

# Application du test E.L.I.S.A. au diagnostic de la strongyloïdose

par J. TRIBOULEY-DURET, J. TRIBOULEY, M. APPRIOU et R.-N. MEGRAUD

*Laboratoire d'Immunologie et de Biologie parasitaire,  
Université Bordeaux II, F 33000 Bordeaux.*

## *Résumé.*

Un test immunoenzymatique (test E.L.I.S.A.) est appliqué au diagnostic de la strongyloïdose humaine. Les premiers résultats obtenus montrent que cette réaction peut compléter les moyens d'investigation déjà utilisés pour le diagnostic de cette affection : analyse coprologique, tests intradermiques, tant pour les études épidémiologiques que pour le diagnostic individuel ; elle peut permettre en outre de s'assurer de l'efficacité de la thérapeutique instituée.

## *Summary.*

### **Diagnosis of strongyloidiasis using the E.L.I.S.A. test.**

An immunoenzymatic test, the E.L.I.S.A. test is used to diagnose human Strongyloidiasis. First results show that this reaction can complete other investigational methods already in use to diagnose this affection, i.e. coproanalysis and intradermal reactions, both in epidemiological studies and individual cases. In addition, the test is a good means of assessing the effectiveness of treatment.

---

Accepté le 10 mai 1978.

En raison des difficultés présentées par le diagnostic de la strongyloïdose et en particulier par la recherche des larves parfois négative chez les sujets infestés, des méthodes de diagnostic indirect ont été envisagées mais se sont avérées généralement d'une faible sensibilité en dehors des tests d'allergie cutanée d'abord proposés par Chaña (3) et que nous avons nous-mêmes régulièrement pratiqués chez nos malades depuis une dizaine d'années (6). Cette dernière méthode exigeant la présence du malade au laboratoire, nous nous sommes efforcés par ailleurs de mettre au point une méthode simple de sérodiagnostic. En 1974, Ruitenber et coll. (5) proposaient d'appliquer au diagnostic de la trichinose le test E.L.I.S.A., test immunoenzymatique réputé pour sa sensibilité. Par la suite, cette technique était utilisée avec succès pour le diagnostic de différentes parasitoses (1, 2, 7, 8). Il nous a donc semblé intéressant d'envisager son application au diagnostic sérologique de la strongyloïdose.

## Matériel et technique

### L'antigène.

L'antigène est un extrait délipidé de larves de *Strongyloides ratti* analogue à celui que nous avons utilisé dans les tests d'allergie cutanée pratiqués pour le diagnostic de la strongyloïdose [6]. Après broyage des larves et délipidation par l'alcool-éther du produit de broyage, l'antigène est extrait pendant 24 heures en eau distillée tamponnée à pH 7,2. Après centrifugation, le liquide d'extraction est lyophilisé et conservé en ampoules scellées sous vide à la température de 4 °C. Il est réhydraté au moment de l'emploi en tampon carbonate-bicarbonate à pH 9,6 (\*). La teneur en azote est déterminée par la méthode de Nessler [4].

Après titrage de cet antigène vis-à-vis du sérum d'un sujet porteur de larves de *St. stercoralis* et du sérum d'un sujet indemne de cette affection (tableau I), la concentration considérée comme la plus sensible et la plus spécifique est celle de 10 µg d'azote par ml, ce qui correspond à une dilution au 1/400<sup>e</sup> de l'antigène.

63 sérums de sujets porteurs de larves de *St. stercoralis*, 91 sérums de sujets présumés indemnes de cette affection, 31 sérums de sujets porteurs de Nématodes divers : ankylostomes, ascaris, oxyures, filaires, ont été testés tant pour apprécier la sensibilité que la spécificité de cette réaction.

Les sérums de quelques sujets précédemment porteurs de larves de *St. stercoralis* et traités par le Mintezol ont été également testés afin de suivre l'évolution des anticorps après traitement.

