

L'immunochromatographie, technique alternative à la microscopie et à l'ELISA, pour la détection rapide, simple, efficace et performante du *Cryptosporidium parvum*

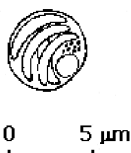
Christophe Depierreux*, Emmanuel Pé*, Agnès Paquet*, Olivier Raimond* et Thierry Leclipteux*

* Coris BioConcept, rue Marcel Lecomte 199, 5100 Namur (Wépion), Belgique <http://www.corisbio.com>

Introduction

Chez les immunocompétents, la cryptosporidiose est responsable de 5 % des diarrhées dans les pays chauds en voie de développement. Dans les régions tempérées, environ 2 % des diarrhées résultent de cette pathologie. Le parasite responsable de cette pathologie est le *Cryptosporidium parvum*, protozoaire présent dans les voies gastro-intestinales (O'Donoghue, 1995). Ce dernier, reconnu comme étant un pathogène entérique extrêmement infectieux, se transmet essentiellement par voie anale ou orale comme les Rotavirus et Adénovirus. Les oocystes peuvent être ingérés avec l'eau (Willocks *et al.*, 1998; Furtado *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1996) et/ou les aliments.

Cette pathologie est particulièrement importante et en forte augmentation chez les personnes immunodéprimées sans traitement thérapeutique efficace (spécialement la population sidéenne). Dans ces populations, le *Cryptosporidium p.* induit entre 20 et 30 % des entérites dans les pays en voie de développement et 20 % dans nos régions. La période d'incubation varie de 2 à 14 jours. Les symptômes de la cryptosporidiose se déclinent sous forme de diarrhée aqueuse et sanglante, de crampes abdominales, de perte de poids, de nausées le tout parfois accompagné de légère fièvre. La maladie peut être fatale lorsqu'elle touche les personnes les plus fragilisées (souvent indicatrice du stade III du SIDA), mais évolue généralement favorablement en quelques semaines (1 à 3 semaines). Des doses très basse, probablement inférieure à 100 oocystes, sont capables d'initier l'infection. Ces derniers sont remarquablement résistants à beaucoup de désinfectant et



Cryptosporidium parvum

Figure 1 : schéma et image d'un oocyste de *Cryptosporidium parvum*

restent viable pendant près de 18 mois dans un environnement frais et humide.



Ce parasite a un cycle direct qui se déroule à la surface des entérocytes. La succession des événements est comparable au cycle des *Isospora*. Les sporozoïtes libérés dans la lumière du tube digestif pénètrent dans les cellules épithéliales. Ensuite, plusieurs cycles de reproduction asexuée se déroulent dans les entérocytes en fournissant des mérozoïtes de forme allongée. Puis, à l'intérieur de nouveaux entérocytes, les mérozoïtes subissent la différenciation sexuelle (macrogamétocytes et microgamétocytes) et les macrogamètes seront fécondés par les microgamètes. Le résultat de la fécondation sera l'oocyste qui est expulsé de la cellule hôte et libéré dans le milieu extérieur dans les fèces. Les oocystes éliminés dans les matières fécales sont directement infectieux.

Le diagnostic de cette pathologie est réalisé par microscopie optique couplé à une coloration (méthode de Ziehl-Neelsen modifiée) (Garcia *et al.*, 1983) ou par immunofluorescence (Deng and Cliver, 2000) sur des étalements de matières fécales. La coloration de Ziehl-Neelsen présente le risque de confondre les oocystes avec les cryptosporidies. De nombreux test ELISA (Chapman *et al.*, 1990; Dagan *et al.*, 1995; Garcia and Chimizu, 1997; Graczyk *et al.*, 1996; Rosenblatt and Sloan, 1993) sont également disponibles pour détecter spécifiquement la présence d'antigènes provenant d'oocystes de *Cryptosporidium parvum*. Acôté de ces techniques, des méthodes PCR (Leng *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1996, 1998; Rochelle *et al.*, 1997; Monis and Saint, 2001) permettent de détecter le parasite dans l'eau de distribution ou chez des porteurs asymptomatiques. Toutes ces méthodes, quoique sensibles, nécessitent une main d'oeuvre importante et qualifiée.

Dans le but de rendre cette détection plus facile, plus rapide et tout aussi efficace, Coris BioConcept a développé un test immunochromatographique permettant la détection des antigènes des oocystes du *Cryptosporidium Parvum* dans les matières fécales endéans les 10 minutes.

