

# Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée.

## 1. Modalités techniques

PIERRE AMBROISE-THOMAS<sup>1</sup> & PIERRE T. DESGEORGES<sup>2</sup>

*Par l'emploi d'un nouveau substrat révélateur, l'orthotolidine, la réaction de micro-ELISA aux anti-globulines conjuguées à la peroxydase peut être très sensiblement améliorée. La technique proposée comprend la lecture au spectrophotomètre, directement dans les plaques de microtitration. Elle a été appliquée à l'étude sérologique de différentes maladies parasitaires. Ses principaux avantages sont un important gain de temps (4 heures) et de sensibilité. Ceci permet notamment l'emploi d'anti-globulines 5 fois plus diluées qu'avec les substrats révélateurs habituels (acide amino-5 salicylique) et surtout une considérable économie en réactifs antigéniques.*

Les réactions immuno-enzymologiques (titrage avec immuno-adsorbant lié à une enzyme, ou ELISA) associent plusieurs avantages de l'immunofluorescence indirecte ou de la radio-immunologie en échappant à certains inconvénients de ces deux méthodes (3). Le matériel utilisé est en effet d'une extrême simplicité et les réactifs marqués sont librement accessibles à tout laboratoire de biologie. Par ailleurs, la sensibilité du test ELISA approche celle de la radio-immunologie et permet l'emploi d'infimes quantités d'antigènes, ce qui explique en particulier l'intérêt de la méthode en parasitologie où les réactifs antigéniques sont particulièrement rares et coûteux (3, 7). Les résultats peuvent être appréciés à l'œil nu ou mesurés précisément avec un spectrophotomètre. Enfin, l'automatisation de toute la réaction ou de certaines de ses séquences est parfaitement réalisable.<sup>a</sup>

Cependant, le test ELISA est encore largement perfectible (1). C'est ce que nous avons tenté de faire, depuis 1976, par l'étude systématique des différents paramètres de la réaction et notamment de nouveaux substrats révélateurs.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### *La technique de base*

Dérivant de celle de Ruitenberget coll. (4), reprise par Bullock & Walls (1), elle a été réalisée essentiellement avec des conjugués à la peroxydase que, notamment pour les raisons rappelées par Bullock et coll. (1), nous avons préférés aux anti-globulines marquées par la phosphatase alcaline. Les différents temps de la réaction sont les suivants. Après titrage préalable, l'antigène est dilué dans du tampon carbonate à 0,05 mol/litre, de pH 9,6, puis déposé à raison de 100 µl dans les alvéoles de plaques de microtitration. Après incubation, les plaques sont lavées pendant 3 fois 5 minutes dans du sérum physiologique additionné de 0,5 ml de Tween 20 par litre. Dans chaque cupule, on répartit alors 100 µl des diverses dilutions des sérums étudiés en tampon PBS, pH 7,2, avec 0,5 ml de Tween 20 et 10 g de sérumalbumine bovine (BSA) par litre. L'incubation est suivie de 3 nouveaux lavages identiques aux précédents, puis on répartit 100 µl par cupule d'anti-globulines conjuguées à la peroxydase préalablement portées à leur dilution optimale<sup>b</sup> dans le même diluant que pour les sérums. Après contact et nouveaux lavages, on dépose dans chaque alvéole 100 µl d'une solution d'acide amino-5 salicylique (A-5 S)

<sup>1</sup> Professeur de parasitologie à la Faculté de Médecine de l'Université de Grenoble, France.

<sup>2</sup> Assistant de parasitologie à la Faculté de Médecine de l'Université de Grenoble, France.

<sup>a</sup> Depuis plusieurs années, l'Institut national de la Santé publique, à Bilthoven, Pays-Bas, dispose d'une installation automatisée pour le sérodépistage de la trichinose par l'ELISA en macrométhode.

