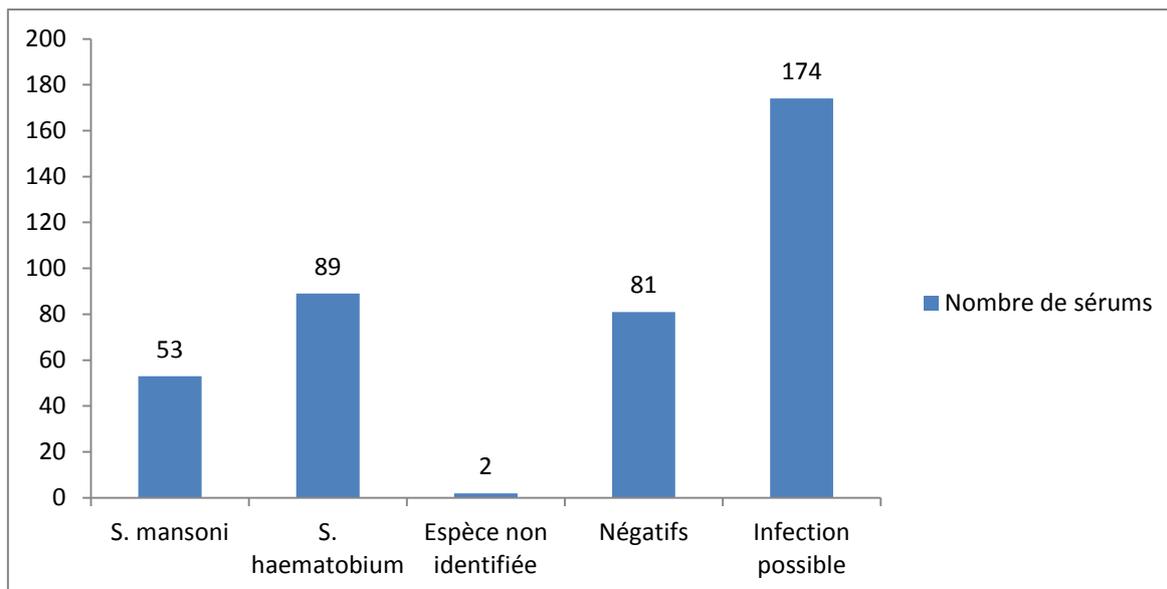


Figure 13 : Répartition du nombre de sérums en fonction des groupes de patients

Le Tableau 4 montre la répartition des résultats des dosages des tests quantitatifs.

Tableau 4 : Répartition des dosages de l' HA Fumouze®, de l'ELISA Bordier® et de l'ELISA Novatec®

Réactifs	Nombre de tests N	Médiane [IQR]	Min-Max
HA Fumouze®(Titre)	464	80 [0 ; 320]	0-10240
ELISA Bordier®(Index)	465	1,71 [0,60 ; 2,89]	0-8,99
ELISA Novatec®(Index)	371	25,72 [7,72 ; 45,82]	0,78-92,51

Le Tableau 5 montre la répartition des résultats des tests qualitatifs.

Tableau 5 : Répartition des résultats du Western-Blot et du TDR LDBio®

Réactifs	Nombre de tests N	Nombre de tests positifs N (%)
Western-BlotLDBio®	447	294 (65,77)
TDR LDBio®	258	204 (79,07)

Les résultats des tests HA Fumouze® et ELISA Bordier® étaient significativement plus élevés en cas d'infection par *S. mansoni* que d'infection par *S. haematobium*. Ce n'était pas le cas

pour l'ELISA Novatec® (Figure 14) (Tableau 6 : Comparaison des résultats des tests quantitatifs en fonction de l'espèce de *Schistosoma*, par technique).

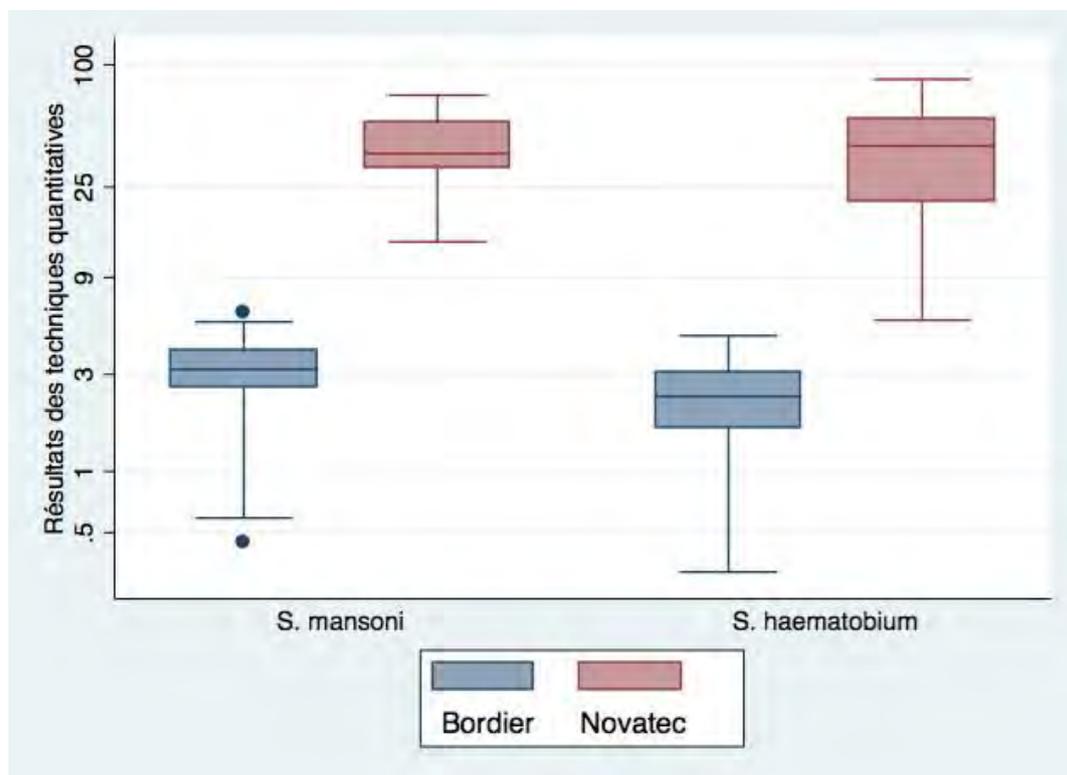


Figure 14 : Distribution des résultats des ELISA en fonction de l'espèce de *Schistosoma*

Tableau 6 : Comparaison des résultats des tests quantitatifs en fonction de l'espèce de *Schistosoma*, par technique

Réactifs	Espèce	Nombre de tests	Médiane [IQR]	p
HA Fumouze® (Titre)	<i>S. mansoni</i>	74	320 [160 ; 320]	0,0115
	<i>S. haematobium</i>	101	160 [80 ; 320]	
ELISA Bordier® (Index)	<i>S. mansoni</i>	74	3,125 [2,51 ; 4,03]	< 0,001
	<i>S. haematobium</i>	101	2,33 [1,6 ; 3,0]	
ELISA Novatec® (Index)	<i>S. mansoni</i>	58	38,385 [30,5 ; 55,91]	0,5615
	<i>S. haematobium</i>	89	40,05 [32,34 ; 58,48]	

B. Détermination d'un test de confirmation

Le Tableau 7 montre les spécificités des différents réactifs, les « non malades » étant les patients du groupe « Non atteint d'une schistosomose » ayant une sérologie positive pour un autre pathogène (recherche de réactions croisées).

Tableau 7 : Spécificité de chaque trousse

Réactifs	Non malades N	Test négatif N	Spécificité % [CI _{95%}]
HA Fumouze®	32	31	96,88 [94,28 ; 99,47]
ELISA Bordier®	32	32	100 [100 ; 100]
ELISANovatec®	32	27	84,38 [78,75 ; 90,00]
WB LDBio®	32	32	100 [100 ; 100]
TDRLDBio®	23	23	100 [100 ; 100]

Le faux positif de l'HA Fumouze® était une réaction croisée avec une sérologie paludisme positive. Les faux positifs de l'ELISA Novatec® étaient des réactions croisées avec 3 sérologies anguillules, 1 sérologie filaire et 1 sérologie *Toxocara*.

