



**HAL**  
open science

# Diagnostic sérologique de l'amibiase à *Entamoeba histolytica* : validation d'un nouveau test ELISA au CHU de Grenoble

Nicolas Beyls

► **To cite this version:**

Nicolas Beyls. Diagnostic sérologique de l'amibiase à *Entamoeba histolytica* : validation d'un nouveau test ELISA au CHU de Grenoble. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00650326

**HAL Id: dumas-00650326**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00650326>**

Submitted on 9 Dec 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASE VISCERALE  
A ENTAMOEBIA HISTOLYTICA : VALIDATION D'UN NOUVEAU  
TEST ELISA AU CHU DE GRENOBLE**

THESE  
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

Nicolas BEYLS

Né le 1<sup>er</sup> janvier 1987

A La Tronche (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 1<sup>er</sup> décembre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Mme **Claudine PINEL**, Maître de conférence à l'UFR de Pharmacie

Membres :

Mme **Odile FAURE**, Directeur de Thèse, Docteur en Pharmacie, Praticien attaché au CHU de Grenoble

Mme **Renée GRILLOT**, Professeur émérite à l'UFR de Pharmacie

M. **Jean-Paul STAHL**, Professeur à l'UFR de Médecine, Chef de service de Médecine Infectieuse

M. **Clément BORDIER**, Directeur de Bordier Affinity Products SA

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*



**DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASE VISCERALE  
A ENTAMOEBIA HISTOLYTICA : VALIDATION D'UN NOUVEAU  
TEST ELISA AU CHU DE GRENOBLE**

THESE  
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

Nicolas BEYLS

Né le 1<sup>er</sup> janvier 1987

A La Tronche (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 1<sup>er</sup> décembre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Mme **Claudine PINEL**, Maître de conférence à l'UFR de Pharmacie

Membres :

Mme **Odile FAURE**, Directeur de Thèse, Docteur en Pharmacie, Praticien attaché au CHU de Grenoble

Mme **Renée GRILLOT**, Professeur émérite à l'UFR de Pharmacie

M. **Jean-Paul STAHL**, Professeur à l'UFR de Médecine, Chef de service de Médecine Infectieuse

M. **Clément BORDIER**, Directeur de Bordier Affinity Products SA

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2010-2011

## PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)- <i>À partir du 1<sup>er</sup> mai</i>
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	René	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH) - <i>À partir du 1<sup>er</sup> mai</i>
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

## ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

## ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maître de conférence
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	professeur Certifié

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Sclolarité Pharmacie

## UFR de Pharmacie de Grenoble



DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

### ATER (n= 5)

DEFENDI Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
SAPIN Emilie	ATER	Physiologie Pharmacologie (HP2)

### MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

### PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET :	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »  
IBS : Institut de Biologie Structurale  
JR : Jean Roget  
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel  
PRAG : Professeur Agrégé  
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Scolarité Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Doyen de la Faculté : M. Christophe RIBUOT

Vice-doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2010-2011

## MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

## UFR de Pharmacie de Grenoble

---

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »  
IBS : Institut de Biologie Structurale  
JR : Jean Roget  
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel  
PRAG : Professeur Agrégé  
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions



# *Remerciements*

A Madame le Docteur Odile Faure,

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être mon directeur de thèse. J'ai particulièrement apprécié votre écoute attentive, votre patience et vos conseils avisés. Je tiens à vous remercier pour votre confiance et pour m'avoir guidé lors de la sélection des sérums et aidé dans de nombreux domaines en partageant vos connaissances et votre expérience. Je vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect et de mon entière reconnaissance.*

A Madame le Docteur Claudine Pinel,

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de présider ce jury et de juger ce travail.*

A Monsieur le Professeur Jean-Paul Stahl,

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury et de juger ce travail. Je vous remercie pour m'avoir accordé un entretien et m'avoir fait part de votre expérience clinique.*

A Madame Renée Grillot,

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury et de juger ce travail.*

A Monsieur Clément Bordier,

*Je vous remercie de m'avoir proposé ce stage de master ainsi que de tous vos conseils et de votre expérience que vous avez prodigués tout au long de mon stage. Merci également pour avoir mis en place la collaboration entre la société Bordier et le CHU de Grenoble. Un grand remerciement à la société Bordier Affinity Products pour le financement de ce projet.*

A Monsieur Hervé Pelloux,

*Pour m'avoir soutenu et encouragé dans ce projet de validation clinique.*

A Monsieur Olivier Rogeot,

*Pour avoir répondu à mes questions et m'avoir permis de consulter les dossiers de ses patients.*

A Monsieur Florent Genoux,

*Pour m'avoir accueilli et formé dans la société Bordier Affinity Products. Pour vos conseils et vos idées toujours pertinentes.*

Aux techniciennes de sérologie parasitaire du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du  
CHU de Grenoble : Sonia, Evelyne et Marie-Paule,

*Pour m'avoir accueilli et accepté dans le laboratoire. Pour m'avoir aidé dans la récolte des sérums.*

A mes parents,

*Pour m'avoir poussé et soutenu dans mes études. Votre présence était, est et sera toujours indispensable à mes yeux.*

A Maxime,

*Pour m'avoir poussé toujours vers le haut quand je n'en faisais pas assez.*

A Marguerite,

*Pour m'avoir toujours soutenu et aimé depuis qu'on est ensemble.*

A toute ma famille,

Et ma belle-famille,

A tous mes amis,

*Pour ces belles années d'études en pharmacie.*

# *Table des matières*

<b>Introduction.....</b>	<b>12</b>
<b>Première partie : l'amibiase.....</b>	<b>15</b>
1. Le parasite.....	16
1.1 La morphologie.....	16
1.2 L'épidémiologie.....	18
1.3 Le cycle évolutif.....	20
2. La physiopathologie.....	21
3. Le diagnostic.....	23
3.1 Le diagnostic de l'amibiase viscérale.....	23
3.2 Les techniques utilisées.....	26
3.3 Les tests commerciaux existants.....	28
4. Les traitements.....	29
5. La prophylaxie.....	30
<b>Deuxième partie : matériels et méthodes.....</b>	<b>32</b>
1. Le matériel biologique.....	33
1.1 L'antigène.....	33
1.2 Les sérums de contrôle.....	33
1.3 Les sérums sélectionnés.....	34
1.4 Le conjugué.....	35
2. La méthode ELISA.....	36
2.1 Le principe.....	36
2.2 Le protocole.....	37
3. L'Immunofluorescence Indirecte.....	38
4. L'agglutination sur particules de latex.....	39
5. Les paramètres évalués.....	40
<b>Troisième partie : résultats.....</b>	<b>43</b>
1. La sérologie amibiase.....	44
1.1 L'ELISA.....	44
1.2 L'IFI.....	48
1.3 Le latex.....	48
1.4 Bilan.....	49
2. Les données épidémiologiques.....	50
3. Les données cliniques.....	52
4. Les données biologiques.....	54
5. La reproductibilité.....	56
5.1 Intra lot.....	56
5.2 Inter lots.....	58
<b>Quatrième Partie : discussion.....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>65</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>68</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>72</b>

## ABBREVIATIONS

Ac :	Anticorps
Ag :	Antigène
ALAT :	Alanine Amino Transférase
ASAT :	Aspartate Amino Transférase
BAP :	Bordier Affinity Products
CHU :	Centre Hospitalo-Universitaire
CRP :	Protéine C Réactive
CTS :	Centre de Transfusion Sanguine
DIV :	Diagnostic In Vitro
DO :	Densité Optique
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GammaGT :	Gamma Glutamyl Transférase
HAI :	HémAgglutination Indirecte
IFI :	ImmunoFluorescence Indirecte
PA :	Phosphatase alcaline
pNPP :	p-Nitro Phenyl Phosphate
SA :	Société Anonyme
VPN :	Valeur Prédictive Négative
VPP :	Valeur Prédictive positive

# *Introduction*

L'**amibiase** est une parasitose liée au péril fécal humain, due à un protozoaire, *Entamoeba histolytica*. Sa prévalence est très élevée en milieu tropical en raison principalement des mauvaises conditions d'hygiène fécale, et dans les pays du tiers-monde où les déjections humaines servent d'engrais. La transmission est consécutive à l'ingestion de kystes présents dans l'eau ou les aliments contaminés. Durant le passage dans le tractus gastro-intestinal, chaque kyste libère huit formes végétatives appelées trophozoïtes qui vont se loger dans le côlon. Dans certains cas, l'amibe peut développer des facteurs de virulence provoquant des ulcérations de la paroi colique, c'est l'amibiase intestinale. Lorsque l'infection est importante, une perforation intervient permettant à des parasites de migrer vers le foie en passant par la circulation sanguine. Ils peuvent alors former des abcès, c'est l'amibiase viscérale. Le diagnostic de l'affection repose sur la symptomatologie, l'épidémiologie (notion de séjour en zone d'endémie), les anomalies biologiques (syndrome inflammatoire, altération du bilan hépatique) et la mise en évidence des formes hématophages dans les selles ou le liquide de ponction de l'abcès. Seule l'observation directe de cette forme affirme le diagnostic parasitologique. Toutefois, cette recherche se révèle fréquemment négative, aussi des techniques sérologiques ont été développées pour la mise en évidence d'anticorps spécifiques.

Différentes techniques sont utilisées : l'immunofluorescence indirecte (IFI), l'hémagglutination indirecte (HAI), l'agglutination de particules de latex et une technique immunoenzymatique l'enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Cette dernière présente l'intérêt d'être automatisable, reproductible, robuste, quantitative et moins contraignante que l'IFI.

Le réactif évalué au cours de ce travail est basé sur ce principe et met en œuvre des antigènes solubles de trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*. Les objectifs de cette étude sont : l'étude des performances et de la reproductibilité de ce nouveau test sur des sérums de la sérothèque du service de Parasitologie de l'hôpital de Grenoble. Les résultats seront confrontés à



ceux des autres réactifs ELISA présents sur le marché international et à ceux des deux tests sérologiques utilisés en routine au CHU de Grenoble : l'Amoeba-Spot IF Biomérieux® (immunofluorescence indirecte) et le Bichro-latex amibe Fumouze®.

Des ces résultats dépendra la commercialisation du réactif par la société Bordier Affinity Products (BAP) sous réserve de l'obtention du marquage CE.

Dans le même temps, les dossiers des patients vont être étudiés. L'épidémiologie, la symptomatologie clinique, la biologie, le diagnostic et le traitement des patients seront confrontés à ce qui est décrit dans la littérature concernant l'amibiase viscérale à *E. histolytica*.

## *Première partie : l'amibiase*

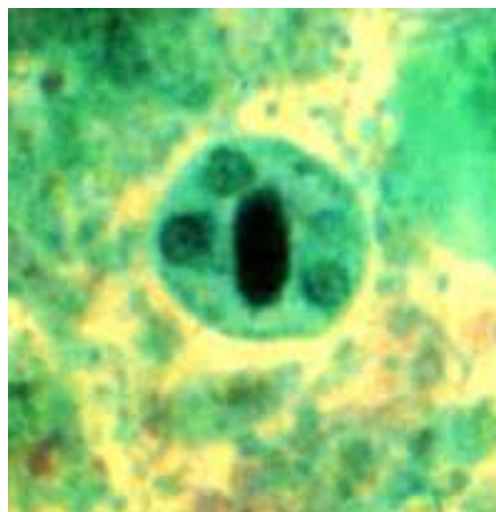
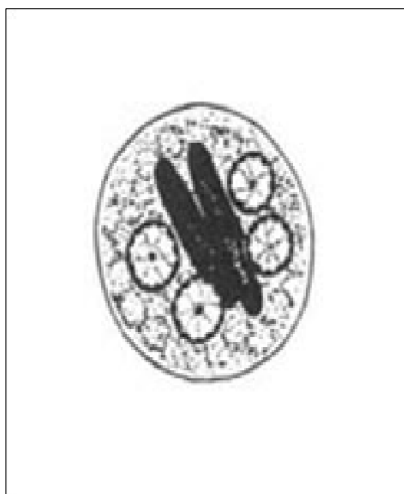
# 1 Le parasite

## 1.1 La morphologie

Le parasite responsable de la maladie est *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903). C'est la seule amibe intestinale dont la pathogénicité chez l'homme soit certaine (1). Il a longtemps été considéré que seulement 10% des porteurs développaient une pathologie amibienne bien que l'hypothèse de deux espèces, morphologiquement identiques, dont l'une serait pathogène (*E. histolytica*) et l'autre non pathogène (*E. dispar*), ait été évoquée dès 1925 (Brumpt) (2). Ce n'est que depuis 1993 que l'existence de ces deux espèces a été reconnue (44).

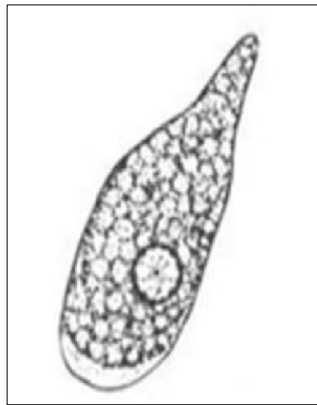
Le parasite se présente sous trois formes :

- Une forme kystique (figure 1) qui est la forme de résistance et de dissémination car les kystes sont éliminés dans les selles. Son portage traduit l'amibiase infestation. A ce stade-là, il est impossible de différencier morphologiquement *E. histolytica* d'*E. Dispar*.