<sup>b</sup> Peroxidase conjugated IgG fraction rabbit anti-human IgG (heavy chain specific). Laboratoires Cappel, Cochranville, Etats-Unis d'Amérique.

préparée extemporanément.<sup>a</sup> On arrête la réaction après 30 minutes par addition de 15  $\mu$ l de soude 3 N. La lecture est faite à 450 nm. Initialement, cette lecture était effectuée dans la cuve d'un spectrophotomètre, ce qui exigeait le soutirage du liquide contenu dans chaque cupule. Une importante amélioration pratique a consisté en l'emploi d'un photomètre permettant la mesure des résultats directement dans les plaques de microtitration et l'enregistrement de ces mesures.<sup>b</sup>

#### Les paramètres étudiés

**Les antigènes.** Au total, 17 antigènes parasitaires ont été testés au cours de notre étude: 8 antigènes préparés au laboratoire (*Toxoplasma gondii*, *Fasciola hepatica*, *Echinococcus granulosus*, *Candida albicans* A et B, *Aspergillus fumigatus* somatique et métabolique, *Cryptococcus neoformans*); 2 antigènes provenant d'autres centres de recherche (*Plasmodium falciparum*, Institut Nuffield, Londres; *Trichinella spiralis*, Institut national de la Santé publique, Bilt-hoven, Pays-Bas); 7 antigènes du commerce (*Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* et *Echinococcus granulosus*, Behring; *Fasciola hepatica*, Mérieux; *Echinococcus granulosus* et *Schistosoma mansoni*, *Toxoplasma gondii*, Institut Pasteur).

La teneur en protéines de chaque antigène a été dosée à 280 nm par rapport à une gamme étalon de protéine humaine standard.<sup>c</sup> Par des titrages en damiers, on a ensuite déterminé pour chaque variante technique du test ELISA la quantité optimale de protéines antigéniques.

**La sensibilisation des plaques de microtitration.** Comme Bullock & Walls (1), on a utilisé des plaques de polystyrène (Cooke Microtiter M129 A) dont la sensibilisation par les antigènes a été étudiée à différentes températures (4°C, température du laboratoire, et 37°C, pendant des temps variant de 1 à 12 heures, avec ou sans agitation et ventilation).

**Les sérums.** Il s'agit de plus de 500 sérums humains comprenant des témoins négatifs, ainsi que des sérums homologues des différents antigènes employés

et trouvés positifs par d'autres tests sérologiques (immunofluorescence indirecte, hémagglutination conditionnée et/ou immunoelectrophorèse). Les renseignements cliniques et parasitologiques concernant tous ces sérums étaient malheureusement d'inégale valeur si bien que l'essentiel des études comparées a concerné la toxoplasmose (18 sérums), l'amibiase (17 sérums), la trichinose (17 sérums), l'hydatidose (17 sérums) et l'aspergillose (19 sérums). Chaque sérum a été testé à différentes dilutions (1/20, 1/40, etc., 1/5120), les titrages étant dans certains cas répétés 5 fois ou plus. Pour chaque variante de la technique, on a retenu comme optimales les conditions expérimentales donnant la plus forte différence de densité optique (DO) entre les différents témoins positifs et les sérums négatifs pris à la même dilution (1/80). Par ailleurs, deux techniques ont été considérées comme quantitativement comparables si elles donnaient les mêmes titres d'anticorps pour les sérums témoins. Ce titre correspondait à la plus forte dilution donnant une densité optique supérieure ou égale à celle des témoins négatifs dilués à 1/20.

**Les conjugués et substrats.** Si on excepte quelques essais avec des conjugués à la phosphatase alcaline, nous avons surtout employé des anti-globulines marquées à la peroxydase dont la concentration d'emploi a été expérimentalement déterminée dans chaque cas.

Comme substrat révélateur de la peroxydase, on a principalement étudié l'orthodianisidine.2 HCl et surtout l'acide amino-5 salicylique.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A-5 S) et l'orthotolidine (OT). Très chromogénique, ce dernier substrat est de préparation plus simple que l'A-5 S.<sup>d</sup> Il révèle par une coloration bleue la présence de peroxydase.

**Les lectures.** Elles ont été effectuées au spectrophotomètre Vernon, directement dans les plaques de microtitration avec des longueurs d'ondes de 450 nm pour l'A-5 S et de 630 nm pour l'OT. La longueur du trajet optique mesuré (hauteur de substrat chromogène dans chaque alvéole) est, dans nos conditions opératoires, de 3 mm. Par ailleurs, plusieurs séries de lectures ont été réalisées à l'œil nu par différents observateurs, successivement ou à 5-10 min d'intervalle.

<sup>a</sup> Peser 80  $\mu$ g d'A-5 S (Merck). Les dissoudre dans 100 ml d'eau distillée à 70°C. Laisser refroidir et ajuster à pH 6 avec NaOH. Filtrer. Au moment de l'emploi, ajouter extemporanément 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 volumes (9%).