Tous ces sérums ont été dilués en tampon P.B.S.-tween (\*\*), pH 7,2 et testés de 1/2 en 1/2 à partir d'une dilution initiale au 1/10<sup>e</sup>.

---

(\*) Tampon carbonate-bicarbonate — pH = 9,6 —  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  : 1,59 g —  $\text{NaHCO}_3$  : 2,93 g — eau distillée q.s.p. : 1 litre.

(\*\*) Tampon P.B.S.-tween pH 7,2 =  $\text{Na}_3\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 10,15 g —  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhydre : 2,45 g —  $\text{NaCl}$  : 4,5 g — tween 20 : 0,5 ml — eau distillée q.s.p. : 1 litre.

Tableau I. — Détermination de la dose d'antigène à employer dans le test E.L.I.S.A.

Concentrat. en azote de l'Antigène	Sérum du sujet porteur de <i>St. stercoralis</i>										Sérum du sujet non porteur de <i>St. stercoralis</i>				Tè- moïn Anti- gène	
	1/10 <sup>e</sup>	1/20 <sup>e</sup>	1/40 <sup>e</sup>	1/80 <sup>e</sup>	1/160 <sup>e</sup>	1/320 <sup>e</sup>	1/640 <sup>e</sup>	1/1280 <sup>e</sup>	1/2560 <sup>e</sup>	1/5120 <sup>e</sup>	1/10240 <sup>e</sup>	1/10 <sup>e</sup>	1/20 <sup>e</sup>	1/40 <sup>e</sup>		1/80 <sup>e</sup>
1000 µg ....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	-	++	+	-	-	-
0,46**	0,53	0,50	0,45	0,44	0,40	0,30	0,23	0,20	0,14	0,12	0,10	0,19	0,11	0,11	0,09	0,08
500 µg .....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	±	-	++	+	-	-	-
0,50	0,52	0,50	0,46	0,40	0,32	0,30	0,19	0,12	0,10	0,08	0,08	0,19	0,10	0,09	0,08	0,09
100 µg .....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	++	+	-	-	-
0,48	0,52	0,48	0,48	0,40	0,35	0,28	0,19	0,13	0,10	0,09	0,09	0,20	0,13	0,10	0,09	0,08
50 µg .....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	++	+	-	-	-
0,46	0,48	0,46	0,40	0,39	0,30	0,27	0,19	0,14	0,10	0,09	0,09	0,19	0,11	0,09	0,08	0,09
10 µg .....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	++	+	-	-	-
0,44	0,54	0,51	0,38	0,30	0,28	0,25	0,18	0,13	0,18	0,09	0,09	0,17	0,12	0,09	0,08	0,08
5 µg .....	++++	++++	++++	+++	++	+	±	-	-	-	-	++	-	-	-	-
0,47	0,38	0,28	0,25	0,20	0,18	0,14	0,13	0,12	0,09	0,09	0,09	0,16	0,10	0,09	0,08	0,08

\* Lecture directe.

\*\* Densité optique mesurée à 449 nm une heure après l'addition du substrat et dilution au 1/10<sup>e</sup> en eau distillée.

### Les modalités de la réaction.

La réaction est effectuée dans des microplaques en polystyrène à fond rond selon les modalités suivantes :

L'antigène convenablement dilué est réparti dans les cupules sous un volume de 0,1 ml. La plaque est recouverte et mise à incuber une heure à 37 °C. Les cupules sont vidées et les plaques lavées manuellement trois fois avec du P.B.S.-tween.

Chaque dilution du sérum est répartie dans une cupule sous un volume de 0,1 ml. La plaque est recouverte et laissée à incuber 2 heures à 37 °C, puis lavée comme précédemment.

Le conjugué anti-immunoglobulines humaines marqué à la peroxydase (Institut Pasteur) dilué au 1/500<sup>e</sup> en tampon P.B.S.-tween est réparti à raison de 0,1 ml par cupule. Les plaques couvertes sont laissées à incuber une heure à 37 °C, puis lavées.