Il existe une différence significative de spécificité entre le Western-Blot et l'HA Fumouze® ($p=0,02$) et entre le Western-Blot et l'ELISA Novatec® ($p<0,001$). L'HA Fumouze® et l'ELISA Novatec® ne peuvent donc pas être utilisés comme test de confirmation.

Le Tableau 8 montre les sensibilités des différents tests, par rapport au diagnostic de certitude :

Tableau 8 : Sensibilité de chaque test

Réactifs	Schistosomoses prouvées N	Test positif N	Sensibilité %[CI _{95%}]
HA Fumouze®	141	99	70,21 [63,40 ; 77,03]
ELISA Bordier®	141	127	90,07 [85,61 ; 94,53]
ELISA Novatec®	128	123	96,09 [93,09 ; 99,10]
WB LDBio®	138	134	97,10 [94,58 ; 99,62]
TDR LDBio®	88	84	95,45 [91,58 ; 99,33]

Parmi les trois réactifs ayant une spécificité de 100%, il existe une différence significative de sensibilité entre l'ELISA Bordier® et le Western-Blot ($p=0,08$). L'ELISA Bordier® est donc aussi éliminé des choix du test de confirmation.

En revanche, nous n'observons pas de différence significative entre la sensibilité du Western-Blot et celle du TDR LDBio® ($p=0,465$). Ces deux réactifs peuvent donc être utilisés comme tests de confirmation.

Comme le montre la Figure 15, les sensibilités des tests ont été calculées en fonction de l'espèce en cause.

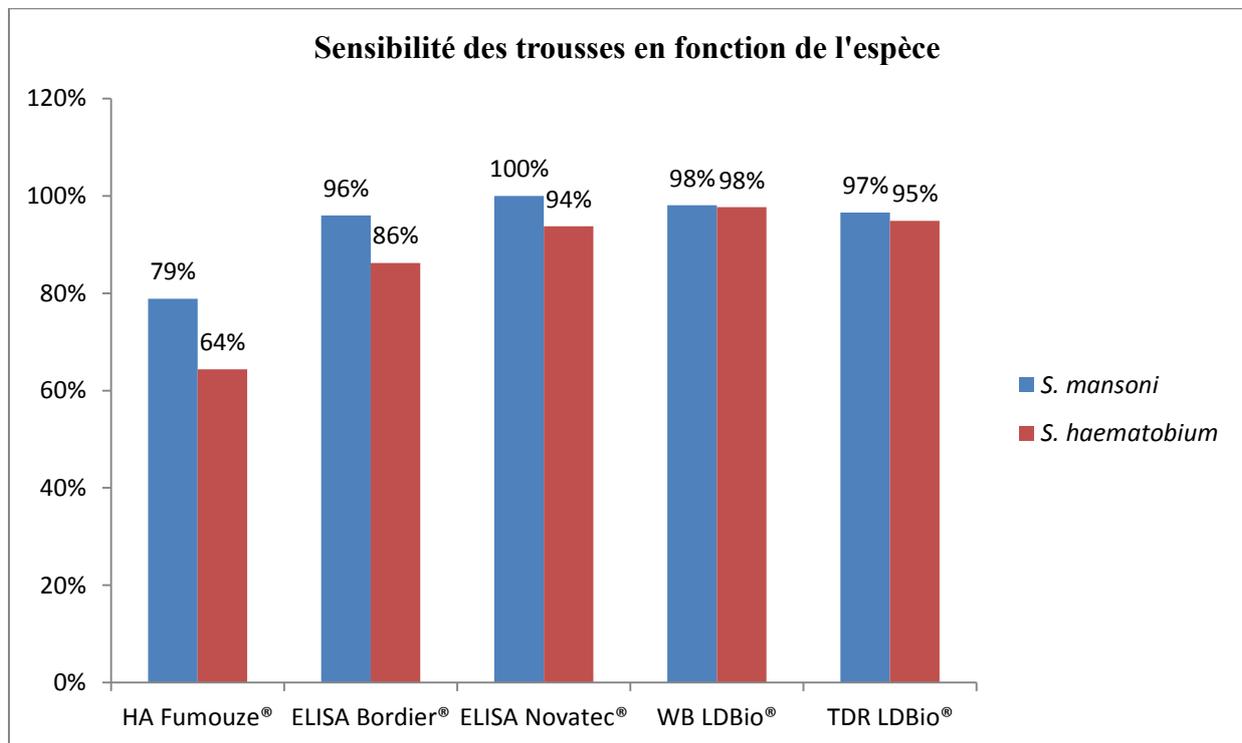


Figure 15 : Sensibilité des trousses en fonction de l'espèce

Il existe une différence de sensibilité significative selon les espèces pour l'HA Fumouze® ($p=0,0261$), l'ELISA Bordier® ($p=0,0183$) et l'ELISA Novatec® ($p<0,001$).

En revanche, pour le Western-Blot ($p=0,8526$) et le TDR LDBio® ($p=0,6405$), les sensibilités ne sont pas significativement différentes selon les espèces.

Parmi les 12 patients ayant une infection prouvée après contamination en Corse :

- un patient avait des résultats négatifs avec l'ELISA Bordier® et l'HA Fumouze®
- un patient avait des résultats négatifs avec les ELISA Bordier® et Novatec®
- un patient avait des résultats négatifs avec l'HA Fumouze seul®

La sensibilité des différents tests semblait être identique à celle de la population totale de l'étude.

C. Performances analytiques des tests de dépistage

Le Western-Blot et le TDR LDBio® peuvent être tous les deux considérés comme test de confirmation pour la suite de l'analyse. Cependant, le test choisi sera le Western-Blot LDBio® en raison d'un plus grand nombre de données disponibles avec ce test dans notre étude. Tous les patients présentant un Western-Blot positif seront donc considérés comme étant malades, c'est-à-dire, atteints d'une schistosomose prouvée.

Le Tableau 9 montre la sensibilité et la spécificité des différents tests, le test de référence étant le Western-Blot.

Tableau 9 : Sensibilité et spécificité des différentes techniques par rapport au Western-Blot (au seuil de positivité du fournisseur)

	Sensibilité %[CI_{95%}]	Spécificité %[CI_{95%}]
HA Fumouze®	62,82 [57,99 ; 67,65]	92,67 [90,06 ; 95,27]
ELISA Bordier®	90,21 [87,24 ; 93,18]	85,33 [81,80 ; 88,87]
ELISA Novatec®	94,74 [92,32 ; 97,15]	75,00 [70,32 ; 79,68]

D'après ces résultats, l'ELISA Novatec® semble le plus adapté au dépistage. En calculant l'aire sous la courbe ROC de ces techniques, nous pouvons visualiser laquelle est réellement la plus performante.

La Figure 16 montre les courbes ROC des trois techniques quantitatives.

