FIABILITE DE LA REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA TRYPANOSOMIASE HUMAINE AFRICAINE

par

G. DUVALLET (1), P. SALIOU (2) et J.-L. REY (3)

SUMMARY

RELIABILITY OF THE INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE TEST IN THE DIAGNOSIS OF AFRICAN HUMAIN TRYPANOSOMIASIS

The reliability of an immunodiagnosis depends on its efficiency, i.e. the possibility of sorting out infected people from uninfected thanks to a good sensibility and a good specificity, and to its reproductibility.

The authors have studied the reliability of the Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for trypanosomiasis diagnosis on 90 sera (30 sera from patients with proven trypanosomiasis and 60 sera from patients free of trypanosome infection).

Reproductibility is considered as good when the reading has been done by the same reader. Sensibility approches 100 p. 100 and specificity varies according to readers : the reader taking the "brillance" into account obtains a specificity of more than 85 p. 100 and the reader reading the immunofluorescence extinction obtains a specificity between 65 p. 100 and 77 p. 100.

The IFAT may be taken as a reference to evaluate new immunodiagnosis.

La technique d'immunofluorescence indirecte est, depuis quelques années, largement utilisée pour le dépistage de la trypanosomiase humaine africaine et la surveillance des foyers résiduels ou reviviscents.

Nous avons étudié, dans ce travail, la fiabilité de la technique d'immunofluorescence indirecte, telle que nous la pratiquons au laboratoire de la trypanosomiase du Centre Muraz.

D'après LAFAYE et SALIOU (1976), "un immunodiagnostic fiable doit présenter simultanément deux qualités :

— il doit être efficace, c'est-à-dire capable de trier correctement les malades et les bien portants, grâce à la conjonction d'une bonne sensibilité et d'une bonne spécificité ;

— il doit être reproductible, c'est-à-dire conserver les mêmes qualités sans changements systématiques incontrôlables dans le temps et dans l'espace".

Nous présentons, dans ce travail, les résultats obtenus avec des sérums. Nous présenterons, dans un prochain article, les résultats donnés par des prélèvements de sang capillaire recueillis sur papier filtre.

I. - MATERIEL ET METHODE

1) Lames d'antigène

L'antigène utilisé est la souche CM 76 HV DT de *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *brucei gambiense* isolée au Centre Muraz le 18-02-76 à partir du liquide céphalo-rachidien d'un malade.

Cette souche est entretenue sur souris par passage tous les trois ou quatre jours.

Le sang parasité est prélevé sur héparine par ponction intracardiaque des souris. Il sert alors à réaliser des frottis minces sur des lames microscopiques bien dégraissées. Après séchage à l'abri de la poussière, les lames sont regroupées par paquets de 12 dans du papier fin et placées, en présence d'un dessicateur (silicagel ou actigel), dans un sac plastique. Les sacs sont scellés et conservés au congélateur à — 20 °C.

(1) Agrégé de l'Université, chef du laboratoire de la trypanosomiase Centre Muraz - B.P. 153 - Bobo-Dioulasso (Haute-Volta).
(2) Médecin en chef, biologiste des hôpitaux des Armées, chef de la section Biologie du Centre Muraz.
(3) Médecin des Armées, assistant de biologie des hôpitaux des Armées, chef du laboratoire de la tuberculose au Centre Muraz.

2) Solution tampon

Toutes les manipulations sont réalisées avec la solution suivante de pH 7,2 :

NaCl.	6,80 g
Na2HPO4 pur anhydre	1,48 g
KH2PO4 pur cristallisé	0,43 g
Eau distillée q.s.p.	1.000 ml

3) Sérum fluorescent

Le sérum fluorescent antiglobulines humaines utilisé est celui de l'Institut Pasteur.

4) Sérums étudiés

90 sérums ont été étudiés :

— 30 provenaient de trypanosomés confirmés parasitologiquement (notre sérothèque) ;

— 30 avaient été prélevés chez des Touaregs à Tessalit (Mali) en dehors de la zone de répartition des glossines et de tout foyer de trypanosomiase ;

— 30 sérums provenaient de Dori (Haute-Volta) et avaient été prélevés chez des Peulhs sédentarisés, gardiens de troupeaux pour la plupart. Dori est situé en dehors de la zone de répartition des glossines mais des cas de trypanosomiase animale sont connus dans cette région.