Le substrat (\*) est distribué dans chaque cupule sous un volume de 0,1 ml et laissé à incuber une heure à la température du laboratoire. L'évolution de la réaction colorée est arrêtée par adjonction de 0,05 ml de  $\text{NaN}_3$  à 0,1 % par cupule.

La lecture pourra alors être faite jusqu'à 24 heures après, soit par lecture directe, soit à l'aide d'un spectrophotomètre à 449 nm après avoir dilué au 1/10<sup>e</sup> en eau distillée le contenu de chaque cupule.

## Résultats

### 1<sup>o</sup> Les résultats qualitatifs.

Avec les sérums de sujets porteurs de Strongles, dilués au 1/10<sup>e</sup>, les densités optiques obtenues s'étaient de 0,15 à 0,54 alors que pour les sérums présumés négatifs ces densités varient de 0,06 à 0,19, les densités optiques moyennes étant respectivement de  $0,30 \pm 0,02$  pour les sérums positifs et de  $0,098 \pm 0,006$  pour les sérums négatifs.

Avec les sérums dilués au 1/20<sup>e</sup>, les densités optiques varient de 0,12 à 0,52 pour les sérums porteurs de strongles et de 0,05 à 0,14 pour les sérums négatifs, les densités moyennes étant respectivement de  $0,24 \pm 0,9$  pour les sérums positifs et de  $0,084 \pm 0,003$  pour les sérums négatifs.

La répartition de ces résultats est rapportée sur le *graphique 1*.

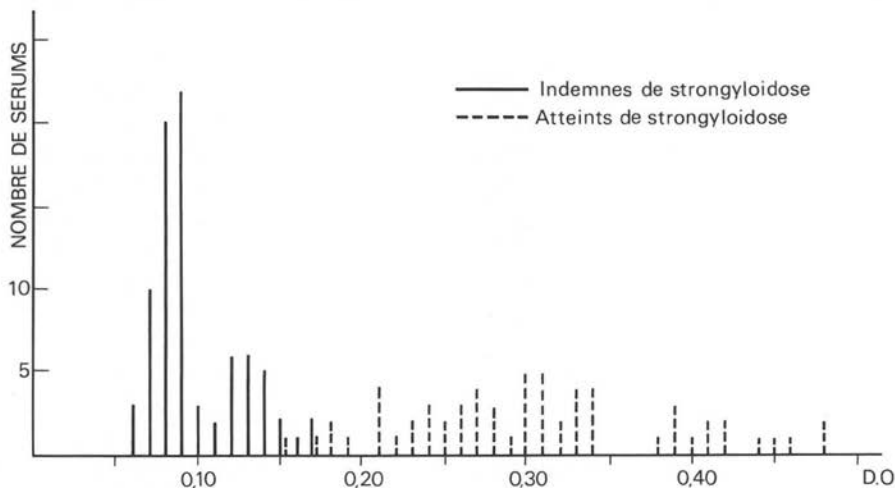
Sur le *tableau II* sont rapportés les résultats obtenus avec les sérums prélevés chez des sujets porteurs d'autres Nématodes : avec les sérums de sujets filariens, les densités optiques varient de 0,07 à 0,17, avec les sérums de sujets porteurs d'Oxyures,

---

(\*) Substrat : dissoudre 80 mg d'acide 5-amino-2-hydroxybenzoïque (Merck) dans 100 ml d'eau distillée réchauffée au préalable à 60-80 °C. Refroidir à la température ordinaire. Ajuster à pH 6 avec NaOH 0,1 M — Ajouter : 9 parties de la solution d'acide-5-amino-2-hydroxybenzoïque + 1 partie d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,05 %. Le mélange est à effectuer au moment de la réaction.