<sup>b</sup> Spectrophotomètre Vernon. Appareil type PHI V pourvu d'un dispositif mécanique permettant le positionnement rapide et l'avance des plaques de microtitration ainsi que l'enregistrement graphique des densités optiques. Lyon-Labo, Lyon, France.

<sup>c</sup> Protéine humaine standard. Sigma Réf. 540-10.

<sup>d</sup> Dichlorhydrate d'orthotolidine (OT) Merck, ou bien orthotolidine Sigma ou Prolabo. Ce substrat révélateur est extemporanément préparé de la façon suivante: dissoudre 21,2  $\mu$ g d'OT dans 1 ml de diméthylformamide. Compléter à 100 ml avec du tampon acéto-acétique rigoureusement à pH 3,7 et ajouter au moment de l'emploi 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 volumes (9%).

Tableau 1. Immunoperoxydase: les différents temps de la réaction avec l'orthotolidine ou l'acide amino-5 salicylique comme substrats révélateurs

	Ortho-tolidine	Acide amino-5 salicylique
Sensibilisation des plaques	1 nuit à 4°C	1 nuit à 4°C
Lavage	3 × 5 min	3 × 5 min
Incubation des sérums	30 min	120 min
Lavage	3 × 5 min	3 × 5 min
Incubation du conjugué marqué	30 min	180 min
Lavage	3 × 5 min	3 × 5 min
Incubation du substrat	40 min	30 min
Arrêt de la coloration	—	arrêt avec NaOH (3 mol/litre)
Temps total d'incubation et lavage	1 nuit + 2 h 25 min	1 nuit + 6 h 15 min + dépôt de NaOH

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Exécution de la réaction

Les meilleurs résultats ont été obtenus à la température du laboratoire, sauf pour la sensibilisation des plaques effectuée à 4°C.

Il faut souligner que le temps d'incubation du substrat doit être impérativement réalisé à l'obscurité et à une température ne dépassant pas 20°C. Pour toute température supérieure, il est indispensable de vérifier la cinétique de la coloration pour déterminer le moment optimal des lectures. Pour l'OT et l'A-5 S, les différents temps de la réaction sont indiqués dans le tableau 1, l'OT permettant au total un gain de temps de près de 4 heures.

### Concentrations d'antigènes et d'anti-globulines nécessaires

Dans l'ensemble, les quantités d'antigènes nécessaires sont de 4 à 8 fois plus faibles pour le test avec OT. Le tableau 2 résume les résultats obtenus dans une comparaison portant sur 5 types différents de réactifs antigéniques.

Par ailleurs, le conjugué anti-globulines à la peroxydase peut être employé à une dilution 5 fois plus faible si le substrat est l'OT (1/2500 au lieu de 1/500 avec l'A-5 S, pour le conjugué employé). Dans chaque cas, cette dilution optimale du conjugué a été déterminée expérimentalement comme donnant les titres

Tableau 2. Concentrations en protéines des solutions antigéniques pour le test de micro-ELISA à la peroxydase avec différents substrats

Antigène	Substrat	
	Orthotolidine	Acide amino-5 salicylique
Toxoplasme (Institut Pasteur)	5 µg/ml	40 µg/ml
Toxoplasme (Behring)	10 µg/ml	40 µg/ml
Trichine (Bilthoven)	5 µg/ml	20 µg/ml
Hydatique (Grenoble)	2 µg/ml	5 µg/ml
<i>Aspergillus</i> (Grenoble)	5 µg/ml	20 µg/ml

les plus élevés avec les sérums témoins positifs et des « blanks » (témoins conjugués + substrats) dont la DO était nulle ou négligeable.

### Lecture des résultats

*Cinétiques de la coloration.* Les cinétiques de la coloration avec l'A-5 S et avec l'OT sont indiquées dans la figure 1. Pour l'orthotolidine, il est inutile d'arrêter la coloration par addition de soude caustique. En effet, cette coloration augmente rapidement d'intensité jusqu'à la 40<sup>e</sup> minute, puis décroît spon-