Afin de valider ce nouveau test, des échantillons en provenance d'un hôpital pédiatrique

(Guy's and Thomas' Hospital, Londres) ont été analysés par immunochromatographie et ces résultats comparés avec ceux de deux méthodes de référence. Les mêmes échantillons ont été testés en parallèle avec le test "Crypto-Strip" développé par Coris BioConcept et l'ELISA (Techlab Inc., USA) d'une part et une technique de microscopie optique d'autre part. Les résultats obtenus avec le "Crypto-Strip" sont comparés respectivement avec ceux provenant de l'ELISA et ceux de la microscopie optique. Cette comparaison a été réalisée pour déterminer le niveau de sensibilité et de spécificité de cette nouvelle trousse de diagnostic par rapport à ces deux méthodes de référence. De plus, le protocole de validation a permis, d'une part, de vérifier si d'éventuelles interférences avec d'autres pathogènes existaient et, d'autre part, de déterminer le seuil de détection.

Matériels et méthodes

Echantillons

103 matières fécales humaines ont été testées pour évaluer le test immunochromatographique « Crypto-Strip » par rapport à l'ELISA et à la microscopie optique. Ces échantillons proviennent de patients souffrant d'entérites. Les paramètres de sensibilité et de spécificité tels que définis par Bouyer (Bouyer J; *et al*, 1995) ont été déterminés pour le test immunochromatographique par rapport à l'ELISA et à la microscopie optique. Les matières fécales ont été pré-diluées approximativement 5 fois dans du tampon PBS-Tween (0,1%) avant leur évaluation avec les trois techniques à comparer.

ELISA

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées avec un anticorps monoclonal dirigé contre les antigènes de surface des oocystes de *Cryptosporidium Parvum*. 100 µl d'une dilution 1/5 de la préparation de matières fécales pré-diluées dans la solution de lavage sont incubés 60 minutes à température ambiante sur les plaques sensibilisées. Elles sont ensuite lavées quatre fois avec la solution de lavage. L'anticorps de détection (un anticorps de lapin dirigé contre les antigènes de surface du *Cryptosporidium p.*) est distribué dans les 96 puits de la plaque sensibilisée avant une incubation de 20 minutes suivie de quatre rinçages avec la solution de lavage. Le conjugué (un anticorps anti-IgG Lapin couplé à HRP) est distribué et incubé pendant 10 minutes. La procédure de lavage est répétée (cfr. ci-dessus) avant d'ajouter le substrat et de lire à 450 nm. Un control négatif est réalisé pour chaque échantillon testé.

Test immunochromatographique

Le kit « Crypto-Strip » est constitué d'une tige

de nitrocellulose sensibilisée avec un immunoréactif dirigé contre les antigènes des oocystes de *Cryptosporidium Parvum* (Figure 1). La spécificité des réactions immunologiques est assurée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal, dirigé contre des antigènes spécifiques des oocystes et conjugué avec des particules d'or colloïdal de 20 nm.

Les matières fécales testées avec l'ELISA sont diluées 3 fois dans le tampon de dilution fourni avec le kit. Les tiges sont ensuite incubées dans 500 µl de cette solution pendant 5 à 10 minutes à température ambiante pour détecter la présence de *Cryptosporidium Parvum* dans l'échantillon testé.

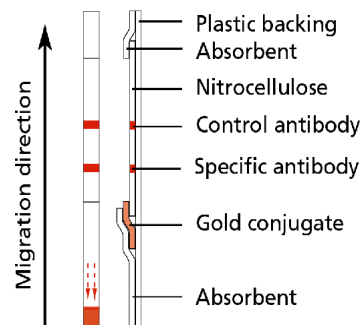


Figure 1 : représentation schématique d'une tige en vue de face (gauche) et en vue latérale (droite). La membrane de nitrocellulose est collée sur un support plastique. De part et d'autre de celle-ci est disposé du papier absorbant, papier permettant à l'échantillon de migrer efficacement depuis la base de la tige (flèche) jusqu'à son sommet. Entre l'absorbant inférieur et la membrane de nitrocellulose est disposée une membrane de polyester imprégnée avec un anticorps couplé à l'or colloïdal. Cet anticorps est dirigé contre les antigènes des oocystes du *Cryptosporidium parvum*. Un échantillon est considéré comme négatif lorsque la ligne contrôle est révélée et positif lorsque deux lignes sont visibles.