Dans chacun de ces sérums, 2 parties aliquotes de 100 µl ont été prélevées pour constituer 2 séries identiques de 90 tubes. Dans chacune des séries, les tubes ont été répartis au hasard et numérotés de 1 à 90. Les deux séries ont été étudiées à une semaine d'intervalle à l'aide de deux lots différents d'antigène.

5) Réalisation du test

Au moment de réaliser le test, les lames d'antigène sont sorties du congélateur. Le sac contenant les lames n'est ouvert qu'après réchauffement à la température ambiante.

Sur les lames, 8 cercles de vernis à ongles sont tracés pour y déposer 50 µl de chacune des dilutions de sérums (dilutions de raison 1/2 de 1/5 à 1/640). Le sérum est laissé 1/2 h au contact de l'antigène en chambre humide.

Après un lavage de 15 mn, les lames sont recouvertes de sérum fluorescent antiglobulines humaines dilué au 1/100e en présence de Bleu d'Evans à la dilution finale 5.10^{-4}. Le contact avec le sérum fluorescent est de 1/2 h en chambre humide et à l'obscurité.

Après un second lavage de 15 mn, les lames peuvent être lues en les recouvrant de glycérine tamponnée et de lamelles.

6) Lecture

La lecture a été effectuée avec un microscope Leitz Dialux équipé pour la fluorescence : lampe aux halogènes (12 V, 100 W) et combinaison de filtres : KP 490 pour l'excitation, K 530 pour l'arrêt. La combinaison optique utilisée est la suivante :

objectif x 20, occulaire x 10.

La lecture a été faite indépendamment par deux lecteurs.

II. - RESULTATS

1) Répartition des sérums en fonction de la dilution

Les tableaux I, pour le premier lecteur, et II, pour le second lecteur, indiquent la répartition des sérums en fonction de la dilution. Pour chacune des séries,

TABLEAU I

Résultats du premier lecteur : 1° : 1re série ; 2° : 2e série ; MGT : Moyenne Géométrique des Titres.

Dilutions sérums		< 1/5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	MGT
NT +	1°	0	0	0	9	16	5	0	0	0	36,5
	2°	0	1	0	13	13	3	0	0	0	29,5
DORI	1°	20	1	2	6	1	0	0	0	0	2,5
	2°	16	5	3	6	0	0	0	0	0	3
TESSALIT	1°	27	0	2	1	0	0	0	0		1,3
	2°	26	3	1	0	0	0	0	0		1,3

TABLEAU II

Résultats du second lecteur : 1° : 1re série ; 2° : 2e série ; MGT : Moyenne Géométrique des Titres.

Dilutions sérums		< 1/5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	MGT
NT +	1°	0	0	0	7	9	10	3	1	0	52,8
	2°	0	1	0	4	13	10	1	0	1	49,2
DORI	1°	2	2	10	12	3	1	0	0	0	13,3
	2°	4	0	12	9	4	1	0	0	0	11,7
TESSALIT	1°	10	9	6	5	0	0	0	0	0	4,2
	2°	15	6	9	0	0	0	0	0	0	2,8

la moyenne géométrique des titres (MGT) a été calculée en utilisant la formule de WAUGH (1952) :

MGT = antilog $\Sigma f(\log x)/N$
ou x = les différents titres d'anticorps
f = le nombre de sérums pour chaque titre
N = le nombre total de sérums.

Nous considérons les sérums dont le titre est inférieur à 5 comme positifs au titre 1 ; nous avons ainsi log 1 = 0.

L'observation de ces tableaux permet de constater :

— une répartition unimodale autour des titres 40 (tableau I) et 80 (tableau II) pour les nouveaux trypanosomés ;

— une répartition unimodale autour du titre 0 pour les sérums de Tessalit (tableaux I et II) avec un petit étalement vers la droite pour le tableau II.