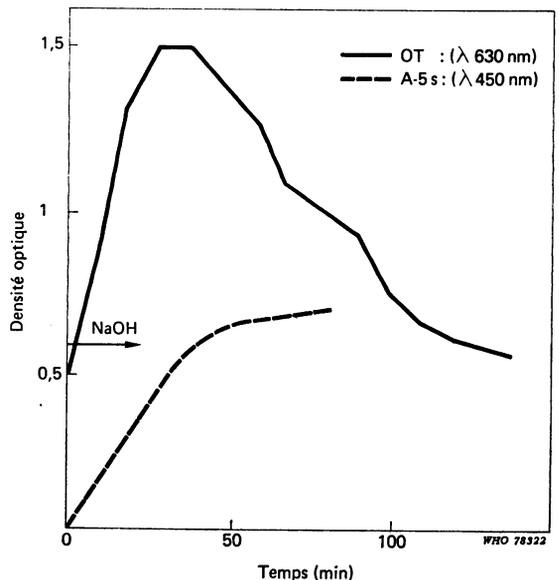


Fig. 1. Micro-ELISA à la peroxydase. Cinétique de la coloration avec l'orthotolidine (OT) et l'acide amino-5 salicylique (A-5 S).

tanément au-delà de la 50<sup>e</sup> minute. C'est dans cet intervalle de temps que doivent être effectuées les lectures. Ce délai peut paraître court. Il est largement suffisant avec le spectrophotomètre utilisé, qui permet sans difficulté de mesurer et d'enregistrer en 5 minutes les DO dans les 96 alvéoles d'une plaque de microtitration. En pratique, la durée des lectures est d'ailleurs toujours inférieure à l'intervalle de temps séparant la fin de la réaction dans deux plaques de titration successivement manipulées, compte tenu de la répartition des différents réactifs intervenant dans la réaction. Par ailleurs, plusieurs séries de tests ont été lues à l'œil nu, donnant dans tous les cas (répétition des lectures à quelques minutes d'intervalle par le même observateur ou bien lectures par des personnes différentes) des titres inchangés pour les sérums témoins positifs ou, dans moins de 5% des cas, des variations ne dépassant pas un degré de la gamme de dilution.

*Sensibilité de la réaction.* Elle peut être appréciée par les différences de DO obtenues pour des sérums témoins positifs ou négatifs. Ceci a été précisément étudié surtout pour 5 maladies — toxoplasmose, amibiase, trichinose, hydatidose et aspergillose — dans les conditions expérimentales et notamment avec les concentrations d'antigènes précédemment indiquées. Pour rendre plus stricte la spécificité des résultats obtenus (tableau 3), ces mesures ont été réalisées sur des sérums positifs dilués à 1/80 et sur des sérums négatifs (7 à 10 dans chaque cas) dilués à 1/20 seulement. Dans tous les cas, la sensibilité du test apparaît comme fortement augmentée avec l'orthotolidine, qui conduit à la différence de DO beaucoup plus importante entre les positifs et les

négatifs et permet par conséquent une lecture et une interprétation bien plus faciles des résultats.

#### CONCLUSION

Au total, l'emploi de l'orthotolidine comme nouveau substrat des réactions de micro-ELISA à la peroxydase paraît avantageux à plusieurs égards.

Par rapport à l'acide A-5 S, ce révélateur permet en effet un important gain de temps et de sensibilité du test ainsi qu'une économie considérable de réactifs antigéniques. Ce dernier avantage est particulièrement important en parasitologie où la plupart des antigènes sont rares et coûteux. C'est ainsi qu'il est possible, par cette méthode, d'étudier cinq dilutions différentes d'un sérum avec 1-5 µg seulement de protéines antigéniques. Ceci rendra maintenant accessibles certains sérodiagnostics jusqu'ici financièrement inabordables par d'autres méthodes avec l'emploi d'antigènes purifiés ou même de fractions antigéniques spécifiques.

Dans la mesure où il n'exige aucun matériel particulier et où ses résultats peuvent être lus à l'œil nu, ce test est parfaitement utilisable dans de petits laboratoires simplement équipés. Son emploi pour des enquêtes séro-épidémiologiques à partir de micro-prélèvements sanguins peut se heurter cependant encore à certaines difficultés (activité peroxydasique du sang total).

Inversement la réaction peut, dans les laboratoires spécialisés, être assez facilement automatisée, totalement ou partiellement. Sa lecture au spectrophotomètre apporte des données précises qui, dans certaines limites, peuvent rendre inutile la réalisation de gammes complètes de dilutions. Cependant, comme le soulignent justement Bullock & Walls (1), il est certainement illusoire de considérer comme suffisante une mesure de DO à une seule dilution des sérums. En effet, c'est suivant une sinusoïde et non sur une droite que se répartissent les DO obtenues pour les dilutions successives d'un échantillon sérique. Pour obtenir des données quantitatives acceptables, il sera donc probablement nécessaire de réaliser des mesures sur 2 ou 3 dilutions différentes, ce qui, de toute façon, peut correspondre à une économie considérable par rapport aux actuelles gammes de dilutions. C'est à la détermination de ces « dilutions-sentinelles » que nous nous attachons actuellement, tout comme à l'étude des conditions dans lesquelles des plaques de microtitration pourraient être sensibilisées à l'avance par des antigènes parasites et conservées dans des conditions les rendant immédiatement prêtes à l'emploi.