Tableau II. — Résultats obtenus par le tests E.L.I.S.A. avec les sérums de sujets porteurs de divers Nématodes (densités optiques mesurées à 449 nm une heure après l'addition du substrat et dilution au 1/10<sup>e</sup> en eau distillée).

Densités optiques	Sérums de sujets porteurs de :			
	Filaires	Oxyures	Ascaris	Ankylostomes
0,07	2	1		
0,08	2		1	1
0,09	1	3		
0,10	1	1		1
0,11		1		1
0,12		1		
0,13				1
0,14				1
0,15			1	1
0,16				1
0,17	1			1
0,18				1
0,19				1
0,23				1
0,25			1	
0,26				1
0,27				1
0,38			1	1
0,42				1
Moyenne	0,094 ± 0,032	0,095 ± 0,014	0,215 ± 0,200	0,198 ± 0,054



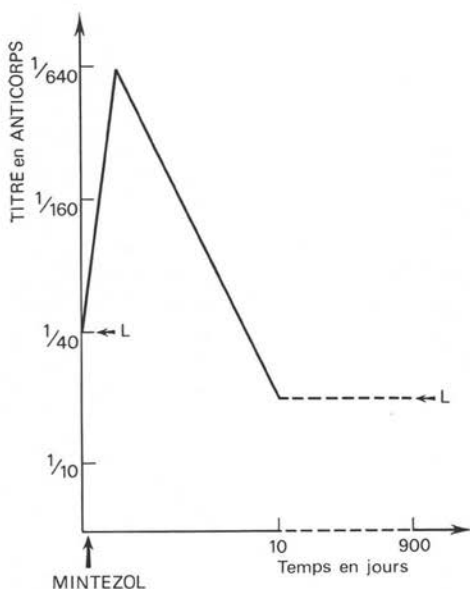
Graphique 1. — Résultats du test E.L.I.S.A. pratiqué sur des sérums dilués au 1/10<sup>e</sup> de sujets indemnes de strongyloïdose et de sujets porteurs de *St. stercoralis* (densités optiques mesurées à 449 nm une heure après l'addition du substrat et dilution au 1/10<sup>e</sup> en eau distillée).

les densités optiques vont de 0,07 à 0,12, alors que chez les sujets porteurs d'Ankylostomes, elles vont de 0,08 à 0,42 et chez des sujets porteurs d'Ascaris de 0,08 à 0,38.

## 2° Les résultats quantitatifs.

Le test E.L.I.S.A. pratiqué sur 55 sérums de sujets porteurs de *St. stercoralis* dilués de 1/2 en 1/2 à partir de la dilution du 1/10<sup>e</sup> a donné les titres en anticorps suivants :

Titre en anticorps	Nombre de sérums
1/10 <sup>e</sup> .....	3
1/20 <sup>e</sup> .....	6
1/40 <sup>e</sup> .....	11
1/80 <sup>e</sup> .....	9
1/320 <sup>e</sup> .....	15
1/160 <sup>e</sup> .....	6
1/640 <sup>e</sup> .....	4
1/1280 <sup>e</sup> .....	1



Ces tests pratiqués sur les sérums de malades traités par le Mintezol permettent de suivre l'évolution des anticorps à la suite de ce traitement. C'est ainsi que (graphique 2), chez un sujet porteur de larves, on a pu assister dès le lendemain de la prise du médicament à une ascension brutale des anticorps, ascension consécutive à la lyse du parasite, puis le titre s'est abaissé par la suite. Ce malade revu trois ans plus tard présentait encore des anticorps et était à nouveau porteur de larves, soit qu'il se soit réinfesté après le traitement, soit que ce dernier ait été insuffisant. A l'inverse, nous avons pu constater la disparition complète des anticorps chez des sujets pour lesquels la thérapeutique s'est avérée efficace aussi bien sur le plan clinique que coprologique.

Graphique 2. — Courbe d'évolution des anticorps chez un sujet porteur de larves de *St. stercoralis* et soumis à une thérapeutique antiparasitaire.