Mais, concernant les sérums de Dori, nous constatons :

— pour le premier lecteur, une double population, autour de 0 et autour de 20 ;

— pour le second lecteur, le premier mode autour de 0 est discret alors qu'il y a un mode important entre 10 et 20.

2) Reproductibilité

Pour étudier cette reproductibilité, nous avons comparé entre eux les résultats des deux séries pour chacun des lecteurs. Ce travail a été effectué séparément pour les sérums de malades et pour les sérums des sujets non malades. Les calculs ont été faits en utilisant les titres des sérums (inverse des dilutions) et en considérant comme égal à 0 le titre des sérums négatifs au titre 5.

Le test statistique utilisé consiste à étudier la moyenne des différences entre les deux séries comparées. Si ces deux séries ne sont pas statistiquement différentes, la moyenne des différences ne doit pas différer statistiquement de zéro. La comparaison à zéro de cette moyenne s'effectue en calculant l'écart-réduit $\varepsilon = \frac{m}{\sqrt{\sigma^2/\eta}}$, où η est l'effectif et σ^2 la variance de la distribution des différences.

Si $\varepsilon > 1{,}96$, la différence n'est pas significative au risque 5 p. 100.

Si $\varepsilon \geqslant 1{,}96$, la différence est significative au risque 5 p. 100.

a) Comparaison entre séries :

Les paramètres des distributions des différences entre séries sont les suivants :

Premier lecteur :

— malades :
$m = 6{,}5 \quad \sigma^2 = 405{,}25 \quad \varepsilon = 1{,}77$

— non malades :
$m = 0{,}42 \quad \sigma^2 = 75{,}23 \quad \varepsilon = 0{,}38$

Second lecteur :

— malades :
$m = 6{,}17 \quad \sigma^2 = 6156{,}10 \quad \varepsilon = 0{,}43$

— non malades :
$m = 1{,}58 \quad \sigma^2 = 224{,}59 \quad \varepsilon = 0{,}82$

b) Comparaison entre lecteurs :

Première série :

— malades :
$m = 29{,}33 \quad \sigma^2 = 2659{,}75 \quad \varepsilon = 3{,}12$

— non malades :
$m = 9 \quad \sigma^2 = 138{,}17 \quad \varepsilon = 5{,}93$

Seconde série :

— malades :
$m = 42 \quad \sigma^2 = 11262{,}67 \quad \varepsilon = 2{,}16$

— non malades :
$m = 7{,}67 \quad \sigma^2 = 109{,}50 \quad \varepsilon = 5{,}68$

D'une manière générale, nous constatons, d'après les résultats précédents que, pour un même lecteur, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les deux séries de lectures, alors qu'entre les lecteurs, la différence est significative.

3) Sensibilité, spécificité

En suivant les indications de LAFAYE et SALIOU (1976), nous avons regroupé les résultats dans des tableaux de contingence 2X2, en considérant les sérums de Dori et de Tessalit comme "non malades" (Tableaux III et IV). Les calculs ont été effectués en prenant successivement les dilutions 1/10, 1/20 et 1/40 comme seuil de positivité.

Les meilleurs résultats ont été obtenus, pour les deux lecteurs, avec la dilution 1/20. Nous gardons, pour la suite, cette dilution comme meilleur seuil de positivité.

TABLEAU III

Tableau de contingence 2 x 2 pour le premier lecteur.

	Imm +	imm —	total
Malades	30*(29)**	0 (1)	30
Non malades	8 (6)	52 (54)	60
Total	38 (35)	52 (55)	90

* Résultats 1re série,
** Résultats 2e série.

TABLEAU IV

Tableau de contingence 2 x 2 pour le second lecteur.

	Imm +	imm —	total
Malades	30*(29)**	0 (1)	30
Non malades	21 (14)	39 (46)	60
Total	51 (43)	39 (47)	90

* Résultats 1re série,
** Résultats 2e série.