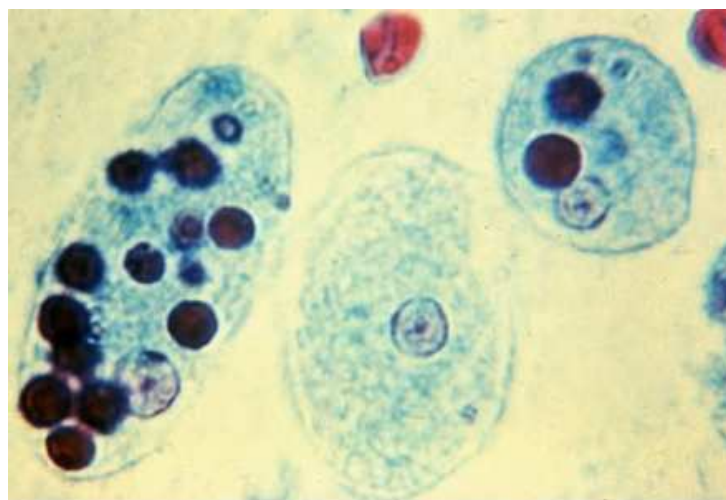


**Figure 1** : Kyste de *E. histolytica* ou *E. dispar* d'après Fotedar (30) Obj. X100

- Deux formes végétatives ou trophozoïtes (figure 2) :
  - La forme *minuta*, non pathogène et non hématophage qui traduit l'amibiase infection ou portage asymptomatique.
  - La forme *histolytica*, hématophage, pathogène qui traduit l'amibiase maladie, caractérisée par son potentiel invasif et cytotoxique (1, 7, 9). C'est la présence d'une ou plusieurs hématies dans l'amibe, sa mobilité et sa taille qui permettent d'affirmer le diagnostic d'amibiase à *E. histolytica* (figure 3) (30).



**Figure 2** : Trophozoïte d'*E. histolytica* ou *E. dispar* d'après Fotedar (30) Obj. X100



**Figure 3** : Trophozoïtes d'*E. histolytica* phagocytant des hématies d'après Fotedar (30) Obj. X100

Les facteurs permettant le passage de la forme *minuta* à la forme *histolytica* ne sont pas encore tous connus. On sait que le génotype de l'hôte, celui du parasite ainsi que des facteurs environnementaux semblent être impliqués. Récemment, des études ont démontré que certains génotypes du parasite entraînent une plus forte probabilité d'apparition de la maladie (43). Notamment, il a été démontré l'implication de certains gènes dans le passage à la forme *histolytica* (29). Ces gènes ont été retrouvés de façon plus répétée chez les souches les plus virulentes d'*E. histolytica*. En outre, il existe des polymorphismes pour certains gènes de l'hôte qui sont corrélés avec une plus forte susceptibilité à la maladie. Par exemple, un déficit en leptine constitue un facteur favorisant le passage à l'amibiase maladie (29). Il semble que l'interaction avec la flore bactérienne digestive et l'immunité de l'hôte jouent également un rôle.

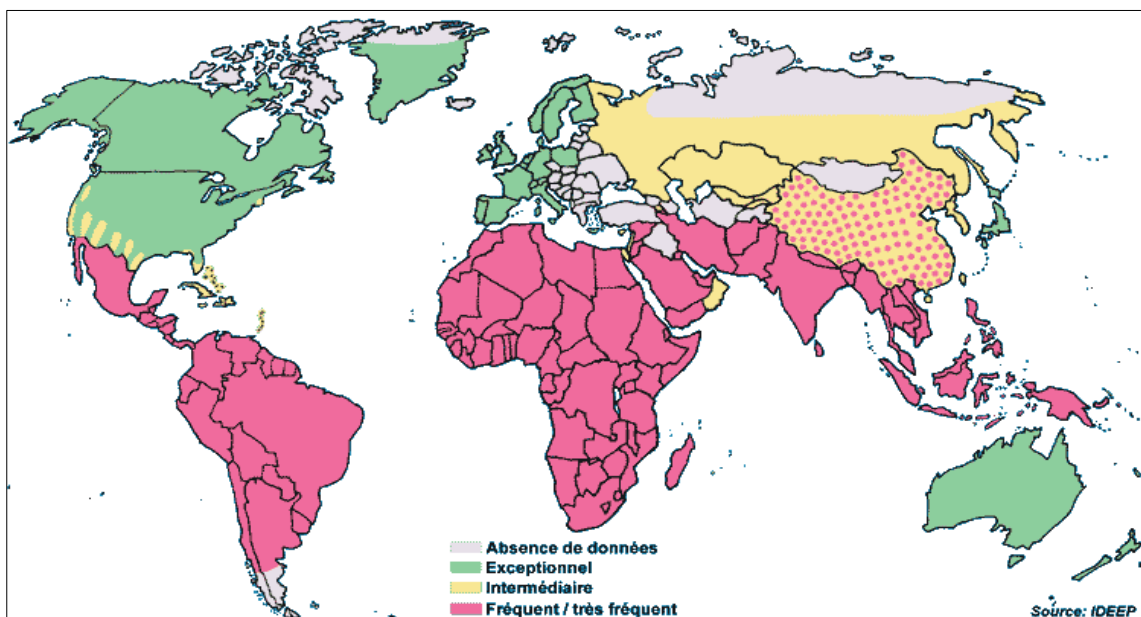
## 1.2 L'épidémiologie

On estime qu'environ 500 millions d'individus sont porteurs de kystes du complexe *E. histolytica/E. dispar* (2-5), et qu'en moyenne, 10% sont porteurs de kystes d'*E. histolytica* (Tableau I). Dans 1% des cas seulement, l'infection va évoluer vers la formation d'abcès, généralement hépatiques, et plus rarement pulmonaires ou cérébraux : c'est l'amibiase viscérale (45).

Sujets asymptomatiques	Effectif de l'étude	Prévalence du portage d' <i>E. dispar</i>	Prévalence du portage d' <i>E. histolytica</i>
Afrique du Sud	1381	9 %	1 %
Bengladesh	1872	12 %	5 %
Brésil	564	9 %	11 %
Egypte	182	24 %	21 %
Grèce	322	8 %	< 1 %
Philippines	1872	7 %	1 %

**Tableau I** : Prévalences respectives du portage d'*E. dispar* et d'*E. histolytica* (12)

La prévalence de la maladie est élevée en milieu tropical car elle est principalement liée aux mauvaises conditions d'hygiène fécale et d'éducation sanitaire (6). Dans certaines régions, comme en Egypte, 20% de la population est porteur sain. Le dépistage et le traitement de ces individus restent très difficiles dans ces zones pauvres et surpeuplées. L'homme étant le seul réservoir du parasite, la transmission inter-humaine se fait de manière manuportée ou par l'intermédiaire des aliments et de l'eau. Ce phénomène, associé avec les conditions sanitaires, explique que la prévalence de la maladie est plus forte dans les zones tropicales. En effet, la répartition géographique de l'amibiase correspond aux zones du globe où la densité de population est la plus forte (figure 4). L'Amérique centrale, l'Afrique et l'Asie du sud sont les zones où la population croît le plus vite. Les problèmes d'hygiène et d'accès à l'eau salubre, liés à cette surpopulation, favorisent les infections à transmission fécale telle que l'amibiase.



**Figure 4** : Répartition géographique de l'amibiase d'après l'IDEEP

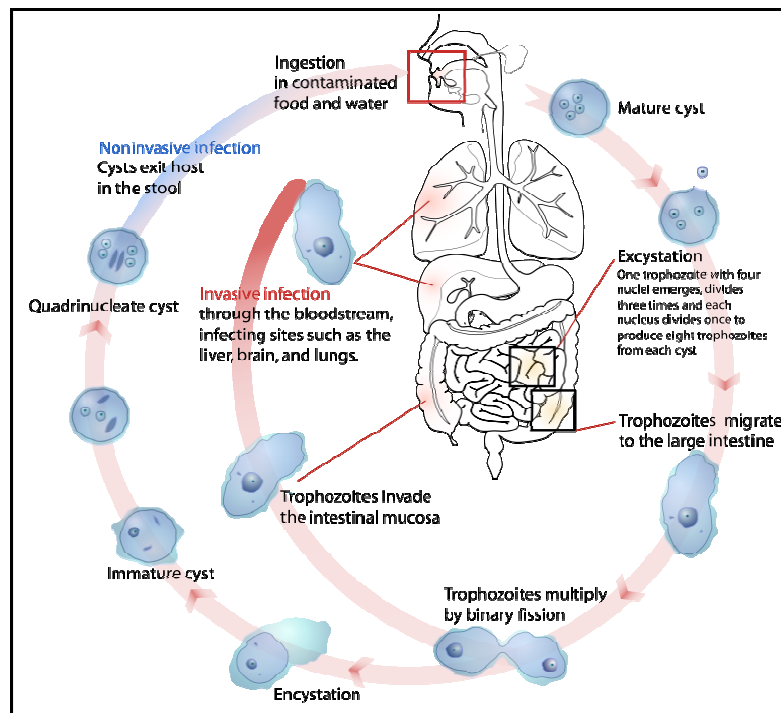
De 10 à 25% des personnes porteuses de kystes d'*E. histolytica* vont développer une amibiase intestinale (29), les enfants étant particulièrement concernés. Il a été observé que la malnutrition et la sous-nutrition sont des facteurs favorisant le passage de l'amibiase infesta-

tion à l'amibiase maladie (29). Et dans 1% des cas, l'infection va évoluer vers une amibiase viscérale et cela, plus fréquemment chez les hommes adultes (29). Les homosexuels sont de même considérés comme une population à risque pour cette maladie.

Dans les pays développés, les cas d'amibiase concernent les immigrants, les touristes revenant des pays à forte endémicité et les homosexuels masculins. On peut d'ailleurs noter que le nombre de cas d'importation est en augmentation aux Etats-Unis (31). On peut l'expliquer par l'accroissement du nombre de migrants du Sud vers le Nord et par la démocratisation des voyages professionnels et touristiques.

### 1.3 Le cycle évolutif

Le cycle débute par l'ingestion de kystes présents dans les aliments contaminés (surtout les crudités), dans le sol et l'eau souillée par les excréta des porteurs sains et sur les mains des personnes infestées (figure 5). Les mouches peuvent également transporter des kystes des selles sur les aliments.



**Figure 5 :** Schéma du cycle de vie d'*E. histolytica*

d'après *The London School of Hygiene and Tropical Medicine*

L'ingestion d'un kyste entraîne, suivant les relations hôte-parasite, soit un cycle non pathogène (kyste - trophozoïte non hématophage - kyste), soit un cycle pathogène (kyste - trophozoïte hématophage).

Le kyste de 10 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre, très résistant dans le milieu extérieur, contient 4 noyaux. Une fois dans l'intestin, il se divise en 8 trophozoïtes uninucléés de 20-30  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils ont la capacité de se déplacer grâce à leurs pseudopodes. Ils migrent jusqu'au côlon où ils s'y multiplient par fission binaire et adhèrent à la muqueuse par l'intermédiaire de lectines et d'adhésines. Ils se nourrissent en phagocytant des particules alimentaires.

Dans le cadre d'un cycle non pathogène, l'infection est asymptomatique, certains trophozoïtes s'enkystent dans une paroi de chitine et se divisent deux fois pour donner des kystes à 4 noyaux qui seront éliminés dans les selles.

Dans le cadre d'un cycle pathogène (colite amibienne ou abcès du foie), il n'y a pas d'excrétion de kystes dans le milieu extérieur. C'est donc une des raisons pour laquelle le diagnostic direct par examen microscopique des selles est très souvent mis en défaut. Les trophozoïtes évoluent dans ce cas vers la forme *histolytica*. Ils phagocytent des hématies et libèrent des enzymes protéolytiques, cytotoxiques pour l'épithélium intestinal, à l'origine de multiples ulcérations de la paroi (il est à noter que *E. dispar* ne possède pas ces protéines, c'est pourquoi elle n'est pas pathogène).

## 2 La physiopathologie

Elle se manifeste uniquement en présence de la forme *histolytica* de l'espèce *E. histolytica*.

La maladie peut être exclusivement intestinale c'est la **dysenterie amibienne** ou amibiase colique ou colite amibienne ou amibiase intestinale (10). Elle se manifeste par des diarrhées glairo-sanglantes avec douleurs abdominales, l'état général est généralement bien



conservé. Le nombre de selles est limité au maximum à 10 par jour. Les complications, fréquentes, sont des appendicites, des perforations et des abcès de la muqueuse colique. Ce processus est rendu possible en raison des adhésines et des lectines qui permettent l'adhésion de l'amibe sur l'épithélium intestinal. De rares formes graves peuvent évoluer en colectasie, péritonite ou choc septique, voire en amoebome colique. Il s'agit d'une pseudotumeur inflammatoire du côlon, son apparition est rare mais des cas ont été rapportés en Amérique Latine et en Afrique du sud (12).

Ou bien la maladie peut atteindre différents organes, c'est l'amibiase viscérale ou invasive ou encore tissulaire. Elle touche environ 50 millions de personnes dans le monde et est responsable de 40 000 à 100 000 décès par an. C'est la seconde cause de mortalité par infection parasitaire dans le monde après le paludisme (1, 2).

Elle se présente sous trois formes :

- **L'amibiase hépatique** (11) ou l'abcès amibien du foie. On retrouve un antécédent de dysenterie amibienne dans un cas sur deux. Elle se traduit cliniquement par la triade de Fontan : douleur, fièvre et hépatomégalie. L'état général est altéré. Ce processus est rendu possible grâce à des protéases qui détruisent la membrane de l'entérocyte permettant ainsi le passage des parasites dans la circulation sanguine et leur localisation dans le foie par l'intermédiaire de la veine porte. C'est le cas le plus fréquent d'amibiase viscérale. Au niveau biologique, on retrouve une augmentation très nette de la protéine C réactive (CRP) et une hyperleucocytose. Le bilan hépatique est perturbé, avec cytolysse marquée par des ASAT et ALAT trois fois supérieures à la normale ainsi que la phosphatase alcaline (PA) et la gamma Glutamyl Transférase (gammaGT) augmentées. Au niveau de l'imagerie, on observera à l'échographie abdominale, une zone hypo-

dense souvent au niveau du foie droit. Cela justifiera une tomodensitométrie abdominale pour caractériser l'abcès.

- **L'amibiase pleuro-pulmonaire** souvent secondaire à une amibiase hépatique par passage intra-thoracique ou propagation vasculaire.
- **L'amibiase cérébrale** transmise par voie hématogène est rare.

Une autre forme de la maladie est **l'amibiase cutanée** qui provoque des lésions ulcéreuses souvent localisées dans la région ano-génitale.