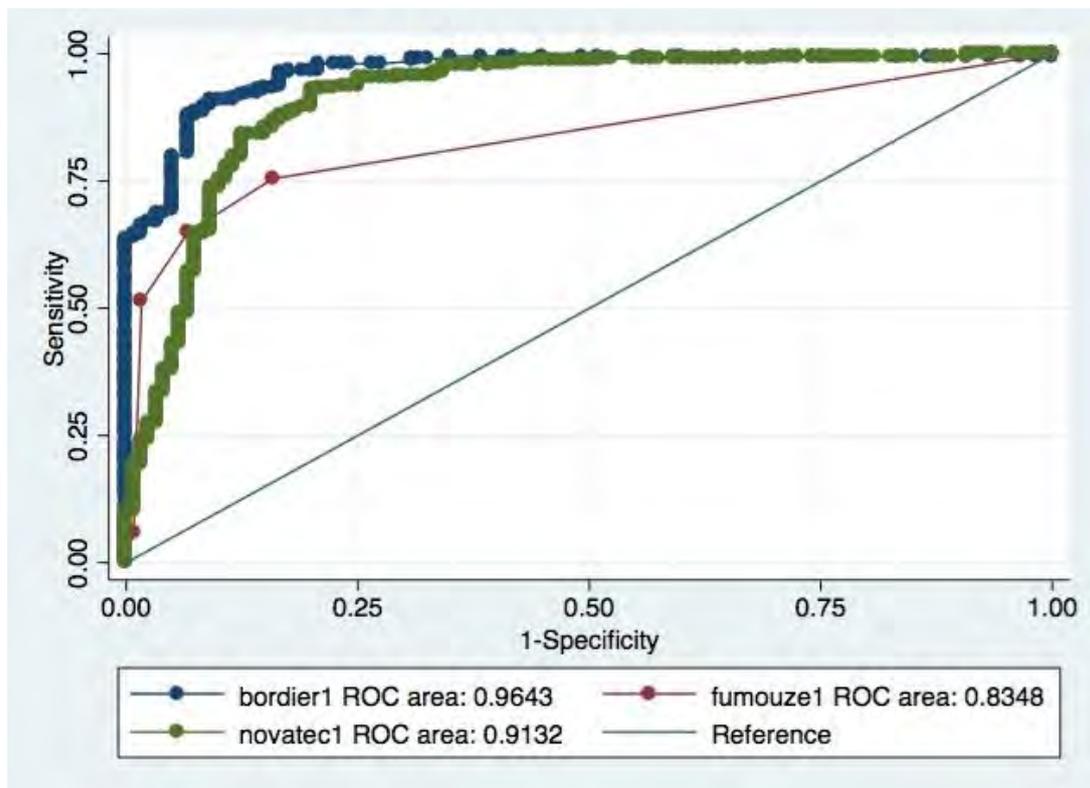


Figure 16 : Courbe ROC des trois tests quantitatifs

L'ELISA Bordier® a une aire sous la courbe significativement plus grande que l'ELISA Novatec® et l'HA Fumouze® ($p < 0,001$, dans les deux cas). Ce qui montre que l'ELISA Bordier® est en réalité le test le plus performant pour le dépistage.

La différence de résultats par rapport aux sensibilités et spécificités calculées précédemment s'explique probablement par le fait que l'ELISA Novatec® possède une zone grise qui abaisse son seuil de positivité. En modifiant le seuil, il est donc possible de modifier les performances des tests.

Les Tableaux 10, 11 et 12 montrent les rapports détaillés des sensibilités et spécificités des tests quantitatifs en fonction du seuil choisi, le test de référence étant le Western-Blot.

Tableau 10 : Rapport détaillé des sensibilités et spécificités de l'HA Fumouze®

Titre	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
0	100,00	0,00
80	76,07	80,00
160	62,82	92,67
320	47,86	98,67
>320	10,68	99,33

Tableau 11 : Extrait du rapport détaillé des sensibilités et spécificités de l'ELISA Bordier®

Index	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
0	100,00	0,00
0,1	99,57	11,33
0,26	99,15	49,33
0,33	98,30	56,67
0,59	97,02	71,33
0,80	92,77	79,33
1,01	90,21	85,33
1,09	89,36	88,00

Tableau 12 : Extrait du rapport détaillé des sensibilités et spécificités de l'ELISA Novatec®

Index (Seuil)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
6,78	97,61	65,83
6,88	97,13	65,83
7,2	96,65	65,83
8,8	95,22	75,00
9,05	94,74	75,00
10,97	88,52	81,67
11,07	88,52	82,50

IV. Discussion

Grâce à cette étude, nous avons pu mettre en évidence tout d'abord que le Western-Blot et le TDR LDBio® étaient les meilleurs tests de confirmation et l'ELISA Bordier® le meilleur test de dépistage.

Le Western-Blot et le TDR LDBio® sont les techniques qui présentent les meilleures sensibilités et spécificités. Toutes les techniques testées utilisent des antigènes de *S. mansoni*, à l'exception du Western-Blot LDBio® qui utilise à la fois des antigènes de *S. mansoni* et de *S. haematobium*. Nous avons montré que les sensibilités des tests étaient significativement différentes selon l'espèce diagnostiquée pour l'HA Fumouze®, l'ELISA Bordier® et l'ELISA Novatec®, ce qui paraît cohérent par rapport aux antigènes utilisés. Elles sont cependant équivalentes pour, le Western-Blot et le TDR LDBio®. Pour ces trousse, les espèces autres que *S. mansoni* n'ont donc pas moins de chances d'être dépistées. Le TDR LDBio® reste cependant trop coûteux pour être utilisé comme test de routine, ce qui orienterait le choix du meilleur test de confirmation vers le Western-Blot.

En calculant les sensibilités des tests de dépistage, l'ELISA Novatec® semblait dans un premier temps la meilleure technique. Mais en observant les aires sous la courbe ROC, nous avons vu que l'ELISA Bordier® était en réalité le test le plus performant. Ceci pourrait s'expliquer par l'absence de zone grise pour l'ELISA Bordier®. Un bon test de dépistage doit avoir la meilleure sensibilité possible, proche de 100%. Cependant il doit aussi avoir une spécificité acceptable de manière à ne pas réaliser trop de tests de confirmation. En abaissant le seuil de positivité du test de dépistage, il est possible d'améliorer la sensibilité du test. Par contre, la spécificité, elle, diminue. Si nous considérons que le dépistage doit avoir une sensibilité au moins égale à celle du test de confirmation, le Western-Blot, c'est-à-dire 97%, grâce

à la courbe ROC, nous pouvons choisir un nouveau seuil de positivité pour avoir une sensibilité de 97% et une spécificité suffisante pour ne pas réaliser trop de tests de confirmation. Le Tableau 13 compare les performances des différents tests de dépistage par rapport au Western-Blot, avec le seuil du fournisseur et les nouveaux seuils choisis grâce à la courbe ROC pour les tests quantitatifs.

Tableau 13 : Comparaison des sensibilités et spécificités des tests de dépistage aux seuils du fournisseur et aux nouveaux seuils de positivité

	Seuil de positivité		Sensibilité %[CI_{95%}]	Spécificité %[CI_{95%}]
HA Fumouze®	Seuil fournisseur	160	62,82 [57,99 ; 67,65]	92,67 [90,06 ; 95,27]
	Nouveau seuil	80	76,07 [71,80 ; 80,34]	80,00 [76,00 ; 84,00]
ELISA Bordier®	Seuil fournisseur	1	90,21 [87,24 ; 93,18]	85,33 [81,80 ; 88,87]
	Nouveau seuil	0,59	97,02 [95,32 ; 98,72]	71,33 [66,82 ; 75,85]
ELISA Novatec®	Seuil fournisseur	9	94,74 [92,32 ; 97,15]	75,00 [70,32 ; 79,62]
	Nouveau seuil	6,78	97,61 [95,96 ; 99,26]	65,83 [60,71 ; 70,96]

Le dépistage d'une schistosomose se fait habituellement sur deux techniques différentes(63). Mais en ayant fixé de nouveaux seuils de positivité, on peut s'interroger sur l'utilité d'associer plusieurs techniques.

Le dépistage peut se faire soit :

- par un test **HA Fumouze® seul**
- par un test **ELISA Bordier® seul**
- par un test **ELISA Novatec® seul**
- par un test **HA Fumouze® associé à un test ELISA Bordier®**
- par un test **HA Fumouze® associé à un test ELISA Novatec®**

Le Tableau 14 montre les performances des tests seuls ou en association suivant les seuils choisis :

Tableau 14 : Sensibilité des tests de dépistage en association avec les seuils fournisseur et nouveaux seuils de positivité

	Seuil de positivité	Sensibilité % [CI_{95%}]	Spécificité % [CI_{95%}]
HA Fumouze®	Seuil fournisseur	93,27 [90,56 ; 95,98]	82,50 [78,39 ; 86,61]
	+		
ELISA Bordier®	Nouveau seuil	98,08 [96,59 ; 99,56]	66,67 [61,57 ; 71,77]
HA Fumouze®	Seuil fournisseur	97,12 [95,30 ; 98,93]	71,67 [66,79 ; 76,54]
	+		
ELISA Novatec®	Nouveau seuil	99,52 [98,77 ; 100,27]	58,33 [53,00 ; 63,67]

En comparant statistiquement les performances de tous les tests, seuls ou en association, avec les seuils fournisseur ou les nouveaux seuils, nous observons que les meilleures stratégies de dépistage (pas de différence significative, $p > 0,3655$) sont :

- Soit un ELISA Bordier® seul avec le nouveau seuil
- Soit une association HA Fumouze® + ELISA Bordier® au nouveau seuil
- Soit une ELISA Novatec® seul avec le nouveau seuil

Les performances de l'ELISA Bordier® seul ou en association avec l'HA Fumouze® ne sont significativement pas différentes ($p = 0,3655$), nous pouvons donc nous interroger sur l'intérêt d'associer ces deux tests.

Pour l'ELISA Novatec®, l'association à l'HA Fumouze® n'augmente pas la sensibilité ($p = 0,0903$) et diminue la spécificité de façon significative ($p = 0,0274$) Il n'y a donc aucun intérêt d'associer ces deux tests.