A l'aide de ces tableaux, nous pouvons calculer :

— le rapport α des faux positifs, d'où $1 - \alpha$ la spécificité ;

— le rapport β des faux négatifs, d'où $1 - \beta$ la sensibilité ;

— le paramètre d'association J de Youden et son dérivé le taux d'accord standardisé de Lafaye A :

$$J = 1 - (\alpha + \beta) \qquad A = 100 \left(\frac{\alpha + \beta}{2}\right)$$

Les résultats de ces calculs sont reportés dans le tableau V.

III. - DISCUSSION

L'étude précédente montre que la sensibilité de la réaction d'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic de la trypanosomiase africaine, telle que nous la pratiquons dans notre laboratoire, est très bonne en choisissant comme seuil de positivité le titre 20. Au cours de cette évaluation, nous n'avons eu qu'un seul résultat faussement négatif : le sérum n° 76-47, négatif dans la deuxième série pour les deux lecteurs, alors qu'il était normalement positif dans la première série. Il s'agit là vraisemblablement d'une erreur de manipulation lors des dilutions.

Ce résultat, concernant la sensibilité, est tout à fait favorable à l'utilisation de la technique d'immunofluorescence pour le dépistage ("screening" de masse).

La spécificité est moins bonne en conservant le seuil de positivité au titre 20, mais satisfaisante en immunologie parasitaire. Elle pourrait être améliorée en augmentant le seuil selon les circonstances : avant traitement ou dans une région comme Dori. La spécificité varie d'un lecteur à l'autre mais est surtout le témoin des variations dues aux sérums de Dori. Ces

TABLEAU V

Paramètres d'association.

	α	β	$1-\alpha$	$1-\beta$	J	A	Var J	Var A
1er lecteur 1re série	0,13	0	0,87	1	0,87 ± 0,09	94 ± 4	0,0021	0,0005
1er lecteur 2e série	0,10	0,03	0,90	0,97	0,87 ± 0,10	94 ± 5	0,0026	0,0006
2e lecteur 1re série	0,35	0	0,65	1	0,65 ± 0,12	82 ± 6	0,0038	0,0009
2e lecteur 2e série	0,23	0,03	0,77	0,97	0,74 ± 0,13	87 ± 6	0,0040	0,0010

sérums posent donc un problème : à quelle stimulation antigénique est due cette présence relative d'anticorps ? Transmission mécanique de trypanosomes à partir du bétail ou autre réaction croisée ? Une étude particulière de ces sérums doit être entreprise.

La reproductibilité des lectures apparaît bonne, à condition que celles-ci soient toujours effectuées par le même lecteur.

La manière de lire est donc très importante. Le premier lecteur avait l'habitude de lire la brillance de la réaction et ne retenait comme positives que les plages présentant une fluorescence "brillante". Les plages présentant une fluorescence "pâle" étaient considérées comme négatives. Le second lecteur, habitué à lire des lames de paludisme, avait tendance à lire les lames à l'extinction, ce qui explique qu'il obtienne des titres en général plus élevés. La comparaison des tableaux III et IV montre que, tout en gardant le même seuil de positivité (1/20), le second lecteur recrute plus de faux positifs que le premier. La manière de lire du premier lecteur nous apparaît plus adaptée au but fixé.

Pour mieux apprécier cette reproductibilité, il faudrait étudier plus précisément les différents facteurs de variation possible : manipulateur, antigène, sérum antiglobuline et répéter dans le temps les réactions pour observer une éventuelle déviation permanente lente.

La reproductibilité non satisfaisante entre deux lecteurs différents pose le problème de la standardisation.

Les lames d'antigène utilisées ne sont pas toutes identiques. Il s'agit bien de la même souche, mais la variabilité antigénique intervient et il n'est pas sûr que nous ayons, d'un lot à l'autre, le même variant antigénique. L'utilisation d'un antigène standardisé (trypanosomes lyophilisés) et surtout d'un sérum étalon dont le titre serait exprimé en unités internationales améliorerait la reproductibilité de la méthode.