## 3 Le diagnostic

### 3.1 *Le diagnostic de l'amibiase viscérale*

Dans le contexte de localisation profonde, l'examen microscopique des selles est la plupart du temps négatif et peu informatif car les amibes ne s'enkystent pas quand la maladie est viscérale. La ponction des abcès peut être recommandée en cas de risque de rupture ou de compression de veines ou d'artères. Cependant dans ce type de prélèvement, on ne retrouve que très rarement la présence d'amibes à l'examen direct, car elles restent localisées dans la paroi de l'abcès. Il est par ailleurs possible de détecter l'antigène Gal/GalNac qui est spécifique d'*E. histolytica/dispar* dans le pus d'abcès car il existe des anticorps monoclonaux dirigés contre cet antigène. Ce test est récent donc encore faiblement utilisé bien que sa sensibilité soit bonne (12). On a donc recours pour ce diagnostic, aux techniques sérologiques, souvent dans un contexte d'urgence.

On peut observer dans le tableau II les différentes techniques utilisées dans le diagnostic de l'amibiase viscérale ainsi que leurs sensibilités respectives. Certaines équipes ont utilisé les kits de détection d'antigènes dans les selles afin de mettre en évidence des antigènes sériques

circulants. Les résultats indiquent que ceux-ci peuvent être présents dans la phase précoce de la maladie (18, 19). Cependant, à l'heure actuelle, ces tests ne sont pas validés pour cette utilisation.

Technique	Sensibilité
<b>Sérum</b>	
- sérologie	94 %
- recherche d'antigènes circulants	75 % en phase tardive 100 % en phase précoce avant traitement
<b>Selles</b>	
- microscopie optique	10 %
- coproantigènes	habituellement négatif
<b>Pus d'abcès</b>	
- microscopie optique	< 25 %
- antigènes Gal/GalNac	97,6 %
= PCR	100 %

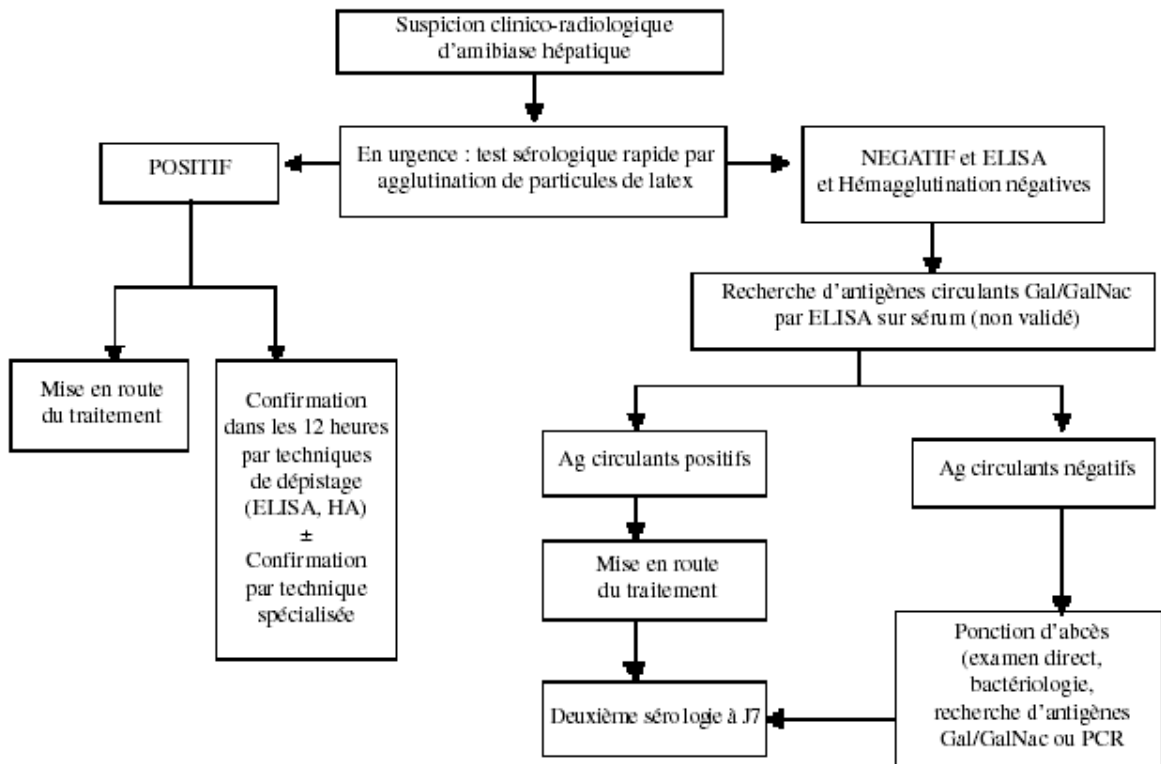
**Tableau II** : Sensibilité des examens biologiques dans le diagnostic de l'amibiase viscérale (12)

La sérologie reste en effet le test le plus fiable. Il existe des différences de performances entre les techniques utilisées. On peut observer un classement en fonction de leur spécificité et sensibilité dans le tableau III (22, 32, 40, 41). D'après ce classement on va privilégier l'association d'un test rapide et très spécifique (latex, HAI) avec un test plus long mais plus sensible (ELISA, IFI).

Techniques	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
IFI	100	90
ELISA	100	90
HAI	95	97
Latex	91	97

**Tableau III** : Spécificité et sensibilité des techniques de diagnostic sérologique de l'amibiase

D'après l'algorithme décisionnel devant une suspicion d'amibiase viscérale donnée dans la méta-analyse de Merens (figure 6), la sérologie reste le diagnostic de certitude. Le plus souvent, une recherche d'anticorps spécifiques par agglutination de particule de latex est demandée en urgence, elle sera ensuite complétée par une ELISA (39) et/ou une HAI (1).



**Figure 6** : Proposition d'algorithme décisionnel devant une suspicion d'amibiase hépatique d'après Merens et al (2005)

En résumé, les patients concernés par une demande de recherche d'anticorps spécifiques anti *E. histolytica* dans le sérum ont le profil suivant :

- voyageur ou immigré revenant d'une zone d'endémie
- ayant eu un épisode de diarrhée sur place dans un cas sur deux
- avec au moins deux des symptômes de la triade de Fontan : fièvre, douleur, hépatomégalie
- le bilan hépatique est perturbé

- les marqueurs de l'inflammation sont présents
- suite aux douleurs et à l'hépatomégalie, une échographie abdominale montre une zone hypodense dans le foie.

Dans tous les cas, les résultats biologiques sont confrontés aux données épidémiologiques, cliniques et à l'imagerie. Etant donné que le parasite responsable de la maladie est rarement observé directement dans les selles et dans le pus d'abcès, le diagnostic est basé sur ces indices que sont : l'épidémiologie, la symptomatologie clinique, la biologie et l'imagerie. On ne peut affirmer un diagnostic d'amibiase viscérale que si toutes ces données sont concordantes.

### **3.2 Les techniques utilisées**

D'après la nomenclature des actes de biologie médicale (version mars 2011).

- **Microscopie** : la recherche de kystes dans les selles ne permet pas d'affirmer que *E. histolytica* est la cause de la maladie. Pour affirmer le diagnostic d'amibiase à *E. histolytica* il faut mettre en évidence des trophozoïtes hématophages mobiles dans les selles. Cette mobilité particulière, unidirectionnelle, s'effectue par émission de pseudopodes. La présence d'hématies dans le cytoplasme des amibes signe le caractère hématophage.
- **Culture** : elle nécessite 4 jours sur un milieu diphasique. Sa sensibilité est supérieure à l'examen direct (13, 14). Son principal avantage est de pouvoir effectuer une analyse de la mobilité électrophorétique des isoenzymes (électrosynérèse). Ceci permet de distinguer *E. histolytica* d'*E. dispar* en identifiant leur différents zymodèmes (46). En pratique, elle est rarement effectuée car la technique est très longue et nécessite un matériel très spécialisé.

- **Anatomopathologie** : la coloscopie permet d'observer les lésions typiques en coup d'ongles (15) d'*E. histolytica* et de faire une biopsie pour rechercher les formes végétatives.
- **Recherche d'antigènes** : les kits ELISA pour la recherche de coproantigènes permettent de détecter spécifiquement *E. histolytica* grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-adhésines (16). Ces tests ont une très forte sensibilité et une bonne spécificité (17, 18). Ils sont utilisés en cas de suspicion d'amibiase intestinale. Cependant, ils ne sont pas utilisables dans les amibiases viscérales car il n'y a pas ou peu d'émission de parasites dans les selles (tableau II).

L'utilisation de ces tests n'est pas validée pour la recherche d'antigènes dans le sérum ou le pus de drainage en cas d'amibiase hépatique. Cependant des études montrent de fortes sensibilités et spécificités (18, 19).

- **PCR** : elle apparaît plus sensible que la recherche de coproantigènes par méthode ELISA (92% vs 80%) dans le diagnostic de l'amibiase intestinale. Selon certains auteurs, la PCR en temps réel serait même plus sensible que la culture (20, 21). Il apparaît cependant plusieurs problèmes comme la qualité de l'extraction de l'ADN, le coût, les contraintes d'utilisation et l'inexistence de kits standardisés. Le principal avantage est la possibilité de différencier les espèces *E. histolytica* et *E. dispar*.
- **Sérologie** : c'est la recherche d'anticorps dans le sérum pour affirmer une amibiase tissulaire. La nomenclature des actes de biologie médicale recommande un dépistage à l'aide de deux des techniques suivantes : IFI, ELISA, HAI et agglutination de particules de latex. Si le résultat est positif, la confirmation peut se faire par électrosynérèse mais elle n'est pas mise en œuvre souvent car c'est une technique longue et contraignante. Ces méthodes de dépistage, disponibles sous forme de kits commercialisés, sont considérées comme très sensibles dans les amibiases invasives (1, 3, 22, 26) (tableau II). Le test

d'agglutination de particules de latex sensibilisées par l'antigène total *E. histolytica* est utile dans le diagnostic d'urgence des amibiases hépatiques. C'est un test simple et très rapide (5 minutes).

Le portage de kystes d'*E. dispar* n'entraîne pas d'apparition d'anticorps sériques (1, 2), le portage asymptomatique d'*E. histolytica* serait responsable d'une séroconversion dans 25 à 45 % des cas, alors qu'en cas d'amibiase intestinale, un taux significatif d'anticorps circulants est détecté dans 70% des cas (5, 15). Mais l'interprétation de la sérologie se révèle parfois difficile car les cicatrices sérologiques sont fréquentes et persistantes en pays de haute endémicité.

### **3.3 Les tests commerciaux existants**

L'éventail et le nombre de tests disponibles pour le diagnostic sérologique des parasitoses sont beaucoup plus restreints que ceux utilisés pour la bactériologie ou la virologie. Les sociétés qui commercialisent des tests de diagnostic in vitro ne voient pas toujours d'intérêt économique (faible rentabilité car petit marché dans les pays développés, difficulté d'obtention des antigènes et pays concernés pas toujours solvables) à rechercher et proposer de nouveaux tests dans ce domaine. Ce sont donc des PME qui développent de nouveaux produits pour ce secteur d'activité.

Concernant les techniques pour le diagnostic d'*E. histolytica*, on s'intéresse uniquement aux tests détectant les anticorps dans le sérum ou le plasma. Ces techniques sont utilisées pour le diagnostic de l'amibiase viscérale, il n'est donc pas nécessaire de distinguer *E. histolytica* de *E. dispar*.

Il existe plusieurs techniques capables de détecter ces anticorps :

- IFI (immunofluorescence indirecte)
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

- HAI (hémagglutination indirecte)
- agglutination de particules de latex

Concernant les tests de détection d'anticorps spécifiques d'*E. histolytica* dans le sérum par ELISA, 5 sociétés commercialisent un kit près à l'emploi :

- Diagnostic automation
- IBL International : Novalisa™
- Millipore
- R-Biopharm : Ridascreen™
- Cypress diagnostics

Un tableau récapitulatif des caractéristiques des tests concurrents est disponible dans l'annexe 1.

## 4 Les traitements (27, 28)

- Pour les porteurs de kystes ou de trophozoïtes non hématophages d'*E. histolytica*, un amoebicide de contact est préféré, d'une part pour éviter le passage à une forme invasive, et d'autre part pour prévenir la contamination de l'entourage par transmission féco-orale. La classe thérapeutique utilisée est les hydroxyquinoléines méthylées comme l'INTETRIX®, à raison de 4 gélules par jour en 2 prises pendant 10 jours.
- Pour l'amibiase intestinale en phase aiguë, ce sont des amoebicides diffusibles qui sont utilisés. Les 5-nitro-imidazolés sont utilisés per os en première intention : FLAGYL®, 1,5 g/j en 3 prises pendant 10 jours, FLAGENTYL® 1,5 g/j en une prise pendant 5 jours ou SECNOL® 2 g en prise unique. En cas de complication, ils peuvent être administrés en injectable pour augmenter leur efficacité.



- En cas d'amibiase viscérale, la prise seule de 5-nitro-imidazolés pendant 5 à 10 jours permet une guérison dans 50% des cas. Une ponction de l'abcès peut être envisagée si le patient est dans un état grave. Il convient de poursuivre le traitement par une cure d'amoebicide de contact (Intétrix 10 à 20 jours) pour éliminer les kystes présents dans l'intestin. Cela permet de diminuer le risque de rechute mais aussi la dissémination de kystes contaminants dans la nature.

De nombreuses études concernant la recherche d'un vaccin pour prévenir l'amibiase ont été menées. A ce jour, il n'y a pas de résultats qui tendent vers la découverte d'un vaccin efficace dans les prochaines années.