## Discussion

Le test E.L.I.S.A. nous a permis de déceler des anticorps chez la majorité des sujets porteurs de larves de *Strongyloides stercoralis* alors que chez des sujets témoins non parasités la réaction s'est révélée négative.

Ce test devrait donc pouvoir être appliqué au diagnostic de la strongyloïdose. C'est pourquoi nous avons été amenés à préciser sa spécificité en étudiant un certain nombre de sérums de sujets porteurs d'autres Nématodes. Chez les sujets porteurs d'Oxyures, la réaction se montre constamment négative même dans le cas d'infestation très massive et cela pourrait être un argument en faveur de la spécificité du test si les réactions immunologiques au cours de l'oxyurose étaient mieux connues. Aussi avons-nous testé d'autre part des sérums pour lesquels des anticorps antifiliariens avaient été par ailleurs mis en évidence. Sur 7 sérums testés, 6 ont donné des résultats négatifs avec l'antigène de *Strongyloides ratti* et un seul résultat à la limite de la positivité.

Par contre, chez des sujets porteurs d'Ankylostomes et d'*Ascaris*, un certain nombre de résultats positifs ont été obtenus avec l'extrait de *Strongyloides ratti* ; on pourrait ainsi mettre en doute la spécificité de la réaction. En fait, il s'agit là d'un problème difficile puisque, dans tous les cas, il s'agit de sérums de sujets originaires de régions tropicales et pour lesquels l'absence de larves de *Strongyloides stercoralis* lors de l'examen coprologique n'est pas un argument suffisant pour rejeter le diagnostic de strongyloïdose. D'autre part, des études antérieures utilisant les tests intradermiques ont permis à Chaïa [3] de mettre en évidence la spécificité de l'extrait antigénique de *Strongyloides ratti*. Nous avons pu nous-mêmes, par la méthode de Chaïa, pratiquée sur plus de 1 000 sujets, confirmer la bonne spécificité de l'intradermoréaction [6]. Et, dans nombre de cas où la réaction cutanée était positive et l'examen coprologique négatif, nous avons pu constater que la répétition des examens coprologiques conduisait fréquemment à la mise en évidence directe des larves du parasite.

C'est pourquoi il nous semble que la mise en œuvre du test E.L.I.S.A. puisse être utile au diagnostic de la strongyloïdose ; la positivité de la réaction doit être considérée comme un argument de présomption en faveur de cette affection incitant à effectuer ou à répéter les examens coprologiques.

D'autre part, à la suite du traitement, il permet de suivre l'évolution des anticorps, ce que ne permettent pas les tests intradermiques dont la positivité se maintient de nombreuses années.

## Bibliographie

1. Batlett A. et al., 1975 : Preliminary studies on the application of enzyme immunoassay in the detection of antibodies in onchocerciasis. *Trop. Parasitol.*, 26, 370-374.
2. Bout D. et al., 1975 : Le diagnostic immunoenzymologique des affections parasitaires. II. Immunoenzymologie quantitative (E.L.I.S.A.). *Lille Méd.*, 20, 561-566.

3. Chaia G., 1962 : Contribuição para o estudo da reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) no diagnóstico da estrogiloidose humana. *Tese de Doutorado Belo Horizonte*.
  4. Campbell D. H. et al., 1970 : Methods in immunology. — *W. A. Benjamin, Inc.*, édit., New-York, p. 454.
  5. Ruitenberg E. J. et al., 1974 : Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assay. *Bull. O.M.S.*, 51, 108-109.
  6. Tribouley-Duret J. et al., 1976 : Intérêt des tests d'allergie cutanée pour le diagnostic de la Strongyloïdose. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 69, 360-367.
  7. Voller A. et al., 1974 : A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull. O.M.S.*, 51, 209-211.
  8. Voller A. et al., 1975 *b* : Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet*, *i*, 426-427.
-