Tableau 3. Différences moyennes de densités optiques entre sérums témoins positifs et négatifs dilués à 1/80 (test de micro-ELISA avec l'orthotolidine ou l'acide amino-5 salicylique)

	Orthotolidine	Acide amino-5 salicylique
Toxoplasmose (18 sérums)	0,48 (0,34 à 0,73)	0,29 (0,15 à 0,53)
Amibiase (17 sérums)	0,94 (0,58 à 1,20)	0,41 (0,31 à 0,89)
Trichinose (17 sérums)	0,42 (0,23 à 1,05)	0,18 (0,06 à 0,74)
Hydatidose (17 sérums)	0,82 (0,35 à 1,04)	0,25 (0,13 à 0,25)
Aspergillose (19 sérums)	0,90 (0,81 à 1,16)	0,14 (0,09 à 0,21)

## REMERCIEMENTS

Nous remercions très vivement M. D. Monget, Laboratoire de l'Institut national des Sciences appliquées, Lyon, France, pour ses conseils et son assistance technique en matière d'enzymologie. Les antigènes *Plasmodium falciparum* et *Trichinella spiralis* nous ont été aimablement fournis, respectivement, par le Dr A. Voller, Nuffield Institute of Comparative Medicine, Londres, et M. E. J. Ruitenber, Institut national de la Santé publique, Bilthoven, Pays-Bas. Nous devons à l'amitié du Professeur M. Quilici, Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine de Marseille, les liquides hydatiques ayant permis la préparation des antigènes *Echinococcus granulosus*. Enfin, ce travail a été effectué avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> M. M. Lombard.

## SUMMARY

DIAGNOSIS OF PARASITIC DISEASES BY MEANS OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) USING A MODIFIED MICROMETHOD. 1. TECHNICAL ASPECTS

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has many of the advantages of indirect immunofluorescence and radioimmunity but could still be greatly improved. For this reason the authors studied a new peroxidase substrate—orthotolidine—and a new reading method using a Vernon spectrophotometer allowing a direct reading to be taken in the well of the microtitration plate. The method was compared with a method using 5-aminosalicylic acid as the substrate to visualize the peroxidase.

Compared with 5-aminosalicylic acid, orthotolidine made it possible to use 4–8 times less antigen, a 5-times greater dilution (1:2500) of the conjugate labelled with peroxidase, and a much shorter period of incubation; with orthotolidine it was also unnecessary to stop the coloration of the substrate by adding sodium bicarbonate.

In fact, the intensity of coloration increased up to 40 min and then decreased spontaneously. With a specially adapted spectrophotometer it was easy to automate the reading of the reaction during this period.

The sensitivity of the reaction was studied for five parasitic diseases. The 17 or so positive sera tested for each of the five diseases were diluted 1:80 and the 10 negative sera were diluted 1:20. In all cases the sensitivity of the test appeared to be markedly enhanced by orthotolidine, which gave rise to a greater difference in optical density between the positive and negative sera and allowed the results to be read and interpreted more easily.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BULLOCK, S. L. & WALLS, K. W. Evaluation of some of the parameters of the enzyme-linked immunospecific assay, *Journal of infectious diseases*, **136**: S279-S285 (1977).
2. MONGET, D. L'orthotolidine: un révélateur plus sensible de la peroxydase dans la méthode immunoenzymatique ELISA, *Annales de biologie clinique* (à paraître).
3. Le titrage avec immunoadsorbant lié à une enzyme (ELISA), *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, **55**: 557-568 (1977).
4. RUITENBERG, E. J. ET AL. Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays, *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, **51**: 108-109 (1974).
5. RUITENBERG, E. J. & BUYS, J. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of human african trypanosomiasis (sleeping sickness), *American journal of tropical medicine and hygiene*, **26**: 31-36 (1977).
6. VOLLER, A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease, *Lancet*, **1**: 426-428 (1975).
7. VOLLER, A. ET AL. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A review with a bibliography of microplate applications, Guernsey, Flowline Publications, 1977.