## 5 La prophylaxie

Etant donné qu'il n'y a pas d'hôte intermédiaire dans le cycle du parasite, et que l'homme est le seul réservoir du parasite, il est difficile de penser à une éradication de la maladie. Cependant il est possible de limiter sa propagation au niveau général :

- en dépistant et traitant les porteurs sains qui disséminent des kystes
- en mettant à disposition de la population des latrines pour une meilleure gestion des déchets humains
- en facilitant l'accès à l'eau potable
- en faisant des campagnes d'éducation de la population concernant l'hygiène des mains, de la nourriture et de l'eau
- en contrôlant l'épandage de matières fécales humaines pour l'agriculture. Cette pratique est interdite mais pas toujours respectée.

L'éducation de la population est un enjeu important car de simples mesures d'hygiène pourraient permettre de diminuer le nombre d'infections pour cette maladie qui cause jusqu'à 100 000 décès par an.

Au niveau individuel, on préconise de boire de l'eau bouillie, traitée ou en bouteille, ainsi que de nettoyer correctement ses crudités.

La mortalité de cette maladie est surprenante quand on sait que le traitement est très efficace et bien toléré. Étant donné que les zones d'endémies correspondent aux pays en voie de développement, l'accès aux médicaments est freiné par la pauvreté. Il faudrait améliorer le système de distribution de ces médicaments pour sauver des milliers de vie.

*Deuxième partie : matériels et  
méthodes*

Les trousse commerciales ont été gracieusement mises à disposition par la société Bordier Affinity Products.

## 1 Le matériel biologique

### 1.1 Antigène

Une souche provenant d'une culture axénique d'*E. histolytica* a été utilisée (34). L'antigène a été obtenu à partir de trophozoïtes cultivés avec 10% de sérum de veau fœtal.

Les trophozoïtes ont été récoltés puis centrifugés. Ils ont subi 5 cycles de congélation-décongélation avec de la neige carbonique. Après centrifugation d'une heure à 9000 tours par minute, le surnageant est récupéré puis conservé à -20°C.

L'antigène est donc une solution composée de protéines, de sucres et de tous les composants cellulaires solubles contenus dans ce surnageant.

### 1.2 Sérums de contrôles

Le sérum contrôle positif est un pool de trois sérums de lapins immunisés par la solution antigénique. Une société privée a procédé aux immunisations et aux sacrifices des lapins.

Le sérum contrôle négatif est un pool de sérums de lapins d'élevage destinés à la boucherie.

Le sérum seuil (ou faible positif) est un mélange de sérums positifs et de négatifs dans des proportions qui sont déterminées expérimentalement sur une petite population de patients sains et malades. Il est fabriqué de manière à réagir avec l'antigène pour donner une densité optique (DO) qui va permettre la discrimination des sérums positifs et négatifs. On considère

que les échantillons dont les valeurs de DO corrigées sont supérieures à la valeur du témoin seuil sont positifs et inversement.

Ils sont conservés à 4°C avec 0.02% d'azide de sodium et 0.02% de tiomersal.

### **1.3 Sérums sélectionnés**

Les sérums de 269 personnes ont été sélectionnés pour cette étude. Le critère de sélection des sérums au CHU de Grenoble, est une demande de recherche d'anticorps spécifiques d'*E. histolytica* dans le sérum. Les techniques utilisées au CHU sont l'IFI et le latex. Les sérums sont groupés en fonction de leurs résultats en IFI. Voici la liste des sérums sélectionnés pour l'étude :

- Positifs IFI : 63
- Négatifs IFI : 67
- Autres parasitoses : 40
- Donneurs de sang : 99

Les positifs IFI sont tous les sérums conservés dans la sérothèque du CHU de Grenoble depuis 15 ans. On peut donc estimer que le diagnostic d'amibiase viscérale concerne entre 4 et 5 patients par an à l'hôpital de Grenoble.

Les négatifs IFI sont tous les patients ayant une sérologie négative en 2011 au CHU de Grenoble. Toutes ces personnes ont été suspectées d'amibiase sur des points d'appels cliniques et biologiques. Cette population est considérée comme moins saine que la population de donneurs de sang car ces personnes sont atteintes d'autres maladies. L'analyse des dossiers de ces patients sera très instructive car on pourra observer quelles maladies possèdent des signes d'appels proches de ceux de l'amibiase. Il sera ensuite intéressant de savoir si ces maladies causent des réactions croisées avec le test ELISA amibe.

Le groupe des autres parasitoses est composé de patients dont la sérologie est positive pour une autre maladie parasitaire (tableau IV). Ce groupe permettra de déceler d'éventuelles réactions croisées.

<b>Affections parasitaires</b>	<b>Nombre de sérums testés</b>
Anguillulose	3
Bilharziose	10
Echinococcose alvéolaire	1
Filariose	8
Hydatidose	8
Leishmaniose	2
Paludisme	6
Toxocarose	2

**Tableau IV** : Liste des sérums testés avec la trousse ELISA amibe positifs en sérologie pour d'autres parasitoses

Les sérums des donneurs de sang proviennent du Centre de Transfusion Sanguine (CTS) de Genève (99 sérums). Cette population correspond aux personnes non malades. Elles ne manifestent pas les signes d'appels cliniques ou biologiques qui font suspecter une amibiase.

#### **1.4 Conjugué**

Le conjugué utilisé est la protéine A couplée avec la phosphatase alcaline (PA) (42). Il est conservé à 4°C dans une solution de glycérol.

Le substrat utilisé est le para-nitro phényle phosphate (PNPP). Il se présente sous forme de comprimés conservés à 4°C. Il est utilisé dissous dans une solution à pH 9,7 pour une concentration finale de 2 mg/ml.

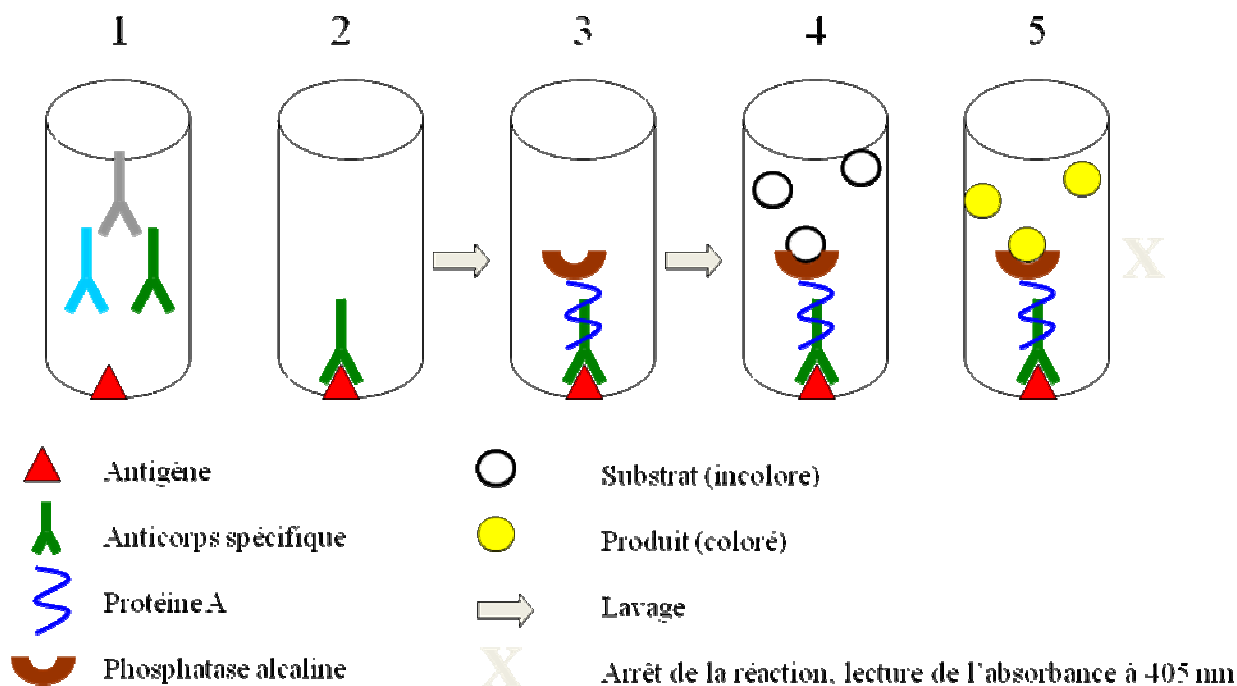
## 2 La méthode ELISA

### 2.1 Principe

La composition exacte de la trousse peut être consultée dans la notice technique du produit (annexe 2). Une plaque contenant 96 micropuits sensibilisés avec l'antigène, est fournie dans chaque trousse. Le schéma de la méthode ELISA utilisée dans les produits de la gamme BAP est retrouvé dans la figure 7.

Lorsque le sérum est mis en contact avec l'antigène, les anticorps spécifiques de cet antigène vont s'y lier. Un premier lavage va permettre d'éliminer les anticorps non spécifiques. Ensuite, une solution de conjugué est dispensée dans les puits. Il est composé de protéine A, qui possède la propriété de se fixer sur les parties constantes des immunoglobulines de type G, qu'elles soient d'origine humaine ou lapine. Cette protéine est couplée à une enzyme, la phosphatase alcaline. En présence d'un substrat incolore, le pNPP, elle donne un produit coloré en jaune. Après un second lavage pour éliminer le conjugué non fixé, une solution de pNPP est dispensée dans les puits. On pourra observer une coloration jaune dont l'intensité sera proportionnelle à la quantité de conjugué présent dans le puits et donc, indirectement proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques qui se sont fixés à l'antigène.

La réaction est arrêtée avec une solution de pH très alcalin pour inhiber la PA. On peut ensuite mesurer la densité optique à 405 nm pour quantifier l'intensité de la coloration. C'est donc une technique quantitative.



**Figure 7** : Méthode ELISA utilisée dans les produits de la gamme Bordier Affinity Products

## 2.2 Protocole

Le protocole décrit dans la notice technique du produit (annexe 2) est respecté.

### Etape 1 : **Blocage**

Les puits sont remplis avec 250µL de solution TBS-Tween et incubés 15 minutes à température ambiante.

### Etape 2 : **Incubation des sérums**

Une fois le TBS-Tween éliminé, les puits sont remplis avec 100µL de sérum dilué au 200<sup>ème</sup> dans du TBS-Tween. Le premier puits ne contient que du TBS-Tween pour mesurer le blanc. Trois témoins (négatif, seuil et positif) sont inclus dans chaque série et dilués au 200<sup>ème</sup> avec du TBS-Tween. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes puis lavée 3 fois avec la solution de lavage.



### Etape 3 : Incubation du conjugué

Les puits sont remplis avec 100µL de conjugué composé de protéine A couplée à la phosphatase alcaline diluée dans du TBS-Tween. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes puis lavée 3 fois avec la solution de lavage.

### Etape 4 : Incubation avec le substrat

Les puits sont remplis avec 100µL de substrat (pNPP) dilué dans un tampon NaHCO<sub>3</sub>. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes. Puis la réaction est arrêtée avec 100µL de solution de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à pH 13,5.

### Etape 5 : Mesure de la densité optique (DO) à 405nm

La valeur de la DO du blanc est soustraite de toutes les valeurs des DO lues. On considère que les échantillons dont les valeurs de DO corrigées sont supérieures à la valeur du témoin seuil sont positifs et inversement.

Pour chaque essai, les sérums témoins sont testés en duplicat. Un échantillon est considéré comme positif si sa DO est supérieure à celle du seuil de son essai. En effet, il y a une variation de la valeur des DO des sérums contrôles entre les essais. Elles sont dues aux variations de température et de durées d'incubation et aux erreurs de pipetage.

Chaque sérum est testé en duplicat et avec les deux lots différents. Les résultats seront exprimés en calculant la moyenne sur ces 4 essais.

## 3 L'immunofluorescence indirecte

Le test Amoeba-Spot IF Biomérieux® (43) est utilisé en routine au CHU de Grenoble pour la sérologie amibe. Il s'agit d'une réaction immunologique en deux étapes (33) :

- Incubation du sérum avec un antigène *E. histolytica* obtenu à partir de cultures axéniques inactivées et fixées sur lames (34). Les anticorps spécifiques s'y fixent, un lavage élimine les éléments non spécifiques.

- La révélation se fait par un conjugué anti-immunoglobuline humaine couplée avec de la fluorescéine. La lecture est ensuite effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Le mode opératoire décrit dans la notice technique est respecté (35). Les échantillons sont dilués au 1/50<sup>ème</sup> puis successivement de 2 en 2 à partir de cette première dilution.

La dilution au 50<sup>ème</sup> correspond au seuil de positivité et celle au 100<sup>ème</sup> au seuil de spécificité. Une réaction positive pour une dilution inférieure ou égale à 50 exclut la maladie. Si une fluorescence est observée pour une dilution supérieure ou égale à 100, alors le patient est suspect d'amibiase viscérale (36).

Les sérums positifs sélectionnés pour l'étude ont un résultat positif pour une dilution supérieure ou égale à 100, les négatifs pour une dilution inférieure ou égale à 50.

## 4 L'agglutination sur particule de latex

Le test Bichro-latex amibe Fumouze® est utilisé au CHU de Grenoble en association de l'IFI pour la sérologie amibe. C'est un test d'agglutination au latex sur lame (37).

Le réactif latex de couleur marron, est constitué de particules de latex colorées en rouge en suspension dans un contre colorant vert. Ces particules sont sensibilisées par l'antigène total mixte d'*E. histolytica* (34). La présence d'anticorps anti amibiens sériques, entraîne l'apparition d'agglutinats colorés en rouge se répartissant progressivement à la périphérie pour former un lissé rouge autour d'une plage centrale verte. En l'absence d'anticorps spécifiques, la suspension reste homogène et marron (38).

## 5 Les paramètres évalués

Les patients seront groupés en fonction du diagnostic clinique et du résultat du test selon le tableau V.