Pour le TDR, la sensibilité et la spécificitésontsuffisamment élevées pour envisager de l'utiliser seul. Il présente plusieurs avantages : il ne nécessite pas de formation particulière pour les techniciens, la manipulation est courte et le test est unitaire. Son coût élevé ne permet pas son utilisation en première intention dans un laboratoire où la demande de sérodiagnostic est importante mais il pourrait plutôt permettreaux laboratoires recevant peu de prescription de sérodiagnostic de schistosomose de faire des diagnostics de façon ponctuelle.

En pratique, chaque laboratoire doit trouver le meilleur compromis entre un test adapté à sa routine et une bonne capacité de diagnostic. Dans un laboratoire où la demande de sérodiagnostic est importante et où les tests doivent être réalisés en série, le meilleur algorithme serait de réaliser en premier lieu un dépistage avec un test ELISA Bordier® ou Novatec® seul, ayant les seuils de positivité abaissés, un résultat supérieur au seuil entraînant ensuite une confirmation par un Western-Blot. Ce dernier présente l'inconvénient d'être long à réaliser (plusieurs heures) et la consommation des réactifs oblige à effectuer les tests en série. En cas de nécessité de rendre un résultat dans l'urgence, un test rapide pourra alors être réalisé ponctuellement.

Un laboratoire dans lequel la demande de sérodiagnostic d'une schistosomose est faible (peu de patients revenant de zone d'endémie), le test rapide LDBio® paraît le plus adapté.

Notre étude présente quelques limites. Tout d'abord, le peu de renseignements cliniques sur les patients ne nous permettaient pas de dater les infections. Certains patients pouvaient donc être atteint d'une schistosomose précoce et avoir été prélevés avant leur séroconversion. Si ces patients avaient été prélevés quelques semaines plus tard, les tests auraient peut-être été alors positifs, ce qui peut modifier les résultats de la sensibilité des tests. D'autre part, le choix de nos patients négatifs ne s'est pas fait selon un diagnostic de certitude. Les patients ayant

une sérologie positive pour un autre pathogène revenaient pour certains de zones d'endémie. Il était donc impossible d'exclure avec certitude que ces patients étaient atteints également d'une schistosomose. Cela peut avoir une influence sur les résultats de la spécificité des tests. Enfin, les espèces *S. mansoni* et *S. haematobium* étant les espèces les plus répandues, nous disposions uniquement de patients positifs pour ces espèces. Les autres espèces (*S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi*...) n'ont pas été testées ici.

Certains aspects de l'étude pourraient par la suite être approfondis. D'une part, il serait intéressant d'étudier la cinétique des tests en fonction de la date de l'infection. En sélectionnant des patients avec une schistosomose prouvée, il serait intéressant de savoir si certains tests se positivent avant d'autres, notamment en fonction des antigènes utilisés (œufs ou adultes). Pour certains patients, plusieurs sérums étaient disponibles et ont été testés dans cet objectif. Par ailleurs, la notice du Western-Blot LDBio® explique que l'apparition et la forme des bandes donne une indication sur l'espèce en cause. Les lectures des autres bandes que la P34-30 et la P22-24 ont été effectuées par deux personnes pour tous les Western-Blot effectués. Cette étape a présenté quelques difficultés, les bandes étant parfois de lecture difficile et certaines bandelettes peuvent présenter un décalage par rapport au témoin positif. Il pourrait être intéressant de reprendre les Western-Blot des patients avec une schistosomose prouvée et d'essayer de définir un profil des bandes les plus souvent révélées selon les espèces.

V. Conclusion

La recherche d'anticorps est actuellement la méthode la plus utilisée en routine pour le diagnostic des schistosomoses, en particulier pour les patients ayant une faible charge parasitaire. Les trousse commercialisées permettent de dépister et de confirmer un diagnostic avec de bonnes sensibilités et spécificités, celles-ci pouvant être améliorées en modifiant les seuils de positivité donnés par les fournisseurs. Même si aucun algorithme n'est défini, notre étude a démontré l'intérêt d'associer un test de dépistage (par un ou deux tests) et un test de confirmation. Les différentes trousse se distinguent également par leur coût et le temps de réalisation des manipulations. Chaque laboratoire doit donc trouver le meilleur compromis entre un test adapté à sa routine et une bonne capacité de diagnostic. Cependant, avec l'avancée de la biologie moléculaire, le diagnostic par PCR pourrait bientôt avoir sa place dans le diagnostic de routine. Le coût de cette méthode est encore trop élevé pour l'appliquer au dépistage mais elle pourrait prochainement servir de nouveau test de confirmation.

VI. Références

1. Coon DR. Schistosomiasis: Overview of the history, biology, clinicopathology, and laboratory diagnosis. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2005 Nov 1;27(21):163–8.
2. Ziskind B. [Urinary schistosomiasis in ancient Egypt]. *Nephrol Ther*. 2009 Dec;5(7):658–61.
3. Barakat RMR. Epidemiology of Schistosomiasis in Egypt: Travel through Time: Review. *J Adv Res*. 2013 Sep;4(5):425–32.
4. Ohmae H, Sinuon M, Kirinoki M, Matsumoto J, Chigusa Y, Socheat D, et al. Schistosomiasis mekongi: from discovery to control. *Parasitol Int*. 2004 Jun;53(2):135–42.
5. Webster BL, Southgate VR, Littlewood DTJ. A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *Int J Parasitol*. 2006 Jul;36(8):947–55.
6. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1–241.
7. Bamgbola OF. Urinary schistosomiasis. *Pediatr Nephrol*. 2014 Nov;29(11):2113–20.
8. Fenwick A. Waterborne infectious diseases--could they be consigned to history? *Science*. 2006 Aug 25;313(5790):1077–81.
9. WHO | The global burden of disease: 2004 update [Internet]. WHO. [cited 2016 Aug 22]. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/
10. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*. 2000 Oct 23;77(1):41–51.
11. Weerakoon KGAD, Gobert GN, Cai P, McManus DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Oct;28(4):939–67.
12. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2014 Jun 28;383(9936):2253–64.
13. Fraga de Azevedo J, da Silva JB, Coito AM, Coelho MF, Colaco AT. Portuguese focus of schistosomiasis. *An Inst Med Trop (Lisb)*. 1948;(5):175–222.
14. Doby JM, Rault B, Deblock S, Chabaud A. [Snails and bilharziasis in Corsica. Distribution, frequency and biology of “*Bulinus truncatus*”]. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1966 Aug;41(4):337–49.
15. Berry A, Moné H, Iriart X, Mouahid G, Aboo O, Boissier J, et al. Schistosomiasis haematobium, Corsica, France. *Emerging Infect Dis*. 2014 Sep;20(9):1595–7.
16. Holtfreter MC, Moné H, Müller-Stöver I, Mouahid G, Richter J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill*. 2014;19(22).

17. Moné H, Holtfreter MC, Allienne J-F, Mintsá-Nguéma R, Ibikounlé M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res.* 2015 Nov;114(11):4127–33.
18. Huyse T, Webster BL, Geldof S, Stothard JR, Diaw OT, Polman K, et al. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathog.* 2009 Sep;5(9):e1000571.
19. Shaker Y, Samy N, Ashour E. Hepatobiliary Schistosomiasis. *J Clin Transl Hepatol.* 2014 Sep;2(3):212–6.
20. Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012 Jun;26(2):383–97.
21. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Bilharzioses [Internet]. 2014 [cited 2016 Sep 20]. Available from: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/bilharzioses/site/html/cours.pdf>
22. Capron A, Deblock S, Biguet J, Clay A, Adenis L, Vernes A. Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. *Bull World Health Organ.* 1965;32(6):755–78.
23. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2009 Apr;31(4):163–76.
24. Shebel HM, Elsayes KM, Abou El Atta HM, Elguindy YM, El-Diasty TA. Genitourinary Schistosomiasis: Life Cycle and Radiologic-Pathologic Findings. *RadioGraphics.* 2012 Jul;32(4):1031–46.
25. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of Advanced Research.* 2013 Sep;4(5):433–44.
26. Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2007 Mar;7(3):218–24.
27. Jensen T, Rønne-Rasmussen JO, Bygbjerg IC. [Acute schistosomiasis (Katayama fever)]. *Ugeskr Laeg.* 1995 Aug 28;157(35):4825–7.
28. Logan S, Armstrong M, Moore E, Nebbia G, Jarvis J, Suvari M, et al. Acute schistosomiasis in travelers: 14 years' experience at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Jun;88(6):1032–4.
29. Eloi-Santos SM, Novato-Silva E, Maselli VM, Gazzinelli G, Colley DG, Correa-Oliveira R. Idiotypic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *J Clin Invest.* 1989 Sep;84(3):1028–31.
30. Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2014 Aug;36(8):347–57.
31. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006 Sep 23;368(9541):1106–18.