IV. - CONCLUSION

L'efficacité de la réaction d'immunofluorescence indirecte nous a incités à l'utiliser largement pour les enquêtes dans les foyers actifs et pour la surveillance des foyers résiduels.

Cependant, la nécessité de réaliser cette réaction au laboratoire et de rechercher ensuite les suspects immunologiques dans les villages est une contrainte limitant son rendement.

C'est pourquoi la mise au point et l'évaluation de techniques plus faciles d'utilisation, pouvant donner un résultat immédiat sur le terrain, s'avèrent nécessaires.

Cette évaluation pourra être effectuée en conservant la réaction d'immunofluorescence indirecte comme réaction de référence.

RÉSUMÉ

La fiabilité d'un immunodiagnostic dépend de son efficacité, c'est-à-dire la possibilité de trier les malades des bien portants grâce à une bonne sensibilité et une bonne spécificité ; elle dépend aussi de sa reproductibilité.

Les auteurs étudient à l'aide de 90 sérums (30 malades confirmés et 60 non malades) la fiabilité du test d'immunofluorescence indirecte pour le dépistage de la trypanosomiase humaine.

La reproductibilité est bonne lorsque la lecture est toujours effectuée par le même lecteur. La sensiblité est proche de 100 p. 100 et la spécificité variable suivant les lecteurs. Le lecteur lisant la brillance de la fluorescence obtient une spécificité supérieure à 85 p. 100, le lecteur lisant l'extinction de la fluorescence obtient une spécificité comprise entre 65 p. 100 et 77 p. 100.

Le test d'immunofluorescence indirecte peut servir de référence pour l'évaluation de nouveaux immunodiagnostics.

REMERCIEMENTS :

Nous exprimons nos plus vifs remerciements au Docteur LOZACH'HMEUR pour ses conseils dans l'analyse statistique de nos résultats ainsi qu'au personnel de la section Biologie du Centre Muraz sans lequel ce travail n'aurait pu être réalisé.

Travail réalisé au Centre Muraz

Directeur : J.-P. MOREAU.

BIBLIOGRAPHIE

1 — BINZ G. — An evaluation of the capillary and latex agglutination and heterophile antibody test for the detection of *T. rhodesiense* infections — *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1972, *47*, 773-778.

2 — DUVALLET G. et SALIOU P. — L'infirmier et le dépistage de la trypanosomiase — *Revue de l'infirmier d'Afrique Noire*, 1976, *49*, 13-19.

3 — DUVALLET G. et SALIOU P. — Utilisation sur le terrain de la technique d'immunofluorescence indirecte pour le dépistage de la trypanosomiase humaine — Soumis à *Méd. Trop.*, 1977, pour publication.

4 — FREZIL J.-L., CARRIE J. et RIO F. — Application et valeur de la technique d'immunofluorescence indirecte au dépistage et à la surveillance de la trypanosomiase à *T. gambiense* — *Cah. ORSTOM Ent. Méd. Parasit.*, 1974, *12*, 111-126.

5 — LAFAYE A. — Association entre deux variables dichotomiques, valeur diagnostic d'une réaction immunologique — *Doc. miméo.*, 1976, n° *6234*/Doc. Techn. O.C.C.G.E.

6 — LAFAYE A. et SALIOU P. — Nécessité de l'évaluation statistique du diagnostic immunologique et intérêt de l'analyse discriminante dans le dépistage de la maladie du sommeil — Coll. Intern. sur la trypanosomiase humaine africaine, Anvers (10-12 décembre 1976).

7 — NOZAIS J.-P., GIORDANO C., DOUCET J. et BERTRAND E. — L'immunofluorescence indirecte dans le diagnostic de la trypanosomiase à *T. gambiense* — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1975, *68*, 390-398.

8 — WAUGH A.E. — Element of statistical method — Mc Graw - Hill Ed., New York (3rd edition), 1952.

9 — WERY M., WERY-PASKOFF et VAN WETTERE P. — The diagnosis of humain African trypanosomiasis (*T gambiense*) by the use of fluorescent antibody test I. Standardisation of an easy technique to be used in mass survey — *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 1970, *50*, 5, 613-634.