	Maladie présente	Maladie absente
Test positif	A Vrai positif	B Faux positif
Test négatif	C Faux négatif	D Vrai négatif

**Tableau V** : Répartition des patients

La sensibilité (Se) est la probabilité que le test soit positif chez les individus atteints par la maladie :  $Se = A/(A+C)$

La spécificité (Sp) est la probabilité que le test soit négatif chez les individus non atteints par la maladie :  $Sp = D/(B+D)$

La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité d'être malade quand le test est positif :  $VPP = A/(A+B)$

La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité de ne pas être malade quand le test est négatif :  $VPN = D/(D+C)$

L'efficacité (Eff) est la probabilité d'identifier correctement un patient comme étant malade ou non malade :  $(A+D)/(A+B+C+D)$

Après consultation des dossiers, les 269 patients testés pour l'amibiase qui sont inclus dans cette étude sont classés en 5 groupes :

- Patients atteints d'amibiase viscérale : 52 individus : groupe A
- Patients atteints d'amibiase intestinale : 7 individus : groupe B

- Patients non atteints d'amibiases : 71 individus : groupe C
- Patients atteints d'autres parasitoses : 40 individus : groupe D
- Donneurs de sang : 99 individus : groupe E

Nous disposons de plusieurs populations différentes de malades et de non malades. Les formules données ci-dessus sont applicables à une population de malades et une de non malades. On pourra donc différencier les performances comme suit :

- Groupe A versus groupe C
- Groupe A versus groupe D
- Groupe A versus groupe E

Le groupe B ne comptant pas assez d'individus, nous donnerons uniquement la sensibilité.

On dispose des résultats sérologiques (IFI et latex) pour les patients des groupes A, B et C. Les performances de ces techniques seront comparées avec celles de L'ELISA.

Les dossiers des patients discordants (faux positifs et faux négatifs) seront étudiés en détail. Des éléments qui pourraient expliquer ces résultats seront recherchés (réactions croisées, amibes non pathogènes dans les selles...).

Il faut noter que la spécificité calculée avec le groupe C sera plus pertinente que celle calculée avec le groupe E car l'analyse sera prescrite pour ces patients. Les donneurs de sang n'ont aucune raison d'être testés.

Pour les patients des groupes A et B, les données suivantes seront analysées :

- L'âge
- Le sexe
- La notion de voyage

- Les symptômes à l'hospitalisation
- La prise en charge
- Le traitement
- Les niveaux des marqueurs de l'inflammation
- Le bilan hépatique
- L'examen microscopique des selles
- Les autres sérologies prescrites

Les reproductibilités inter et intra lots seront évaluées statistiquement par une analyse de Bland-Altman. Cette analyse se base sur la différence des DO d'un même échantillon testé deux fois. A partir des différences des DO de tous les échantillons nous calculerons :

- La moyenne des différences (M)
- L'écart type des différences (SD)
- L'intervalle de confiance à 95% ( $M \pm 1.96 \times SD$ )
- Le nombre d'échantillons dont la différence sur deux essais est hors de cet intervalle

## *Troisième partie : résultats*

# 1 La sérologie amibiase

## 1.1 L'ELISA

Les résultats obtenus par ELISA pour les 269 échantillons testés sont listés dans le tableau VI.

Groupe testé	Nombre d'individus	Nombre (%) de positifs	Nombre (%) de négatifs
Amibiase viscérale (A)	52	52 (100)	0 (0)
Amibiase intestinale (B)	7	7 (100)	0 (0)
Non amibiens (C)	71	8 (11.3)	63 (88.7)
Autres parasitoses (D)	40	8 (20)	32 (80)
Donneurs de sang (E)	99	4 (4)	95 (96)

**Tableau VI** : Résultats obtenus en ELISA pour la détection d'anticorps anti *E. histolytica* pour les 269 patients

Sur les 99 sérums du groupe E (donneurs de sang), 4 (4%) donnent une réaction positive au test (tableau VI). Les DO des ces quatre échantillons ne sont pas très éloignées de la DO du seuil, respectivement 0.858, 0.588, 0.483 et 0.480 pour un seuil à 0.450. On peut estimer qu'un individu sain a une faible probabilité de réagir avec ce test. Cet antigène possède une bonne spécificité. Elle est calculée à 96% pour cette population.

Dans le groupe A (amibiase viscérale), une réaction positive est obtenue pour 100% des patients. On obtient une sensibilité de 100% avec l'ELISA.

La totalité des individus du groupe B (amibiase intestinale) donne un résultat positif en ELISA. On obtient une sensibilité 100% en ELISA pour le diagnostic de l'amibiase intestinale.

Parmi les 71 patients du groupe C (non amibiens), 63 (88,7%) sont négatifs en ELISA. Il y a donc 8 faux positifs soit une spécificité de 88,7%.

Le dossier clinique de ces patients est étudié pour déceler d'éventuelles réactions croisées (tableau VII). On note que pour deux de ces patients, leurs pathologies affectent le foie tout comme l'amibiase viscérale. L'une des étiologies est l'hydatidose, une helminthiase provoquée par un tænia (*Echinococcus granulosus*) responsable de kystes le plus souvent hépatiques. L'autre patient est atteint d'hépatite B due à un virus (VHB) qui provoque une inflammation du foie.

Pour 2 autres patients faux positifs en ELISA, on retrouve une giardiase et un accès palustre à *Plasmodium falciparum*. Ces deux dernières pathologies sont causées par des protozoaires tout comme les amibes. Il pourrait y avoir des similarités structurales et antigéniques avec *E. histolytica*. Concernant les autres patients, le diagnostic clinique n'est pas formel mais l'amibiase a été écartée avec certitude.

Une cause de résultats faussement positifs peut être une réaction croisée avec une amibe non pathogène. On observe que le patient atteint de giardiase est également porteur de kystes d'*Entamoeba hartmanni*. Mais aucun des autres patients n'est porteur d'amibes mineures. Aucune cause n'a pu être trouvée pour expliquer ces résultats.



Identifiant patient	Diagnostic clinique	Examen microscopique des selles
1	Hépatite B	N
6	Hydatidose	N
8	?	N
9	Giardiase	Kystes d' <i>Entamoeba hartmanii</i>
10	?	N
11	?	N
14	?	N
15	Accès palustre	N

**Tableau VII** : Contexte clinique des patients faux positifs pour la recherche d'anticorps spécifique anti *E. histolytica*

Parmi les 40 patients du groupe D (autres parasitoses), une réaction positive est obtenue pour 8 (20%) individus (tableau VI). La spécificité obtenue avec cette population est de 80 %. On retrouve avec intérêt une réaction positive dans un cas sur deux de leishmaniose et de paludisme (tableau VIII). Cette information va dans le sens de l'hypothèse émise ci-dessus avec le groupe C. On retrouve aussi d'autres pathologies causées par des helminthes (comme l'hydatidose citée ci-dessus également) comme l'anguillulose (2 cas sur 3) et la filariose (1 cas sur 4).

La différence entre une réaction positive spécifique et une réaction croisée se fera en fonction du contexte clinique et épidémiologique, de la présence d'un abcès à l'imagerie et de l'altération du bilan hépatique.

<b>Affections parasitaires</b>	<b>Nombre de sérums testés</b>	<b>Nombre de sérums positifs avec l'ELISA <i>E. histolytica</i></b>
Anguillulose	3	<b>2</b>
Bilharziose	10	0
Echinococcose alvéolaire	1	0
Filariose	8	<b>2</b>
Hydatidose	8	0
Leishmaniose	2	<b>1</b>
Paludisme	6	<b>3</b>
Toxocarose	2	0

**Tableau VIII** : Réactions croisées avec le test ELISA *Entamoeba histolytica*

Les performances obtenues avec les 262 patients des groupes A, C, D et E pour le diagnostic de l'amibiase viscérale par ELISA sont regroupées dans le tableau IX.

Le test est plus spécifique si on sélectionne comme population de non malade des donneurs de sang (96%) plutôt que les non amibiens (88.7%).

L'efficacité du test est meilleure avec la population des donneurs de sang (97.4%) par rapport à celle des patients non amibiens (93.5 et 91.3%).

<b>Groupe de patients non malades</b>	<b>Spécificité (%)</b>	<b>Sensibilité (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>Efficacité (%)</b>
C	88.7	100	86.7	100	93.5
D	80	100	86.7	100	91.3
E	96	100	92.9	100	97.4

**Tableau IX** : Performances du test ELISA pour le diagnostic sérologique de l'amibiase viscérale

## 1.2 L'IFI

Les résultats obtenus par IFI pour les 130 échantillons testés sont listés dans le tableau X.

Groupe testé	Nombre d'individus	Nombre (%) de positifs	Nombre (%) de négatifs
Amibiase viscérale (A)	52	52 (100)	0 (0)
Amibiase intestinale (B)	7	5 (71.4)	2 (28.6)
Non amibiens (C)	71	6 (8.5)	65 (91.5)

**Tableau X** : Résultats obtenus en IFI pour la détection d'anticorps anti *E. histolytica* pour 130 patients (groupes A, B et C)

On obtient une sensibilité de 100% pour le diagnostic de l'amibiase viscérale, et de 71.4% pour le diagnostic de l'amibiase intestinale. La spécificité obtenue est de 91.5%.

Parmi les 6 patients faux positifs, 3 sont concordants avec l'ELISA (patients 1,6 et 8 tableau VII).

## 1.3 Le latex

Les résultats obtenus avec le test au latex pour les 130 échantillons sont listés dans le tableau XI.

Groupe testé	Nombre d'individus	Nombre (%) de positifs	Nombre (%) de négatifs
Amibiase viscérale (A)	52	50 (96.1)	2 (3.9)
Amibiase intestinale (B)	7	4 (57.1)	3 (42.9)
Non amibiens (C)	71	5 (7)	66 (93)

**Tableau XI** : Résultats obtenus par test au latex pour la détection d'anticorps anti *E. histolytica* pour 130 patients (groupes A, B et C)

On obtient une sensibilité de 96.1% pour le diagnostic de l'amibiase viscérale, et de 57.1% pour le diagnostic de l'amibiase intestinale. La spécificité obtenue est de 93%.

Parmi les 5 patients faux positifs, il y en a un qui est concordant pour les trois techniques (patient 1 du tableau VII atteint d'hépatite B).

Concernant les échantillons discordants (faux positifs et faux négatifs), les valeurs sont souvent proches de celle du seuil (toutes techniques confondues). Il est donc très difficile d'analyser les résultats sérologiques de ce genre de patients. L'interprétation du résultat rendu pourra être : « résultat sans réelle valeur diagnostique, à confronter aux données cliniques et épidémiologiques et à compléter par une recherche d'amibes dans les selles. Ou encore, possible réaction croisée avec une amibiase non pathogène ».

#### **1.4 Bilan**

Les performances obtenues pour les 123 patients des groupes A et C pour le diagnostic de l'amibiase viscérale par les trois techniques sont regroupées dans le tableau XII.

L'IFI et l'ELISA possèdent les meilleures sensibilités (100%). Le latex possède la meilleure spécificité (93%) devant l'IFI (91.5%) et l'ELISA (88.7%).

L'IFI possède la meilleure efficacité (95.5%) devant le latex (94.3%) et l'ELISA (93.5%).

<b>Test</b>	<b>Spécificité (%)</b>	<b>Sensibilité (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>Efficacité (%)</b>
ELISA	88.7	100	86.7	100	93.5
IFI	91.5	100	89.7	100	95.1
Latex	93	96.1	91	97	94.3

**Tableau XII** : Performances des différents tests de diagnostic sérologique de l'amibiase viscérale

Les performances obtenues pour les 78 patients des groupes B et C pour le diagnostic de l'amibiase intestinale par les trois techniques sont regroupées dans le tableau XIII.

L'ELISA possède la meilleure sensibilité (100%) devant l'IFI (71.4%) et le latex (57.1%). Les spécificités sont sensiblement les mêmes.

L'efficacité est la même pour les trois techniques. Cela vient du fait que la population de patients atteints d'amibiase intestinale est trop faible par rapport à la population des non amibiens. Les formules statistiques sont biaisées.

<b>Test</b>	<b>Spécificité (%)</b>	<b>Sensibilité (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>	<b>Efficacité (%)</b>
ELISA	88.7	100	46.7	100	89.7
IFI	91.5	71.4	45.5	97	89.7
Latex	93	57.1	44.4	95.6	89.7

**Tableau XIII** : Performances des différents tests de diagnostic sérologique de l'amibiase intestinale

## 2 Les données épidémiologiques

Les patients testés lors de cette étude qui sont atteints d'amibiase viscérale ont en majorité entre 30 et 40 ans pour une moyenne de 40 ans (tableau XIV).

L'amibiase intestinale touche plutôt les individus à la fois jeunes (avant 40 ans) et ceux plus âgés (au-delà de 60 ans).

Ces résultats correspondent à ce qui est décrit dans la littérature (29). L'amibiase intestinale touche plus fréquemment les jeunes, et l'amibiase viscérale atteint les personnes aux alentours des 40 ans.

<b>Tranches d'âge</b>	<b>Amibiase viscérale</b>	<b>Amibiase intestinale</b>
< 20 ans	1	2
20-30 ans	10	1
30-40 ans	15	1
40-50 ans	12	0
50-60 ans	4	0
> 60 ans	8	3
Total	50	7

**Tableau XIV** : Tranches d'âge des patients atteints d'amibiases

On observe que l'amibiase viscérale touche plus fréquemment les hommes (sexe-ratio 5.5) que les femmes (tableau XV).

Cela correspond à ce qui est décrit dans la littérature (29), qui présente que 6 hommes sont atteints pour une femme, soit dans 83% des cas.

<b>Sexe</b>	<b>Amibiase viscérale</b>	<b>Amibiase intestinale</b>
Homme	44	5
Femme	8	2
Total	52	7

**Tableau XV** : Sexe des patients atteints d'amibiase

On retrouve une notion de voyage en zone endémique dans 96% des cas d'amibiase viscérale (tableau XVI). Ces résultats sont calculés sur 26 patients car cette information n'est pas toujours indiquée dans le dossier des patients.

<b>Zone géographique</b>	<b>Amibiase viscérale</b>	<b>Amibiase intestinale</b>
Afrique	18	1
Asie	4	2
Amérique du Sud	3	0
Pas de voyage	1	0
Total	26	3

**Tableau XVI** : Zones d'endémies fréquentées par les patients atteints d'amibiase

### 3 Les données cliniques

On note la présence d'un abcès amibien dans 100% des cas d'amibiase viscérale. A chaque fois, il a été observé une zone hypodense dans le foie à l'échographie abdominale, et l'abcès a été caractérisé dans la moitié des cas par un scanner abdominal et dans l'autre moitié par une tomodensitométrie abdominale.