32. Kjetland EF, Leutscher PDC, Ndhlovu PD. A review of female genital schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 2012 Feb;28(2):58–65.
33. King CH, Keating CE, Muruka JF, Ouma JH, Houser H, Siongok TK, et al. Urinary tract morbidity in schistosomiasis haematobia: associations with age and intensity of infection in an endemic area of Coast Province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Oct;39(4):361–8.
34. Mbabazi PS, Andan O, Fitzgerald DW, Chitsulo L, Engels D, Downs JA. Examining the relationship between urogenital schistosomiasis and HIV infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Dec;5(12):e1396.
35. Guiguen C, Belaz S, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P. Les bilharzioses : aspects épidémiocliniques et diagnostiques. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2013 Dec;2013(457):75–85.
36. Carvalho OAM de. Mansonic neuroschistosomiasis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013 Sep;71(9B):714–6.
37. Ross AG, McManus DP, Farrar J, Hunstman RJ, Gray DJ, Li Y-S. Neuroschistosomiasis. *J Neurol.* 2012 Jan;259(1):22–32.
38. Gönnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z F Parasitenkunde.* 52(2):129–50.
39. Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. In vivo and in vitro experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. *Arzneimittelforschung.* 1981;31(3a):544–54.
40. Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol.* 1987 Jul 1;139(1):215–20.
41. Dömling A, Khoury K. Praziquantel and schistosomiasis. *ChemMedChem.* 2010 Sep 3;5(9):1420–34.
42. Jauréguiberry S, Paris L, Caumes E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Mar;16(3):225–31.
43. Whitty CJ, Mabey DC, Armstrong M, Wright SG, Chiodini PL. Presentation and outcome of 1107 cases of schistosomiasis from Africa diagnosed in a non-endemic country. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 Oct;94(5):531–4.
44. Berry A, Iriart X, Boissier J, Fillaux J. La bilharziose : une parasitose plus uniquement tropicale. *Feuillets de biologie.* 2015 Nov;(327):37–46.
45. Meltzer E, Artom G, Marva E, Assous MV, Rahav G, Schwartz E. Schistosomiasis among travelers: new aspects of an old disease. *Emerging Infect Dis.* 2006 Nov;12(11):1696–700.
46. De Vlas SJ, Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol Today (Regul Ed).* 1992 Aug;8(8):274–7.

47. Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Apr;54(4):319–24.
48. Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol.* 2004 Jan;20(1):35–9.
49. Kinkel H-F, Dittrich S, Bäumer B, Weitzel T. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Jun;19(6):948–53.
50. Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, da Silva LC. Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg.* 1979 Mar;28(2):242–8.
51. Tribouley J, Tribouley-Duret J, Appriou M, Bernard D, Pautrizel R. [Use of massive hemagglutination reaction in serological diagnosis of *Schistosoma mansoni* schistosomiasis]. *Bull World Health Organ.* 1976;54(6):695–702.
52. Smith H, Doenhoff M, Aitken C, Bailey W, Ji M, Dawson E, et al. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(9):e1815.
53. Coulibaly JT, N’Goran EK, Utzinger J, Doenhoff MJ, Dawson EM. A new rapid diagnostic test for detection of anti-*Schistosoma mansoni* and anti-*Schistosoma haematobium* antibodies. *Parasit Vectors.* 2013;6:29.
54. Nausch N, Dawson EM, Midzi N, Mduluzza T, Mutapi F, Doenhoff MJ. Field evaluation of a new antibody-based diagnostic for *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* at the point-of-care in northeast Zimbabwe. *BMC Infect Dis.* 2014;14:165.
55. Cesari IM, Ballen DE, Mendoza L, Ferrer A, Pointier J-P, Kombila M, et al. Immunoblot analysis of membrane antigens of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, and *Schistosoma haematobium* against *Schistosoma*-infected patient sera. *Parasitol Res.* 2010 Apr;106(5):1225–31.
56. Sulahian A, Garin YJF, Izri A, Verret C, Delaunay P, van Gool T, et al. Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of schistosomiasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Apr;12(4):548–51.
57. Deelder AM, De Jonge N, Boerman OC, Fillié YE, Hilberath GW, Rotmans JP, et al. Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Mar;40(3):268–72.
58. Van Lieshout L, Polderman AM, Deelder AM. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop.* 2000 Oct 23;77(1):69–80.
59. Krijger FW, van Lieshout L, Deelder AM. A simple technique to pretreat urine and serum samples for quantitation of schistosome circulating anodic and cathodic antigen. *Acta Trop.* 1994 Feb;56(1):55–63.

60. Cnops L, Tannich E, Polman K, Clerinx J, Van Esbroeck M. Schistosoma real-time PCR as diagnostic tool for international travellers and migrants. *Trop Med Int Health*. 2012 Oct;17(10):1208–16.
61. Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Feb;66(2):157–62.
62. Ibranke OA, Phillips AE, Garba A, Lamine SM, Shiff C. Diagnosis of *Schistosoma haematobium* by detection of specific DNA fragments from filtered urine samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Jun;84(6):998–1001.
63. Clerinx J, Van Gompel A. Schistosomiasis in travellers and migrants. *Travel Med Infect Dis*. 2011 Jan;9(1):6–24.
64. Espirito-Santo MCC, Sanchez MCA, Sanchez AR, Alvarado-Mora MV, Castilho VLP, Gonçalves EMN, et al. Evaluation of the sensitivity of IgG and IgM ELISA in detecting *Schistosoma mansoni* infections in a low endemicity setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Dec;33(12):2275–84.
65. Van Gool T, Vetter H, Vervoort T, Doenhoff MJ, Wetsteyn J, Overbosch D. Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *S. mansoni* egg antigens. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3432–7.

VII. Annexes

Annexe 1 : Notice technique du test d'hémagglutination indirecte Fumouze®



SERODIAGNOSTIC DE LA BILHARZIOSE PAR HEMAGGLUTINATION INDIRECTE

BUT DU TEST :

BILHARZIOSE FUMOUCZE® permet la détermination quantitative, par hémagglutination indirecte, des anticorps sériques de malades atteints de bilharziose à *Schistosoma mansoni* (localisation intestinale), *Schistosoma haematobium* (localisation urinaire) et *Schistosoma intercalatum* (localisation rectale).

PRINCIPE :

BILHARZIOSE FUMOUCZE® est basé sur le principe de l'hémagglutination indirecte. Les hématies sensibilisées sont constituées d'hématies de mouton recouvertes par un antigène *Schistosoma mansoni*.

La présence d'anticorps sériques spécifiques entraîne une agglutination des hématies sensibilisées qui se traduit par un voile rouge / marron tapissant la cupule. En l'absence d'anticorps spécifiques, ces hématies sédimentent au fond de la cupule sous la forme d'un anneau.

Les hématies non sensibilisées assurent la spécificité de la réaction et permettent d'éliminer les interférences dues aux agglutinines naturelles anti-mouton (hétéroanticorps de Forssman, anticorps de la mononucléose infectieuse...).

La réaction s'effectue en microplaque à fond en U.

La manipulation est simple et rapide. Les résultats sont obtenus en 2 heures.

COMPOSITION DU COFFRET :

- Hématies sensibilisées (origine animale)
- Hématies non sensibilisées (origine animale)
- Tampon phosphate pH 7,2
- Adsorbant (origine animale)
- Contrôle positif titré (origine animale)
- Contrôle négatif (origine animale)
- 2 microplaques à fond en U
- 2 compte-gouttes spéciaux
- Notice d'utilisation

Remarques : - Utiliser exclusivement les compte-gouttes fournis dans le coffret.

- Ne pas inter-changer les compte-gouttes entre les hématies sensibilisées et les hématies non sensibilisées.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI :

- Micropipette multicanaux distribuant 50 µL
- Micropipette distribuant 50 µL, micropipette 100-1000 µL
- Conteneur pour déchets contaminés
- Tubes à hémolyse
- Centrifugeuse

STOCKAGE DES REACTIFS :

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

Ils doivent être stockés à +2°...+8°C, jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. Ne pas congeler.