Microscopie optique

L'analyse par microscopie optique a été effectuée par le laboratoire anglais de "Preston Public Health Laboratory" (Royal Preston Hospital, PO BOX 202, Sharoe Green Lane, Preston PR2 9HG, United-Kingdom).

La technique de microscopie optique est réalisée par coloration spécifique des oocystes, méthode utilisant du phénol-auramine et du permanganate de potassium sur un étalement de matières fécales. Les oocystes apparaissent sous forme de disques jaunes clairs avec une apparence d'érythrocyte sur fond rouge foncé quand l'observation est réalisée par microscopie aux ultra-violets.

Les résultats obtenus avec cette technique ont été comparés avec les tests réalisés avec la trousse "Crypto-Strip".

Interférences avec d'autres pathogènes et limite de détection

A) Le kit « Crypto-Strip » a été testé avec différentes matières fécales positives pour au moins un des microorganismes repris dans la liste ci-après.

Liste des pathogènes testés : *Acinetobacter lwoffii*, *Campylobacter jejuni*, *Giardia lamblia*, *Aeromonas hydrophila*, *E. Coli O157:H7*, *Salmonella thyphimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marescens*, *Shigella flexneri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia enterocolitica*, *Rotavirus*, *Adenovirus* (groupes A à F).

B) La limite de détection a été déterminée grâce à la quantification des oocystes dans un échantillon positif pour le *Cryptosporidium Parvum*. Cet échantillon avait été coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen avant le comptage. La trousse "Crypto-Strip" a ensuite été utilisée sur cet échantillon dilué de 2 en 2 en dilution limite.

Résultats et discussions

Comparaison ELISA - Crypto-Strip

L'ensemble des 103 matières fécales a été testé avec les trois techniques décrites dans "matériels et méthodes". La comparaison des résultats observés avec le test Crypto-Strip et avec le test ELISA spécifique pour le *Cryptosporidium Parvum* est reprise dans le tableau 1.

Les paramètres de spécificité et de sensibilité ont été déterminés en appliquant les

ELISA	Crypto-Strip	
	Positif	Négatif
Positif	17	1
Négatif	0	85

Tableau 1 : comparaison entre les résultats obtenus avec le test ELISA et le test Crypto-Strip pour les 103 matières fécales.

formules suivantes :

$$\text{Spécificité} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP}) \times 100 = 85/85 = 100 \%$$

$$\text{Sensibilité} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN}) \times 100 = 17/18 = 94,4 \%$$

$$\text{Fiabilité} = (\text{VN}+\text{VP})/\text{total} \times 100 = 102/103 = 99 \%$$

Suivant les résultats issus de la comparaison dans le tableau 1, la probabilité de se tromper en diagnostiquant comme sain un patient souffrant de diarrhée à *Cryptosporidiose* est de 5,6 %. De la même manière, la probabilité d'émettre un diagnostic positif sur un échantillon sain est de 0 %.

Comparaison Microscopie Optique - Crypto-Strip

La comparaison des résultats observés avec le test Crypto-Strip et avec la microscopie optique spécifique pour le *Cryptosporidium Parvum* est reprise dans le tableau 2.

Les paramètres de spécificité et de sensibilité ont été déterminés en

Microscopie optique	Crypto-Strip	
	Positif	Négatif
Positif	17	2
Négatif	0	84

Tableau 2 : comparaison entre les résultats obtenus avec la microscopie optique et le test Crypto-Strip pour les 103 matières fécales.

appliquant les formules suivantes :

$$\text{Spécificité} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP}) \times 100 = 84/84 = 100 \%$$

$$\text{Sensibilité} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN}) \times 100 = 17/19 = 89,5 \%$$

$$\text{Fiabilité} = (\text{VN}+\text{VP})/\text{total} \times 100 = 101/103 = 98,1 \%$$

Suivant les résultats issus de la comparaison dans le tableau 2, la probabilité de se tromper en diagnostiquant comme sain un patient souffrant de diarrhée à *Cryptosporidiose* est de 10,5 %. De la même manière, la probabilité d'émettre un diagnostic positif sur un échantillon sain est de 0 %.

La sensibilité est définie comme étant la proportion de patients identifiés comme malades avec le test immunochromatographique parmi une population de sujet réellement malades.

La spécificité est définie comme étant la proportion de sujets identifiés sains avec le test immunochromatographique parmi une population de sujet indemnes.