Parmi les 52 patients ayant développé un abcès, 23 (44%) ont subi une ponction. Dans tous les cas le pus drainé avait une couleur chocolat et était très visqueux. L'examen microscopique de ces pus n'a jamais permis de mettre en évidence des amibes.

Les symptômes des patients sont regroupés dans le tableau XVII. Pour l'amibiase viscérale, les symptômes les plus fréquemment retrouvés sont une douleur à l'hypochondre droit et de la fièvre. Dans 50% des cas il y a des diarrhées, ce résultat est intrigant car il est décrit

dans la littérature (4) qu'il n'y a généralement pas de diarrhées quand la maladie est viscérale. De plus, il est décrit que l'hépatomégalie est un des symptômes les plus fréquemment retrouvés alors qu'on ne le retrouve que dans 16% des cas dans cette population.

Concernant l'amibiase intestinale, il est normal de retrouver une diarrhée ans 100% des cas, mais il n'y a normalement pas de fièvre, ce qui n'est pas le cas ici.

<b>Symptômes</b>	<b>Amibiase viscérale</b>	<b>Amibiase intestinale</b>
Douleur hypochondre	87,5%	60%
Fièvre	84%	80%
Diarrhées	50%	100%
Asthénie	25%	40%
Anorexie	19%	40%
Hépatomégalie	16%	0%
Total (patients)	32	5

**Tableau XVII** : Symptômes des patients atteints d'amibiase

Tous les patients atteints d'amibiase viscérale ont été traités par un amoebicide diffusible, le Flagyl®. Pour les patients dont la maladie est survenue après 2005, le traitement a été complété par une cure d'Intérix®, un amoebicide de contact. Dans tous les cas, l'état du patient s'est amélioré en 48 heures. Seulement 3 patients ont fait une rechute dans les 6 mois et ils ont de nouveau été traités efficacement. Des contrôles échographiques ont été réalisés pour la plupart des patients. Trois mois après l'hospitalisation, l'abcès était toujours détectable mais avait diminué de taille. En effet il est retrouvé dans la littérature qu'un abcès amibien reste détectable à l'échographie de 6 mois à un an (6).



## 4 Les données biologiques

L'infection viscérale provoque une importante réaction inflammatoire. Il est possible de détecter cette réaction par le dosage de la CRP sérique et la numération des leucocytes.

La CRP est augmentée pour 31 des 39 patients atteints d'amibiase viscérale, soit dans 80% des cas. La moyenne de la valeur de la CRP de ces patients est de 216 mg/l (normale entre 1 et 10 mg/l). La notion d'augmentation de la CRP, associée à des éléments épidémiologiques et cliniques concordants est un bon marqueur pronostic de l'amibiase viscérale. Dans le cas de l'amibiase intestinale, seulement 3 (43%) des 7 patients ont une CRP augmentée.

Une hyperleucocytose est retrouvée dans 59% des cas d'amibiase viscérale (groupe A), alors qu'elle est toujours normale dans l'amibiase intestinale.

Le bilan hépatique est souvent perturbé en cas d'abcès du foie, cela traduit une cytolysé hépatique. Les marqueurs qui permettent d'apprécier la santé du foie sont les ALAT, les ASAT, la PA et la gammaGT. On observe que tous ces marqueurs sont augmentés dans plus d'un cas d'amibiase viscérale sur deux (tableau XVIII). Ils ont en moyenne plus de deux fois les valeurs normales maximales.

	ASAT	ALAT	PA	gam- maGT
Patients dont ces marqueurs sont augmentés (%)	51	54	56,5	61
Moyenne pour ces patients (UI/l)	84	89	188	166
Valeurs normales (UI/l)	10-42	8-48	39-83	12-42

**Tableau XVIII** : Etude des marqueurs de cytolysé hépatique des patients atteints d'amibiase viscérale

Lorsque ces patients arrivent au CHU, la sérologie amibiase n'est pas la seule qui est demandée. La fièvre, dans le cadre d'un retour de voyage en zone d'endémie, fait suspecter, entre autre, un accès palustre. Or, les patients atteints d'amibiase correspondent pour la plupart à ce profil. Nous allons donc étudier quelles sont les autres parasitoses qui ont été recherchées chez les patients atteints d'amibiase viscérale (tableau XIX).

On observe que les signes cliniques et les données épidémiologiques des patients atteints d'amibiase viscérale font suspecter dans l'ordre décroissant : une échinococcose, un paludisme, une bilharziose et une anguillulose.

Pour l'amibiase intestinale, les mêmes étiologies sont recherchées sauf l'échinococcose. Cela est compréhensible car c'est une pathologie qui touche les viscères.

<b>Parasitose (%)</b>	<b>Amibiase viscérale</b>	<b>Amibiase intestinale</b>
Echinococcose	44	0
Paludisme	34	28
Cysticerose	8	14
Trichinellose	8	0
Distomatose	6	0
Toxocarose	8	0
Anguillulose	19	14
Filariose	6	0
Bilharziose	30	43
Total	52	7

**Tableau XIX** : Pourcentage des autres sérologies parasitaires demandées  
chez les patients atteints d'amibiase

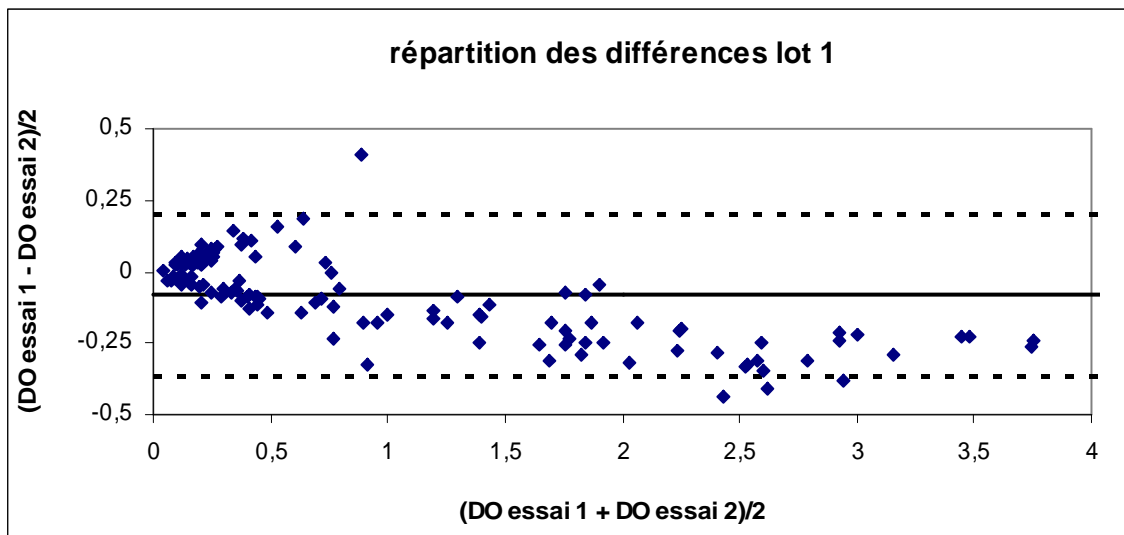
L'examen microscopique des selles est réalisé en cas de troubles digestifs, de douleurs abdominales ou bien, lorsque la sérologie amibiase est positive. C'est un argument important pour le diagnostic de l'amibiase même si les performances de cet examen ne sont pas idéales. Il est retrouvé des kystes ou des formes végétatives du complexe *E. histolytica/dispar* pour 7 patients du groupe A (13.5%), 5 patients du groupe B (71,4%). On observe que l'on retrouve plus fréquemment des amibes dans les selles des patients atteints d'amibiase intestinale, ces données correspondent aux informations de la littérature (6).

## 5 La reproductibilité

Les 4 essais effectués sont comparés entre eux. On obtient ainsi 4 comparaisons inter-lots et 2 comparaisons intra-lot.

### 5.1 *Intra-lot*

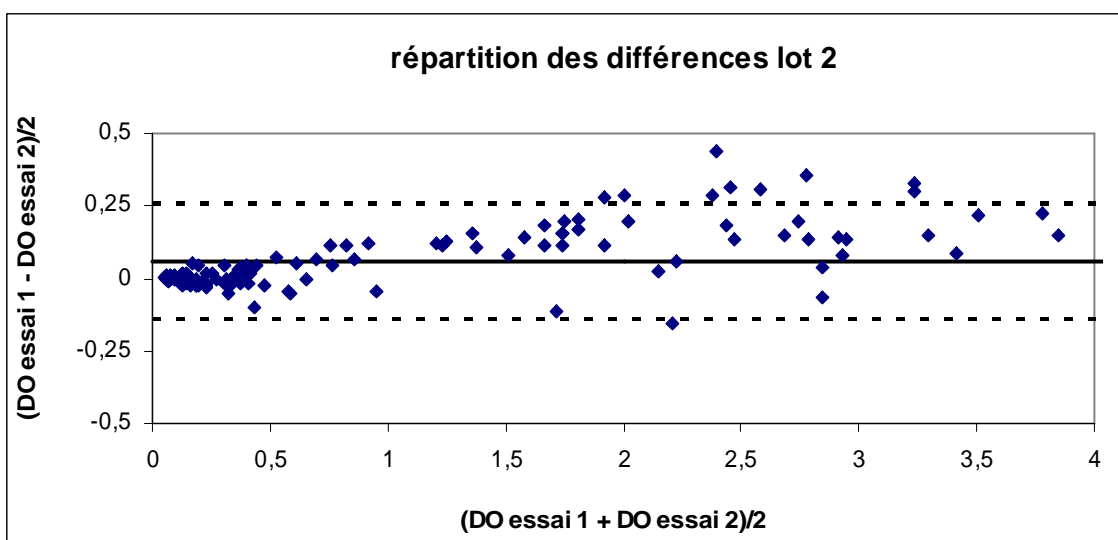
La moyenne des différences des deux essais du lot 1 est un peu en dessous de zéro (figure 7). On en conclut que les DO obtenues durant l'essai 2 sont en moyenne plus fortes que durant l'essai 1. L'écart type calculé est de 0.145, cela montre que les différences ne sont pas trop dispersées. On observe d'ailleurs qu'il y a seulement 4 points qui sont en dehors de l'intervalle de confiance à 95%. On peut considérer que ces deux essais sont reproductibles.



**Figure 8** : Différences des DO des essais 1 et 2 du lot 1 pour 130 patients testés avec le test ELISA *E. histolytica*. – moyenne des différences. --- intervalle de confiance à 95%

La moyenne des différences des deux essais du lot 2 est un peu au-dessus de 0 (figure 8). Cette fois ce sont les DO obtenues durant l'essai 1 qui sont en moyenne plus fortes que durant l'essai 2. Ces variations sont expliquées par les durées d'incubation qui peuvent varier de quelques minutes.

On observe en revanche qu'il y a 10 points qui sont en dehors de l'intervalle de confiance à 95%. L'écart type calculé est de 0.103, ce qui est plus faible que pour le lot 1. Il faut noter que les valeurs concernées sont les échantillons positifs. Même s'il existe une variation, ils sont toujours bien au-dessus du seuil.



**Figure 9** : Différences des DO des essais 1 et 2 du lot 2 pour 130 patients testés avec le test ELISA *E. histolytica*. – moyenne des différences. - - - intervalle de confiance à 95%

## 5.2 Inter-lots

Les moyennes des différences sont proches de 0 (tableau XX). L'écart type de la première colonne est de 0,170 mais les autres sont situés autour de 0,100. Ces valeurs nous permettent de dire qu'il n'y a pas de valeurs de différences trop extrêmes. Il y a en moyenne 8 points qui sont en dehors de l'intervalle de confiance à 95%. Il y a une moins bonne reproductibilité inter qu'intra-lot, mais elle reste acceptable.

	Lot 1 essai 1 vs lot 2 essai 1	Lot 1 essai 1 vs lot 2 essai 2	Lot 1 essai 2 vs lot 2 essai 1	Lot 1 essai 2 vs lot 2 essai 2
Moyenne	-0,076	0,018	0,006	0,063
Ecart-type	0,170	0,108	0,075	0,088
Nombre de points en dehors de l'intervalle de confiance à 5%	7	10	9	7

**Tableau XX** : Différences des DO de 4 essais pour 130 patients testés avec le test ELISA *E. histolytica*

## *Quatrième partie : discussion*

L'amibiase viscérale est une parasitose liée au péril fécal humain, due à un protozoaire, *Entamoeba histolytica*. Elle se manifeste par un abcès hépatique, une hépatomégalie, des douleurs abdominales et de la fièvre. Elle peut engager le pronostic vital dans certains cas compliqués. Sa prévalence est très élevée en milieu tropical en raison principalement des mauvaises conditions d'hygiène fécale. Dans les pays où la prévalence est faible (Europe, Amérique du nord, Australie), les personnes concernées par la maladie sont les immigrants, les voyageurs de retour de zone d'endémie et les homosexuels.

Au niveau mondial, 500 millions d'individus sont porteurs de kystes du complexe *E. histolytica/E. dispar* (2-5). Parmi eux, 10% hébergent des kystes d'*E. histolytica*. Dans 1% des cas (500 000 personnes), il y a une atteinte hépatique. Cette manifestation est responsable de la mort de 100 000 personnes par an.

De part son mode de transmission oro-fécale, les porteurs de kystes asymptomatiques représentent le réservoir du parasite. Le dépistage et le traitement de ces individus sont donc des enjeux de santé publique dans les pays à forte endémicité.

Seule la mise en évidence de la forme hématophage d'*E. histolytica* dans les selles par microscopie permet d'affirmer le diagnostic. Cependant, cet examen est fréquemment mis en défaut, c'est pourquoi les techniques sérologiques ont un rôle très important dans le diagnostic de l'amibiase viscérale. Des tests commerciaux sont disponibles pour l'IFI, l'ELISA, l'HAI et l'agglutination de particules de latex. Ces tests sont sensibles et spécifiques (47, 48). Ils sont utilisés aussi bien dans les zones d'endémies que dans les pays à faible prévalence.