RECUEIL / PREPARATION / CONSERVATION DES ECHANTILLONS :

Utiliser du sérum fraîchement prélevé.

Les échantillons sériques peuvent être conservés 24 heures à +2°...+8°C. Si le test n'est pas effectué dans les 24 heures qui suivent le prélèvement, ils doivent être congelés à -20°C. Il est recommandé de préparer des aliquots pour éviter les congélations et décongélations successives.

Ne pas décomplémenter le sérum.

Ne pas utiliser de sérum hémolysé, trouble ou contaminé.

PRECAUTIONS D'UTILISATION :

- Pour usage in vitro.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ne pas utiliser de réactifs ni de contrôles provenant de lots différents.
- Respecter les instructions de la notice d'utilisation.
- Laisser les réactifs et les échantillons revenir à température ambiante avant d'effectuer le test.

- Agiter soigneusement les suspensions d'hématies avant utilisation.
- Lors de la distribution des suspensions d'hématies, veiller à ce que le compte-gouttes soit parfaitement vertical. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les gouttes, afin que les volumes délivrés soient constants.
- En cas de versement accidentel de réactif, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de versement de sérum, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.
- Éviter tout contact de réactif avec la peau, les yeux et les muqueuses. Ne pas ingérer.
- Les sérums, les réactifs ainsi que le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés dans un conteneur pour déchets contaminés, selon les recommandations et la réglementation en vigueur.
- Tous les réactifs, sauf le tampon phosphate, contiennent du matériel d'origine animale. Par conséquent, ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec précaution.

MODE OPERATOIRE :

Laisser les réactifs et les sérums à analyser revenir à température ambiante avant utilisation.

1. Préparation d'une dilution mère du sérum à analyser (1/40)

Distribuer dans un tube à hémolyse et mélanger :

- 50 µL de sérum à analyser ;
- 1,95 mL de tampon phosphate.

2. Réalisation du test sur microplaque

a. A l'aide d'une micropipette multicanaux, distribuer 50 µL de tampon phosphate dans 8 cupules de la microplaque.

b. Distribuer 50 µL de la dilution mère du sérum dans la 1^{ère} cupule.

Mélanger avec le tampon et reporter, de préférence à l'aide d'un micro-diluteur ("tulipe"), 50 µL de la 1^{ère} cupule dans la 2^{ème}, de la 2^{ème} dans la 3^{ème}, et ainsi de suite jusqu'à la 6^{ème} cupule, en rejetant 50 µL de la 6^{ème} cupule.

On obtient les dilutions suivantes :

N° cupule	1 ^{ère} cupule	2 ^{ème} cupule	3 ^{ème} cupule	4 ^{ème} cupule	5 ^{ème} cupule	6 ^{ème} cupule
Dilution	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560

c. Distribuer 50 µL de la dilution mère du sérum dans la 7^{ème} cupule.

Mélanger avec le tampon et rejeter 50 µL.

Cette dilution (1/80) constitue le témoin sérum, dont le rôle est de détecter les agglutinines naturelles anti-mouton que peuvent contenir certains sérums.

d. Agiter soigneusement les suspensions d'hématies.

- Déposer 1 goutte d'hématies sensibilisées dans les 6 premières cupules.
- Déposer 1 goutte d'hématies non sensibilisées dans la 7^{ème} cupule (témoin sérum).
- Déposer 1 goutte d'hématies sensibilisées dans la 8^{ème} cupule (témoin réactif) dont le rôle est de contrôler la validité du tampon et des hématies sensibilisées.

Remarque : Ne réaliser qu'un seul témoin réactif par série de tests.

e. Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules :

- soit manuellement, par tapotements latéraux sur les côtés de la microplaque, posée à plat ;
- soit à l'aide d'un agitateur vibreur pour plaques à microtitration (par exemple 1300 tours / minute pendant 10 secondes). Ne pas utiliser d'agitateur orbital.

Laisser ensuite la plaque immobile, à l'abri de toute vibration.

f. Lire la réaction 2 heures plus tard.

ADSORPTION DES AGGLUTININES NATURELLES ANTI-MOUTON EN CAS D'AGGLUTINATION DU TEMOIN SERUM :

a. Distribuer dans un tube et mélanger :

- 0,1 mL de sérum ;
- 0,3 mL d'adsorbant.

b. Laisser incuber 60 min à température ambiante.

c. Centrifuger à 2000 trs/min pendant 15 min.

d. Recueillir le surnageant ; le sérum est alors dilué au 1/4.

e. Diluer le surnageant au 1/10 dans du tampon phosphate pour obtenir une dilution mère (1/40) adsorbée.

f. Reprendre le protocole de "Réalisation du test sur microplaque" en remplaçant la dilution mère par la dilution mère adsorbée.

CONTROLE DE QUALITE INTERNE :

Chaque coffret BILHARZIOSE FUMOUCZE® contient 1 contrôle positif de titre connu et 1 contrôle négatif. Ils

sont prêts à l'emploi et doivent être traités comme les sérums à analyser. Ils permettent de valider le test. Le titre du contrôle positif doit être égal au titre annoncé sur l'étiquette du flacon à \pm une dilution. Le contrôle négatif doit présenter une absence d'hémagglutination. Si tel n'est pas le cas, le test n'est pas valide.

LECTURE DES RESULTATS :

ABSENCE D'HEMAGGLUTINATION Présence d'un anneau plus ou moins large au fond de la cupule.	REACTION NEGATIVE
PRESENCE D'HEMAGGLUTINATION Présence d'un voile rouge / marron tapissant la cupule ; parfois, présence d'un fin liseré périphérique.	REACTION POSITIVE

Une image réactionnelle d'hémagglutination, obtenue avec un sérum positif, est représentée ci-dessous :

Exemple :



Le titre est donné par la première dilution présentant un anneau large et périphérique.

Remarques :

- En cas de réaction positive dans les 6 premières cupules, poursuivre les dilutions pour rechercher le titre d'hémagglutination limite.
- Le témoin sérum doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, il est nécessaire de renouveler le test après avoir éliminé les agglutinines naturelles anti-mouton du sérum par adsorption.
- Le témoin réactif doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, le réactif BILHARZIOSE FUMOUCHE® n'est pas utilisable.
- Certains sérums, dont la concentration en anticorps est très élevée, peuvent donner lieu à un phénomène de zone (avec rétraction du voile) dans les premières dilutions, qui disparaît dans les dilutions suivantes.
- La qualité des réactifs permet d'exécuter la réaction le soir et d'effectuer la lecture le lendemain matin, à condition que la microplaque ne subisse aucun déplacement et soit à l'abri des vibrations.

INTERPRETATION DES RESULTATS :

TITRE < 1/160	Réaction non significative d'une infection évolutive. Peut correspondre à une infection ancienne ou traitée. Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoélectrophorèse.
TITRE ≥ 1/160	Réaction significative. Présomption d'infection évolutive.

PERFORMANCES :

Le réactif BILHARZIOSE FUMOUCHE® est constitué d'hématies sensibilisées par un antigène *Schistosoma mansoni* hautement purifié, qui assure sensibilité et spécificité à cette réaction d'hémagglutination indirecte. Ainsi, les résultats des évaluations du test montrent une sensibilité de 84,4 % et une spécificité de 96,9 %. Dans tous les cas, il est nécessaire d'intégrer l'ensemble des données cliniques, épidémiologiques et biologiques avant d'établir le diagnostic final.

BILHARZIOSE FUMOUCHE® précédemment enregistré à l'A.D.M. / *previously A.D.M. registered (1984).*

Fabriqué par / *Manufactured by :*

SERFIB
2, rue de la Bourse
75002 PARIS / FRANCE



Distribué par / *Distributed by :*

Fumouze Diagnostics
Le Malesherbes - 110-114, rue Victor Hugo
92300 LEVALLOIS-PERRET / FRANCE

Nom. : 1300132 – 09/04

SCHISTOSOMA MANSONI

Test immunoenzymatique pour le diagnostic de la bilharziose humaine

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage in vitro

Notice technique pour l'article N° 9600, N°CE: H-CH/CA01/IVD/17983



Utilisations prévues du produit:

Diagnostic sérologique de la bilharziose chez les patients ayant séjournés dans des zones d'endémies avec des bains en eau douce, surtout durant la phase invasive lorsque le diagnostic parasitologique de la maladie est difficile. Enquête chez les compagnons de voyage de sujets atteints de bilharziose et études épidémiologiques dans les zones d'endémies. Contrôle post thérapeutique.