Les valeurs de spécificité et de sensibilité obtenues en comparant les techniques de référence ELISA et microscopie optique avec notre test Crypto-Strip valident notre technique. Le Crypto-Strip donne des valeurs très proches de celle observées avec les deux techniques.

Cependant, par rapport à l'ELISA ou à la microscopie qui reste les tests les plus sensibles, le Crypto-strip présente plusieurs avantages : c'est un test homogène qui s'effectue en une seule étape sans lavage, sans révélation enzymatique ni coloration. Il ne nécessite aucun appareillage et une réponse fiable est obtenue en 5 minutes.

Interférences avec d'autres pathogènes et limite de détection

A) Tous les tests réalisés avec les différents échantillons positifs pour les pathogènes cités ci-dessus ont montré un résultat négatif. Nous pouvons donc conclure que la trousse "Crypto-Strip" est bien spécifique au *Cryptosporidium parvum*.

B) L'expérience couplant d'une part la quantification des oocystes dans un échantillon et d'autre part le test de cet échantillon en dilution limite avec le "Crypto-Strip" a permis de déterminer la limite de détection de ce kit entre 50 et 100 oocystes dans 100 µl.

Conclusions

En conclusion, la simplicité du test "Crypto-Strip" est son atout principal, tout en présentant une assurance quant au diagnostic posé qui est proche de celle de l'ELISA et de la microscopie.

Bibliographie

- Bouyer J. et al. 1995
In : *Epidemiologie : Principes et méthodes quantitatives*.
Edition Inserm : ISBN : 2-85598-640-0
- Chapman, P., Rush, B. and McLauchlin, J., 1990.
An enzyme immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in faecal and environmental sample.
J. Med. Microbiol. 32, pp.233-237.
- Dagan, R., Fraser, D., El-on, J., Kassis, I., Deckelbaum, R. and Turner, S., 1995.
Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens from infants and young children in field studies.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 52, pp. 134-138.
- Deng, M.Q. and Cliver D.O., 2000.
Comparative detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from apple juice
Int. J. of food Microbiology 54, pp.155-162.
- Furtado, C., Adak, G.K., Stuart, J.M., Wall, P.G., Evans, H.S. and Casemore, D.P., 1998.
Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5.
Epidemiol. and Infect. 121 1, pp. 109-119.
- Garcia, L. and Shimizu, R., 1997.
Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens.
J. Clin. Microbiol. 35, pp. 1526-1529.
- Garcia, L.S., Breckner, D.A., Brewer, T.C. and Shimizu, R.Y., 1983.
Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens.
J. Clin. Microbiol. 18, pp. 185-190.
- Graczyk, T., Cranfield, M. and Fayer, R., 1996.
Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 54, pp. 274-279.
- Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L. and Juranek, D.D., 1996.
Surveillance for waterborne-disease outbreaks — United States, 1993–1994.
Morbidity and Mortal Weekly Report CDC Surveillance Summary 45 1, pp. 1-33.
- Leng, X., Mosier, D. and Oberst, R., 1996.
Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces.
Appl. Environ. Microbiol. 62, pp.643-647.
- Monis, P.T. and Saint, C.P., 2001.
Development of a nested-PCR assay for the detection of *cryptosporidium parvum* in finished water
Wat. Res. Vol 35, N°7, pp.1641-1648.
- Morgan, U.M., O'Brian, P.A. and Thompson, R.C.A., 1996.
The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR.
Mol. Biochem. Parasitol. 77, pp. 103-108.
- Morgan, U., Pallant, L., Dwyer, B., Forbes, D., Rich, G. and Thompson, R., 1998.
Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial.
J. Clin. Microbiol. 36, pp. 995-998.
- O'Donoghue, P.J. 1995.
Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals.
Int. J. Parasitol. 25(2), 139-195.
- Rochelle, P.A., De Leon, R., Stewart, M. and Wolfe, R.L., 1997.
Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water.
Appl. Environ. Microbiol. 63, pp. 106-114.
- Rosenblatt, J. and Sloan, L., 1993.
Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens.
J. Clin. Microbiol. 31, pp.1468-1471.
- Willocks, L., Crampin, A., Milne, L., Seng, C., Susman, M., Gair, R., Moulds, M., Shafi, S., Wall, R., Wiggins, R. and Lightfoot, N., 1998.
A large outbreak of cryptosporidiosis associated with a public water supply from a deep chalk borehole.
Outbreak Investigation Team. *Communic. Dis. Public Health* 1 4, pp. 239-243.