Le développement de ce nouveau kit ELISA par la Société Bordier présente l'intérêt de compléter la gamme des kits de sérologie parasitaire présents sur le marché. Il existe 5 autres tests de détection d'anticorps spécifiques anti *E. histolytica* commercialisés dans le monde (annexe 1). Les performances du réactif évalué dans cette étude sont comparées à celles de ces cinq autres tests.

La sensibilité obtenue est de 100% en ELISA (tableau XII), celle des tests commerciaux est comprise entre 90 et 100% pour une moyenne de 95%. Ce nouveau réactif est donc plus sensible que la plupart des tests déjà présents sur le marché.

Avec la population des donneurs de sang, la spécificité est de 96%. Celle des tests commerciaux est de 95% en moyenne. Les performances sont équivalentes à celles des kits actuellement présents sur le marché.

Avec la population de non amibiens du CHU de Grenoble (71 patients), la spécificité est de 88,7%. Elle est moins bonne que celle calculée avec les donneurs de sang. Cela est expliqué par le fait que ce sont des patients qui sont malades. La plupart ont des infections, ce qui provoque une augmentation des immunoglobulines sanguines. Il existe donc une probabilité plus forte que certains anticorps se fixent à l'antigène non spécifiquement. Il faut aussi noter que les cicatrices sérologiques sont retrouvées dans 45% des cas d'amibiase viscérale pendant plusieurs années après l'infection.

Les performances de l'IFI sont meilleures que celles de l'ELISA. Sa sensibilité est de 100% et sa spécificité de 93% (données conformes avec la notice du produit). L'ELISA n'est pas aussi spécifique que l'IFI mais elle possède les avantages suivants :

- Un résultat quantitatif
- Une lecture indépendante de l'opérateur
- Une méthode automatisable

J'ai pu observer moi-même que dans certains cas, il est difficile d'apprécier la fluorescence au microscope. Cette lecture, souvent délicate, nécessite l'interprétation de deux lecteurs entraînés.

C'est pourquoi, les résultats proches de la limite du seuil de spécificité sont difficiles à interpréter en IFI. En ELISA, c'est une DO qui est lue, il ne peut donc pas y avoir d'erreurs



d'appréciation. De plus, la présence d'un sérum seuil lors de chaque essai, traité dans les mêmes conditions que les échantillons, nous fournit une information qualitative.

L'IFI est une méthode contraignante, réservée à certains spécialistes. Pour la technique ELISA, l'automatisation peut être envisagée de par son format, commun aux autres kits de sérologie parasitaire de la gamme Bordier. Il est ainsi possible de tester plusieurs sérums vis-à-vis de différents parasites avec le même programme.

La VPP et la VPN sont des indicateurs qui aident à l'interprétation et à la validation des résultats d'un test. La VPP du test ELISA évalué est de 92.9% avec la population de CTS. C'est-à-dire que quand le résultat est positif, le patient a 92.9% de chance d'être porteur de la maladie. Cet indicateur est de 86.7% avec les patients du CHU. Cette valeur est assez faible, mais c'est le résultat d'un choix qui a été fait lors du développement et la mise au point du test. Le positionnement du seuil de positivité fait varier la VPP et la VPN. Dans ce test, le seuil est composé d'une faible quantité de sérum positif dilué dans du sérum négatif. Il a été choisi de diluer fortement le témoin positif pour que le seuil corresponde à une DO assez faible. C'est ce facteur qui explique le faible nombre de faux négatifs (zéro), et le fort nombre de faux positifs (huit). Ce choix entraîne également une diminution de la VPP et une augmentation de la VPN. On observe d'ailleurs que la VPN (100%) est beaucoup plus forte que la VPP (92.9%).

Ces résultats correspondent aux attentes des cliniciens. J'ai réalisé une interview de plusieurs cliniciens du service d'Infectiologie du CHU de Grenoble. Lorsqu'ils prescrivent une sérologie amibiase, c'est le plus souvent pour exclure cette maladie. C'est-à-dire qu'ils acceptent d'avoir de nombreux faux positifs car ils peuvent aisément les déceler grâce aux données épidémiologiques et cliniques. Autrement dit, quand ils reçoivent un résultat négatif, ils veulent être sûrs de pouvoir exclure l'amibiase pour mieux chercher une autre cause aux

symptômes. C'est la définition d'une forte VPN. Etant donné l'importance de la sérologie dans le diagnostic de l'amibiase viscérale, un résultat faux négatif peut avoir des conséquences néfastes pour le patient (traitement inefficace, examens inutiles).

Les 40 sérums testés pour les autres parasitoses ne représentent pas une population suffisante pour avoir des données statistiquement exploitables. Par ailleurs, il n'existe pas dans la littérature d'études sur les réactions croisées en sérologie amibienne. On a pu observer que certaines pathologies entraînent une réaction croisée avec ce test. L'hydatidose, l'anguillulose et la filariose sont des helminthiases qui sont connues pour provoquer fréquemment des réactions non spécifiques. La leishmaniose, le paludisme et la giardiase sont des parasitoses causées par des protozoaires. Dans une étude de 2005 sur la validation d'un test ELISA concurrent, ce sont les mêmes organismes qui ont entraîné des réactions croisées (32). Bien que ces protozoaires se soient séparés très tôt des amibes durant l'évolution, ils pourraient avoir gardé certains antigènes communs.

Ce fait peut poser problème car toutes ces pathologies ont les mêmes signes d'appels cliniques et épidémiologiques que l'amibiase. On a bien vu qu'une sérologie paludisme et hydatique sont également prescrites dans 40% des cas d'amibiase viscérale. Il faudra donc mentionner ce problème dans la notice du produit.

Il aurait été intéressant de tester des patients atteints d'abcès hépatiques à germes pyrogène du foie, de cancer du foie, de cirrhose et d'hépatites, en fait, de toutes les pathologies qui entraînent des symptômes hépatiques (douleurs de l'hypochondre droit, hépatomégalie, altération du bilan hépatique).

Lors de l'étude, nous avons trouvé une sensibilité pour ce test est de 100% pour le pour les patients atteints d'amibiase intestinale. Cela dit, une population de 7 patients n'est pas suffisante pour affirmer que ce test est pertinent aussi pour le diagnostic de cette maladie. De plus, les DO obtenues avec les sérums de ces patients sont proches de la valeur seuil rendant

l'interprétation difficile. Dans ce cas, l'examen microscopique des selles (positif dans 6 cas sur 7) et la détection des coproantigènes seront les plus appropriés.

Peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature, et la plupart d'entre elles remontent souvent à plusieurs dizaines d'années. Cependant, malgré tout, ces données restent d'actualité. J'ai pu observer que les symptômes des patients évalués correspondent à ceux qui sont décrits. Il en est de même pour les données épidémiologiques et biologiques.

La prise en charge de cette maladie est inégale selon les pays concernés (développés et en développement). Dans les pays où l'amibiase demeure endémique, l'accès aux tests diagnostiques et aux traitements reste difficile. C'est pourquoi de nombreux habitants succombent encore à cette maladie.

Son diagnostic délicat, nécessite des techniques sérologiques spécialisées et souvent onéreuses. Il est à espérer que dans un proche avenir, les pays concernés puissent avoir accès à ces outils diagnostiques fiables et robustes. Le test évalué au cours de ce travail peut s'inscrire dans ce contexte.

# *Conclusion*

THESE SOUTENUE PAR : Nicolas BEYLS

TITRE : DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASE VISCERALE A *ENTAMOEB*

*HISTOLYTICA* : VALIDATION D'UN NOUVEAU TEST ELISA AU CHU DE GRENOBLE

## CONCLUSION

L'amibiase viscérale à *Entamoeba histolytica* est une protozoose pouvant engager le pronostic vital. Sa prévalence est élevée en milieu tropical en raison principalement des mauvaises conditions d'hygiène fécale. Dans les pays tempérés, les patients concernés sont les immigrants et les touristes revenant des zones d'endémies. Elle se manifeste par un abcès, le plus souvent hépatique. Les symptômes sont des douleurs abdominales, de la fièvre et une hépatomégalie. Contrairement à l'amibiase intestinale, pour laquelle le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence d'amibes hématophages dans les selles, pour l'amibiase viscérale, l'examen direct des selles et du pus d'abcès est fréquemment négatif. Aussi, des techniques sérologiques ont été développées pour la mise en évidence d'anticorps spécifiques.

Le test évalué dans cette étude rétrospective est une technique immunoenzymatique, automatisable et quantitative, l'ELISA.

Cent soixante-dix sérums de patients sélectionnés au CHU de Grenoble appartenant à 4 groupes : amibiase viscérale (n=52), amibiase intestinale (n=7), non amibiens (n=71), autres parasitoses (n=40), et un cinquième groupe constitué par des donneurs de sang (n=99), ont été étudiés. Les performances de cette trousse ont été confrontées à celles des autres réactifs ELISA présents actuellement sur le marché international, et à celles des deux techniques sérologiques utilisées en routine au CHU de Grenoble : l'Amoeba-Spot IF Biomérieux® (immunofluorescence indirecte) et le Bichro-latex amibe Fumouze®.

Pour le diagnostic sérologique de l'amibiase viscérale, la sensibilité de ce test est de 100%, les spécificités respectives sont de 88.7% (groupe de patients non amibiens) et de 96% (groupe des donneurs de sang). Les tests commerciaux concurrents possèdent une sensibilité légèrement plus faible (95% en moyenne) et une spécificité équivalente (95% en moyenne chez les donneurs de sang). En pratique, les cliniciens confrontés à cette hypothèse diagnostique prescrivent une sérologie amibiase le plus souvent pour exclure cette infection. Or, la valeur prédictive négative (VPN) du test évalué est de 100%, ce qui correspond parfaitement aux attentes des praticiens.

En conclusion, ce test est tout aussi performant que ceux disponibles actuellement sur le marché. Son excellente VPN lui permettra de trouver toute sa place dans la stratégie diagnostique actuelle de l'amibiase viscérale.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 14/11/2011

LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT



LE PRESIDENT DU JURY

Claudine PINEL

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Pinel", written over a horizontal line.

## *Références bibliographiques*

- (1) STANLEY SL. Amoebiasis. *Lancet*. 2003, **361**, 1025-34.
- (2) RAVDIN JI. Amebiasis. *Clin Infect Dis*. 1995, **20**, 1453-1466.
- (3) HAQUE R, HUSTON CD, HUGHES M *et Coll*. Amebiasis. *N Engl JMed*. 2003, **348**, 1565-73.
- (4) REED SL. Amebiasis : an update. *Clin Infect Dis*. 1992, **14**, 385-93.
- (5) LEGER N, DANIS M. Amibes et amibiase. *Encycl Med Chir Maladies infectieuses*. Elsevier Paris 1995, 8-500-A-10, 14 p.
- (6) PARIS L., THELLIER M., FAUSSART A., DANIS M. Epidémiologie mondiale des maladies parasitaires. *La Revue du Praticien*. 2007, **57**,131-136.
- (7) PICOT S, AMBROISE-THOMAS P. Facteurs et conditions de pathogénicité d'*Entamoeba histolytica*. *Lett Infectiol*. 1994, **9**, 317-22.
- (8) RAVDIN JI. *Entamoeba histolytica* : from adherence to enteropathy. *J Infect Dis*. 1989, **159**, 420-429.
- (9) ESPINOSA-CANTELLANO M, MARTINEZ-PALOMO A. Pathogenesis of intestinal amebiasis : from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev*. 2000, **13**, 318-331.
- (10) FAUSSART A., DANIS M. Parasitoses digestives. *La Revue du Praticien*. 2008, **58**, 79-85.
- (11) DENEÉ J.M. L'amibiase intestinale et hépatique. *Gastroenterol. Clin. Biol*. 1995, 19, B 91-B 98.
- (12) MERENS A., RAPP C., FABRE R., CAVALLO J.D. Intérêt et limites du diagnostic au laboratoire de l'amibiase. *Med. Trop*. 2005, **65**, 167-175.
- (13) SHEEHAN DJ, BOTTONE EJ, PAVLITICH K, HEALTH MM. *Entamoeba histolytica* : efficacy of microscopic, cultural and serological techniques for laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1979, **10**,128-133.
- (14) MAC MILLAN A, MAC NEILLAGE GJ. Comparison of the sensitivity of microscopy and culture in the laboratory diagnosis of intestinal protozoal infection. *J Clin Pathol*. 1984, **37**, 809-811.
- (15) PETRI WA, SINGH U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis*. 1999, **29**, 1117-25.
- (16) YAU YCW, CRANDALL I, KAIN KC. Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserved stools samples. *J Clin Microbiol*. 2001, **39**, 716-719.
- (17) HAQUE R, ALI IK, AKTHER S, PETRI W. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*. 1998, **36**, 449-452.
- (18) HAQUE R, MOLLAH NU, MALI IK *et Coll*. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol*. 2000, **38**, 3235-3239.