Principe du test et présentation:

La trousse contient le matériel nécessaire pour effectuer 96 tests immuno-enzymatiques (tests ELISA) sur des barrettes sécables sensibilisées avec des antigènes solubles de *Schistosoma mansoni*. La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis des antigènes parasitaires est détectée avec une protéine-A conjuguée à la phosphatase alcaline. Les barrettes sécables en puits individuels permettent de tester économiquement de petites séries d'échantillons.

Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

9600-01	Barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles de <i>Schistosoma mansoni</i>	96	puits
9600-02	TBS-Tween (concentré 10 x)	50	ml
9600-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
9600-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
9600-05	Solution d'arrêt (K ₃ PO ₄)	25	ml
9600-06	Sérum de contrôle négatif	200	µl
9600-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil)	200	µl
9600-08	Sérum de contrôle positif	200	µl
9600-09	Protéine-A conjuguée à la phosphatase	300	µl
9600-10	Substrat de la phosphatase	20	tablettes
9600-11	Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
9600-12	Cadre pour les supports de puits	1	cadre
9600-13	Notices techniques		

Conservation: Conserver la trousse entre 2° et 8°C. La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte.

Équipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (μl et ml). Récipients. Tubes pour la dilution des sérums. Bande adhésive pour couvrir les puits pendant les incubations. Eau distillée. Incubateur à 37°C. Lecteur ELISA ajusté à une longueur d'onde de 405 nm.

Préparation des réactifs avant l'usage:

Barrettes sensibilisées: ouvrir le côté du sachet d'aluminium 9600-01 et retirer le nombre de puits nécessaires. Placer les puits dans un support. Si nécessaire, compléter les positions inutilisées du support avec des puits usagés. Placer le support dans un cadre en respectant son orientation. Conserver les barrettes inutilisées scellées dans le sachet avec le dessicatif.

TBS-Tween (TBS-Tw): diluer le TBS-Tw concentré 10 x 9600-02, 1/10 dans de l'eau distillée.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10 x 9600-03, 1/10 dans de l'eau distillée. Si vous désirez utiliser votre propre solution de lavage, évitez les tampons contenant du phosphate qui pourrait inhiber par la suite l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

Sérums de contrôles négatif, faiblement positif (seuil) et positif: diluer 10 μl de chaque sérum de contrôle 9600-06 à -08 dans 190 μl de la solution TBS-Tw (dilution finale: 1/20).

Sérums à tester: diluer 10 μl de sérum dans 2.0 ml de la solution TBS-Tw (dilution finale: 1/201).

Conjugué protéine-A phosphatase alcaline: diluer le conjugué 9600-09, 1/51 dans le TBS-Tw.

Solution de substrat: équilibrer le tampon de l'enzyme 9600-04 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9600-10 dans le tampon de l'enzyme 9600-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Bien mélanger après la dissolution de la tablette.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 9600-05 non dilué.

Précautions d'emploi: Les solutions 9600-02, 9600-03, 9600-04 et 9600-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.05%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium (N_3N_3). La solution 9600-2 contient 0.02% de merthiolate. Ces substances sont toxiques. La solution d'arrêt 9600-5 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (9600-06 à -08) proviennent de lapins.

Volumes à préparer:

			Nombre de puits à utiliser			
			3-4	5-6	7-8	9-10
TBS-Tween (10 x)	9600-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavage (10 x)	9600-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugué	9600-09 + TBS-Tw	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sérums de contrôles	9600-06 à -08 + TBS-Tw	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sérums à tester	Serum + TBS-Tw	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solution de substrat	9600-10 + 9600-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Méthode:

Etape 1: Blocage:

Remplir complètement les puits avec la solution TBS-Tw.
Incuber 5 à 15 minutes à température ambiante (blocage des puits).
Éliminer le TBS-Tw par aspiration ou en secouant les barrettes en dessus d'un évier.

Etape 2: Incubation avec les échantillons de sérum:

Remplir le premier puits de la première barrette avec 100 µl de TBS-Tw (blanc en absence de sérum).
Remplir les trois puits suivants avec 100 µl des sérums contrôles dilués (sérum négatif, faiblement positif (seuil) et positif).
Remplir les autres puits avec les sérums à tester dilués (100 µl).
Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37°C.
Éliminer les sérums et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 3: Incubation avec le conjugué:

Distribuer 100 µl du conjugué protéine-A phosphatase dilué dans chaque puits.
Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37°C.
Éliminer le conjugué et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 4: Incubation avec le substrat:

Distribuer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits.
Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber à 37°C. pendant 30 minutes.
Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.

Etape 5: Mesure de la densité optique:

Essuyer le dessous des puits, éliminer les bulles éventuelles et mesurer la densité optique (Absorbance) à une longueur d'onde de 405 nm.

FRANÇAIS



1. INTRODUCTION

Les schistosomes appartiennent à la classe des distomes (trématodes). Ils comptent parmi les agents pathogènes les plus fréquents. Les estimations donnent plus de 200 millions de personnes affectées. Le parasite mature mesure entre 6 et 22 mm de long. Les plus importantes espèces sont *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* et *S. haematobium*. *Schistosoma mansoni* est courant en Afrique, en Amérique du Sud et au Moyen Orient.

La Schistosomiase (bilharziose) est –selon les espèces et la localisation du parasite- une maladie des tractus intestinaux, foie et rate respectivement, et urinaires. L'homme est (re)infecté au contact de l'eau douce contaminée par de l'urine et des selles contenant des furcocercaires. Si les larves creusent la peau humaine, apparaît d'abord une réaction dermique transitoire (démangeaisons possibles avec exanthème ou érythème, par infection cercariale répétée). Après 3 à 10 semaines, les vers sexuellement matures synthétisent des substances cytotoxiques et allergéniques qui provoquent des réactions fébriles chez l'homme (fièvre Katayama). L'infestation se fait principalement par les œufs qui pénètrent dans les organes via la circulation sanguine, en excréant des protéines et des glycoprotéines. La personne réagit avec ses propres anticorps et complexes immuns avec formation d'un granulome et prolifération granulomateuse dans les muqueuses intestinale et vésicale. Les œufs non excrétés meurent après 3 semaines et ils sont dissous ou calcifiés. Les tissus affectés deviennent fibreux. En phase finale, la bilharziose peut être létale.

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse *Schistosoma mansoni* IgG ELISA de NovaTec est prévue pour la détermination qualitative des anticorps IgG anti-*Schistosoma mansoni* dans le sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgG anti-*Schistosoma mansoni* est basée sur la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes de *Schistosoma mansoni* pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, le conjugué Protéine A marquée à la peroxydase du raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux complexes antigènes-anticorps. Le complexe immunitaire est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifiques de *Schistosoma mansoni* dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- Puits revêtus de *Schistosoma mansoni* (IgG) : 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène de *Schistosoma mansoni*; en sachets d'aluminium refermables.
 - Diluant pour échantillon IgG *** : 1 flacon contenant 100 ml de tampon pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon blanc.
 - Solution d'arrêt : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à l'emploi ; couvercle rouge.
 - Solution de lavage (concentrée x 20.) * : 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon concentré 20 fois (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; bouchon blanc.
 - Conjugué Protéine A ** : 1 flacon contenant 20 ml de Protéine A conjuguées à de la peroxydase du raifort ; prêt à l'emploi ; couleur bleue, bouchon noir.
 - Solution de substrat TMB : 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi ; bouchon jaune.
 - Contrôle positif IgG *Schistosoma mansoni**** : 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon rouge.
 - Contrôle seuil (cut-off) IgG *Schistosoma mansoni**** : 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon vert.
 - Contrôle négatif IgG *Schistosoma mansoni**** : 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon bleu.
- * contient 0,1 % de Bronidox L après dilution
** contient 0,2 % de Bronidox L
*** contient 0,1 % de Kathon

4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériel et équipement requis

- lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur à 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (récemment) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'ils sont conservés entre 2 et 8°C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (20 - 25°C) avant de commencer le dosage !

6.1. Barrettes revêtues sécables

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de *Schistosoma mansoni* et sont prêtes à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à +2...+8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.

6.2. Conjugué Protéine A

Le flacon contient 20 ml d'une solution de Protéine A, peroxydase du raifort, un tampon, des stabilisants, des conservateurs et un colorant bleue inerte. La solution est prête à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.