- (19) ZENGZHU G, BRACHA R, NUCHAMOWITZ Y *et Coll.* Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 1999, **37**, 3034-3036.
- (20) RAMOS F *et Coll.* The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999, **93**, 335-336.
- (21) BLESSMANN J *et Coll.* Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2002, **40**, 4413-4417.
- (22) LOTTER H, JACKSON TF, TANNICH E. Evaluation of three serological tests for detection of antiamebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amebiasis. *Trop Med Pa rasitol.* 1995, **46**, 180-182.
- (23) KRAOUL L, ADJMI H, LAVARDE V *et Coll.* Evaluation of a rapid enzyme-linked immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol.* 1997, **35**, 1530-1532.
- (24) JACKSON TF, AANDERSON CB, SIMJEE AE. Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984, **78**, 342-345.
- (25) SHETTY N, DAS P, PAL SC, PRABHU T. Observations on the interpretation of amoebic serology in endemic areas. *J Trop Med Hyg.* 1988, **91**, 222-227.
- (26) ROBERT R *et Coll.* Evaluation of a new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol.* 1990, **28**, 1422-1424.
- (27) AUBRY P. Amibiase, *Encycl. Med. Chir. Thérapeutique.* Elsevier Paris 1994, 25-062-A-10, 10 p.
- (28) EDOUARD B., BOHAND X., MASLIN J. Médicaments des infections à protozoaires (paludisme exclu). *Encycl. Med. Chir. Maladie infectieuses.* Elsevier Paris 2005, 8006-G-15, 7 p.
- (29) RALSTON KS, PETRI WA. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*, june 2011, **27(6)**, 253-262.
- (30) FOTEDAR R, STARK D, BEEBE N, et al. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev.* Jul 2007;**20(3)**:511-32
- (31) XIMÉNEZ C, MORAN P, ROJAS L, VALADEZ A, GOMEZ A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis : State of the art. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009, **9**, 1023-1032.
- (32) KNAPPIK M. BORNER U. JELINEK T. Sensitivity and specificity of a new commercial enzyme-linked immunoassay kit for detecting *Entamoeba histolytica* IgG antibodies in sérum samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2005).
- (33) AMBROISE-THOMAS P. Etude séro-épidémiologique de 10 parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Thèse doctorat faculté de médecine de Lyon (1969).
- (34) DIAMOND S. Techniques of axenic cultivation of *E. histolytica* schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *J. Parasitol.* (1968), **54**, 1047-1056.
- (35) MITHAL S, PANIGRAHI H.K, MOHAPATRA L.N. Indirect fluorescent antibody test in amoebiasis using axenic *E. histolytica*. *Indian J. Med. Res.* (1978), **67**, 363-373.

- (36) CAPRON A, VERNES A, NIEL G, et al. Le diagnostic immunologique de l'amibiase. Med. Chir. Diagn. (1972), **1**, 5-13.
- (37) MORRIS M. N, POWELL S.J, ELSDON-DEW R. Latex agglutination test for invasive amoebiasis. Lancet (1970), **27(1)**, 1362-1363.
- (38) PRAKASH O, TANDON B.N, BHALLA I, AY A.K, VINAYAK V.K. Indirect hemagglutination and ameba-immobilization tests and their evaluation in intestinal and extraintestinal amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg (1969), **18(5)**, 670-675.
- (39) BOS H.J, EIJK A.A, STEEREMBERG P.A. Application of ELISA in the sero-diagnosis of amoebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1975), **69(4)**, 440.
- (40) HARTMANN D.P, GHADIRAN E, MEEROVITCH E. ELISA and IHA test in the serodiagnosis of experimental hepatic amebiasis. J. Parasitol. (1980), **66(2)**, 344-345.
- (41) TANDON A. Use of ELISA in intestinale and extra-intestinal amebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1981), **75(4)**, 574-575.
- (42) GANDHI B.M, IRSHAD M, CHAWLA T.C, TANDON B.N. Enzyme-linked protein A : an ELISA for detection of amoebic antibody. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1987), **81(2)**, 183-185.
- (43) ALI I.K, MONDAL U, ROY S, HAQUE R, PETRI W.A, CLARK C.G. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *E. histolytica*. J. Clin. Microbiol. (2007), **45**, 285-289.
- (44) SARGEAUNT P.G. *E. histolytica* is a complex of two species. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1992), **86**, 348.
- (45) PETRI W.A. Recent advances in amebiasis. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci (1996), **33**, 1-37.
- (46) PILLAI D.R, KEYSTON J.J, SHEPPARD D.C, MACLEAN J.D, MACPERSON D.W, KAIN K.C. *E. histolytica* and *E. dispar* : epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. Clin. Infect. Dis. (1999), **29**, 1315-1318.
- (47) MADDISON S.E. Serodiagnosis of parasitic diseases. Clin. Microbiol. Rev (1991), **4**, 457-469.
- (48) WATTANA P, KLAUS J. Serodiagnosis of parasite infection by ELISA with different antigens. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health (1987), **18**, 193-196.

# *Annexes*

Annexe 1 : Tableau comparatif des 5 principaux tests ELISA concurrents.

Société	Test	Souche	dilution sérum	vol. ech.	Contrôles	Conjugué	Substrat	Durée	lecture	Sensib.	Spéci.
<b>Novatec</b>	Novalisa	ENTG0140	100ème	100µl	Lapin positif Humain négatif Seuil lapin	HRP-prot A	TMB	2H	450 nm	>95%	>95%
<b>Diagnostic Automation</b>	E. histolytica IgG Amebiasis	NIH-200	64ème	100µl	Lapin positif Humain négatif pas de seuil	HRP-prot A	TMB	30 min	450 nm	92%	100%
<b>Millipore</b>	Amebiasis serology microplate ELISA	HK-9	64ème	100µl	Lapin positif Humain négatif Seuil lapin	HRP-prot A	TMB	30 min	450 nm	95%	97%
<b>R-Biopharm</b>	Ridascreen E. histolytica IgG	-	50ème	100µl	Humain, pas de seuil	HRP-prot A	TMB	50 min	450 nm	100%	95.6%
<b>Cypress diagnostics</b>	Amebiasis Ag E. histolytica IgG	-	100ème	50 µl	Humain, pas de seuil	HRP-prot A	TMB	50 min	450 nm	90-100%	90-100%

Annexe 2 : Notice technique du produit *Entamoeba histolytica* trousse complète de réactifs ELISA, 96 tests en barrettes sécables (pages suivantes).

# ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

## Test immunoenzymatique pour le diagnostic de l'amibiase invasive à *E. histolytica*

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage *in vitro*

Notice technique pour l'article N°9550, N°CE: xxx xxx

### Utilisations prévues du produit:

Dépistage sérologique (IgG) de l'amibiase invasive chez les patients ayants séjournés dans des zones d'endémies et qui développent des symptômes tels que douleurs abdominales, fièvre et hépatomégalie, parfois plusieurs années après le voyage. 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 les antigènes solubles de trophozoïtes de *Entamoeba histolytica*. La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis de l'antigène parasitaire 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):

9550-1	Barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles de trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i>	96	puits
9550-2	TBS-Tween (concentré 10 x)	50	ml
9550-3	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
9550-4	Tampon de l'enzyme	50	ml
9550-5	Solution d'arrêt (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
9550-6	Sérum de contrôle négatif	200	µl
9550-7	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil)	200	µl
9550-8	Sérum de contrôle positif	200	µl
9550-9	Protéine A conjuguée à la phosphatase alcaline	300	µl
9550-10	Substrat de la phosphatase	20	tablettes
9550-11	Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
9550-12	Cadre pour les supports de puits	1	cadre
9550-13	Notice technique		

### 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 ( $\mu\text{l}$  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 N°1 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 N°2, 1/10 dans de l'eau distillée.

**Solution de lavage:** diluer la solution de lavage concentrée 10 x N°3, 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  $\mu\text{l}$  de chaque sérum de contrôle N°6 à 8 dans 190  $\mu\text{l}$  de la solution TBS-Tw (dilution finale: 1/20).

**Sérums à tester:** diluer 10  $\mu\text{l}$  de sérum dans 2.0 ml de la solution TBS-Tw (dilution finale: 1/201).

**Conjugué protéine A-phosphatase:** diluer le conjugué N°9, 1/51 dans le TBS-Tw.

**Solution de substrat:** équilibrer le tampon de l'enzyme N°4 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat N°10 dans le tampon de l'enzyme N°4 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Bien mélanger après la dissolution de la tablette.

**Solution d'arrêt:** utiliser le réactif N°5 non dilué.

**Précautions pour les manipulations:** Les solutions 9550-02, 9550-03, 9550-04 et 9550-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.02%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium ( $\text{N}_3\text{Na}$ ), cette substance est toxique. La solution d'arrêt 9550-05 (0.5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (N°6 à 8) proviennent de lapins.

## Volumes à préparer:

			Nombre de puits à utiliser			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>TBS-Tween (10 x)</b>	N°2 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Sol. de lavage (10 x)</b>	N°3 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Conjugué anti-IgG</b>	N°9 + TBS-Tw	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Sérums de contrôles</b>	N°6-8 + TBS-Tw	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Sérums à tester</b>	Sérum + TBS-Tw	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Solution de substrat</b>	N°10 + N°4	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 au-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.

## Interprétation:

Soustraire la valeur mesurée dans le puits ayant contenu le TBS-Tw seul (blanc en absence de sérum) de toutes les autres valeurs. Le test est valable si les trois critères suivants sont remplis : DO contrôle positif > 1.200, DO contrôle négatif < 14% du contrôle positif, DO du blanc contre l'air < 0.350.

Le titre du sérum seuil (N°7) a été ajusté de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques d'amibiase et les sérums de sujets sains.

Le résultat est **négalif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus basse que celle du sérum seuil. Dans ce cas, le titre d'anticorps IgG dirigés contre les antigènes solubles de *E. histolytica* n'est pas significatif cliniquement.

Le résultat est **positif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus élevée que celle du sérum seuil. Dans ce cas, le titre d'anticorps IgG dirigés contre les antigènes solubles d'*E. histolytica* est généralement considéré comme cliniquement significatif. Ce résultat oriente vers une amibiase.

## Sensibilité et spécificité du test:

Une **sensibilité** de **100%** a été observée avec 52 sérums provenant de patients présentant une amibiase viscérale.

Une **spécificité** de **96%** a été observée avec 99 sérums de donneurs de sang (Suisses).

Sur 7 sérums de patient atteints d'amibiase intestinale, tous ont été trouvés positifs avec ce test.

Une spécificité de 80% est observée avec 40 sérums de patients atteints d'autres parasitoses. Les principales réactions croisées concernent la leishmaniose, le paludisme et l'anguillulose.

Une étude interne a montré que les sérums lipémiques, ictériques ou hémolysés ne présentaient pas de problèmes pour la réalisation de ce test.

Dans tous les cas, il est nécessaire d'intégrer l'ensemble des données cliniques, épidémiologiques et biologiques avant d'établir le diagnostic final.

## Références:

**Nicholls, R.S., I Restrepo, M., Duque, S., Consuelo Lopez, M., Corredor, A.** (1994) Standardization and evaluation of Elisa for the serodiagnostic of amoebic liver abscess. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **89**: 53-58.

**Visser, L.G., Verweij, J.J., Van Esbroeck, M., Edeling, W.M., Clerinx, J. Polderman A.M.** (2006) Diagnostic methods for differentiation of *E. histolytica* and *E. dispar* in carriers : performance and clinical implications in a non-endemic setting. Int. journal of med. microbiol. **296** : 397-403.

**BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA**

Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, [www.bordier.ch/](http://www.bordier.ch/)







# Serment des Apothicaire

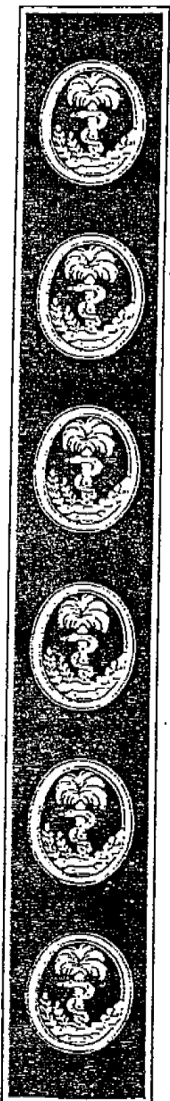
Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



**NICOLAS BEYLS**

**Titre de la thèse :**

DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASE VISCERALE A *ENTAMOEB*  
*HISTOLYTICA* : VALIDATION D'UN NOUVEAU TEST ELISA AU CHU DE

GRENOBLE

**Résumé :**

L'amibiase viscérale à *Entamoeba histolytica* est une protozoose dont la prévalence est élevée en milieu tropical en raison des mauvaises conditions d'hygiène fécale. Dans les pays tempérés, les patients concernés sont les immigrés et les touristes revenant des zones d'endémies. Elle se manifeste par un abcès, le plus souvent hépatique. Les symptômes sont des douleurs abdominales, de la fièvre et une hépatomégalie.

Pour le diagnostic, il faut intégrer les données symptomatologiques, épidémiologiques et biologiques des patients. La sérologie représente une grande part de cette équation. Le test évalué dans cette étude rétrospective est une technique immunoenzymatique, l'ELISA.

Cent soixante dix sérums de patients du CHU de Grenoble appartenant à 4 groupes : amibiase viscérale (n=52), amibiase intestinale (n=7), non amibiens (n=71), autres parasitoses (n=40), et un cinquième groupe constitué par des donneurs de sang (n=99), ont été étudiés. La sensibilité de ce test est de 100%, les spécificités sont de 88.7% (non amibiens) et de 96% (donneurs de sang). Les autres réactifs ELISA présents actuellement sur le marché international possèdent une sensibilité légèrement plus faible (95% en moyenne) et une spécificité équivalente (95% en moyenne chez les donneurs de sang). Les efficacités des deux techniques sérologiques utilisées en routine au CHU de Grenoble : immunofluorescence (95.1%) et latex (94.3%), sont sensiblement les mêmes que celle du test évalué (93.5%).

Cette nouvelle trousse diagnostique est tout aussi performante que celles disponibles actuellement disponibles sur le marché. Elle trouvera toute sa place dans la stratégie diagnostique actuelle de l'amibiase viscérale.

**Mots clés :**

Sérologie	Diagnostic in vitro
Amibiase	Spécificité
ELISA	Sensibilité
<i>Entamoeba histolytica</i>	Valeur prédictive

**Thèse soutenue le 1 Décembre 2011 devant le jury composé de :**

- Le Président : Madame le Docteur Claudine PINEL
- Membres : Madame le Docteur Odile FAURE  
Monsieur le Professeur Jean-Paul STAHL  
Madame le Docteur Renée GRILLOT  
Monsieur le Professeur Clément BORDIER

Adresse de l'auteur :

33, avenue Alsace Lorraine, 38000 GRENOBLE  
nicolas.beyls@yahoo.fr