6.3. Contrôles

Les flacons de contrôle positif, contrôle seuil (cut-off) et de contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prête à l'emploi. Elle contient 0,1% de Kathon et doit être conservée à +2...+8°C. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.

6.4. Diluant pour échantillon IgG

Le flacon contient 100 ml d'un tampon phosphaté, des stabilisants, des conservateurs et un colorant jaune inerte. Il est utilisé pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prête à l'emploi doit être conservée à +2...+8°C. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.

6.5. Solution de lavage (conc. x 20)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. Le tampon dilué est stable 5 jours si conservé à température ambiante. Le tampon concentrée est stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.

6.6. Solution de substrat TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2...+8°C, à l'abri de la lumière. La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.

6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0,2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à +2...+8°C. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2-8°C.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à +2...+8°C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués au 1/101^{ème} avec le diluant pour échantillon IgG. Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml du diluant pour échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution au 1/101^{ème} et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCÉDE DE DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi avant de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

Il est conseillé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets si nécessaire.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipeter 100 µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape !
Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.
5. Pipeter 100µl du conjugué Protéine A dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.**
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**
10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB.
La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.
Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec du sérum physiologique, par exemple au 1/2. Ensuite diluer l'échantillon au 1/101^{ème} avec le tampon et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.
11. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesure

Faire le zéro du lecteur ELISA à l'aide du blanc substrat dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à 450 nm et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.

Calculer les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaire.

Annexe 4: Lecture interprétative des bandes du Western-blot (notice technique SCHIS-TO II LDBio Diagnostics®)

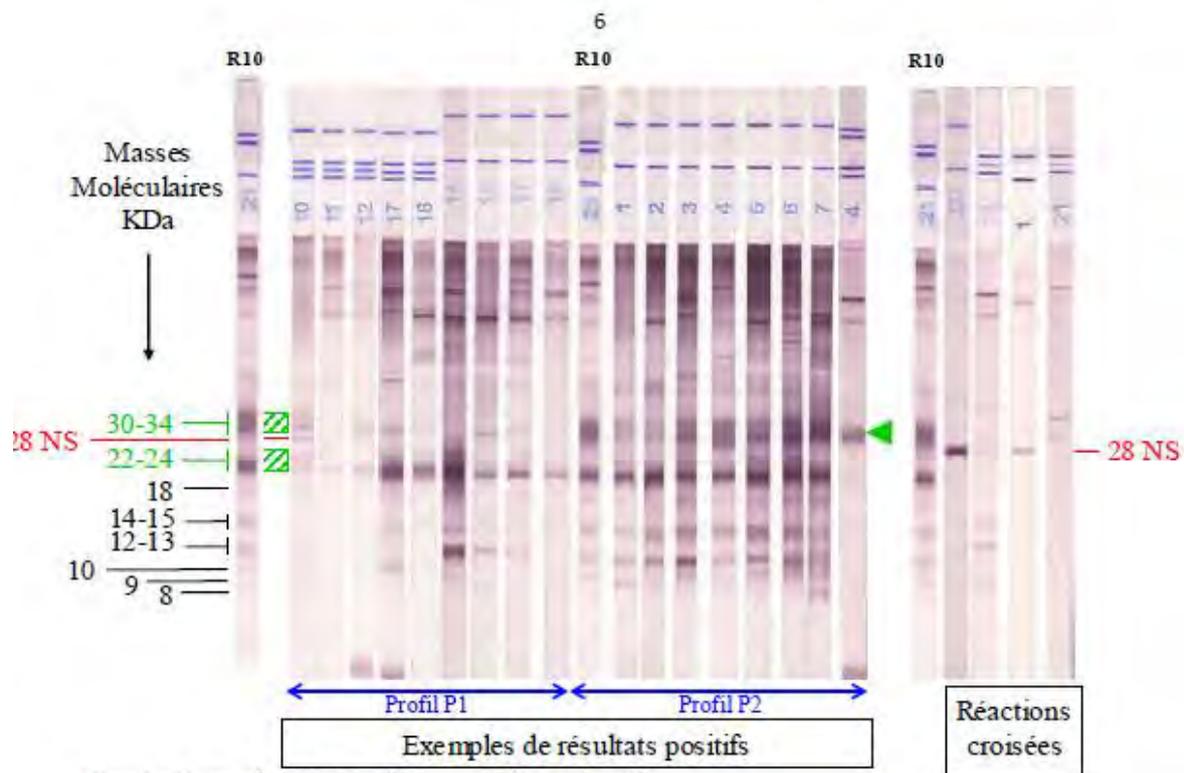


Fig. 1 : Exemples de résultats positifs et négatifs

- **Interprétation :**

La présence de l'une des bandes **P30-34** ou **P22-24** est indicative d'une bilharziose.

- ✓ Si elle est isolée (situation exceptionnelle), la bande P30-34 doit se présenter comme une bande large pour être prise en compte. (ex : bandelette n°4 ◀ ci-dessus).
- ✓ La bande P22-24 peut avoir tous les aspects : fine, large, simple ou double.
- ✓ Les bandes les plus souvent retrouvées sont indiquées sur la bandelette « C+ » à gauche de la figure. De nombreuses autres bandes peuvent être présentes dans la zone 8-22 KDa.
- ✓ Les profils **P1** et **P2** pourraient être indicatifs de l'espèce (voir : bilharziose sérologique p 8).
- ✓ La bande **P28** est fréquente. Elle est **non spécifique** de *Schistosoma*.
- ✓ La bandelette « R10 » de l'exemple ci-dessus correspond au témoin positif fourni dans la trousse.

Remarques importantes :

Les bandes P8 et P10 n'apparaissent pas sur le contrôle R10, elles se situent au dessus et au dessous de la bande P9.

La bande 22-24 est plus large que celle du Contrôle R10 (qui montre surtout la 22 KDa): voir pour exemple les bandelettes 10, 1, 3, 5, 6 de la figure 1. Elle peut parfois ne se présenter que sous la forme d'une bande isolée à 24 KDa, donc en apparence au dessus de la bande très intense 22 KDa du contrôle R10.

Les sérums « réactions croisées » bandelettes 13, 1 et 21 présentés à droite correspondent à des paludismes. Ils ont été spécialement sélectionnés parmi les rares sérums qui ont présenté au cours de l'évaluation des bandes non spécifiques dans la zone de lecture 8-34 kDa.

AUTEUR : Sarah QUANCARD

TITRE: Diagnostic des schistosomoses : évaluation des trousse commercialisées pour le sérodiagnostic

DIRECTEUR DE THESE : Dr Judith FILLAUX

CO-DIRECTEUR DE THESE : Pr Antoine BERRY

Résumé

La schistosomose est une maladie parasitaire qui touche plus de 200 millions de personnes à-travers le monde. Le diagnostic des schistosomoses à faible charge parasitaire ou chez les voyageurs revenant de zone d'endémie repose sur la sérologie. Cependant, aucun algorithme n'est recommandé concernant les techniques à utiliser. Dans cette étude, cinq trousse de sérodiagnostic disponibles en France ont été testées sur des sérums de patients. Nous avons évalué leurs sensibilités et leurs spécificités, ce qui nous a permis de choisir les tests les plus adaptés au dépistage ou à la confirmation de cette maladie. En travaillant sur les performances de ces tests, seuls ou en association, nous avons pu proposer des stratégies analytiques à mettre en place pour le sérodiagnostic de la schistosomose.

Diagnosis of schistosomiasis : evaluation of commercial kits of serodiagnosis

Schistosomiasis is a parasitic disease that affects over than 200 millions people over the world. The diagnosis of schistosomiasis with low parasite load or in travelers returning from endemic areas based on serology. However, no algorithm is recommended for technical use. In this study, five serologic kits available in France were tested sera from patients. We assessed their sensitivities and specificities, which allowed us to choose the most suitable tests for screening or confirmation of this disease. Working on the performance of these tests, alone or in combination, we could propose analytical strategies to implement for serodiagnosis of schistosomiasis.

DISCIPLINE administrative : Biologie médicale

MOTS-CLES : schistosomose, bilharziose, *S. mansoni*, *S. haematobium*, sérodiagnostic, hémagglutination, ELISA, Western-Blot

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE : Université Paul Sabatier –Toulouse III , Faculté des Sciences Pharmaceutiques. 35, chemin des Maraîchers, 31062 TOULOUSE Cedex

9