

COMPARAISON DE TECHNIQUES DE DEPISTAGE DES ANTICORPS ANTI-PALUDIQUES UTILISEES EN TRANSFUSION

C.P. SOLER, P. GEROME, B. SOULLIE, F. TISSEBRE, H. BEJAN, J. YVETOT, M. JOUSSEMET

Med Trop 2003; **63** : 587-589

RESUME • En France, dans le cadre de la transfusion sanguine, la sérologie du paludisme est le seul examen immunologique qui ne bénéficie pas de technique ELISA. Cet examen est actuellement réalisé par immunofluorescence indirecte et deux trousseaux sont commercialisés. Le réactif utilisé au Centre de transfusion sanguine des armées (CTSA) est le Falciparum-Spot IF™ (Bio-Mérieux). L'antigène utilisé est obtenu à partir d'une culture sur hématies de groupe A1, à l'origine d'une mauvaise spécificité par fixation des anticorps naturels. Du 1^{er} janvier au 15 octobre 2000, 55 dons ont été disqualifiés (soit 5,02 % des dons testés) pour sérologie antipaludique positive : 84 % étaient de groupe O. A partir de ces échantillons, une comparaison de la spécificité a été réalisée au moyen de trois autres techniques : le réactif utilisé au CTSA après élimination des anticorps naturels (par absorption et par neutralisation) et le réactif Paludix™ (Diagast). Ces trois techniques permettent un gain de spécificité supérieur à 87 %, mais l'élimination par absorption n'est pas sans conséquence sur la sensibilité. Depuis avril 2001 cet examen est réalisé avec l'ancien réactif mais après neutralisation par la substance de Witebski ; la perte de dons liée à cet examen n'est plus que de 1,62 % et la prévalence du groupe O n'est plus que de 53 %.

MOTS-CLES • Transfusion sanguine - Sérologie du paludisme - Immunofluorescence indirecte.

COMPARISON OF TECHNIQUES USED TO SCREEN BLOOD DONATIONS FOR MALARIA ANTIBODIES

ABSTRACT • In France all but one of the serological tests used to screen blood donations rely on ELISA-based techniques. The exception is malaria antibody detection that is performed by the indirect fluorescent antibody technique using commercially available kits. The reagent kit used at the French Army Blood Bank (FABB) is Falciparum-Spot IF™ (bioMérieux). However since the antigens in this kit are obtained from group A1 red blood cell cultures, false positive results can occur due to binding of natural antiglobulins. Over a 10-month period at the FABB, we disqualified a total of 55 donations (5.02% of total donations) because of positive Falciparum-Spot IF% test results. Most disqualified donations (84%) involved donations with group O red blood cells. In the present retrospective study, these 55 disqualified donations were used to compare the specificity of three other serological tests used for detection of malaria antibodies : Falciparum-SpotIF after elimination of natural antiglobulins by absorption and neutralization with Witebski reagent and Paludix™ (Diagast). Use of all three techniques provided a specificity gain of over 87 % but elimination using Witebski reagent led to a loss of sensitivity. At the FABB we have been using the Falciparum-Spot IF kit after elimination of natural antiglobulins since April 2001. Only 1.62 % of donations tested have been disqualified due to the presence of malaria antibodies including 52% with group O red blood cells.

KEY WORDS • Blood Transfusion - Detection of malaria antibodies - Indirect fluorescent antibody technique.

La qualification biologique des dons du sang repose sur des examens obligatoires, d'ordre immuno-hématologique et sérologique. Depuis le 1^{er} juillet 2001 les recherches du VIH-1 et du VHC sont également effectuées au moyen de méthodes moléculaires. Le dépistage des anticorps anti-paludiques fait appel à des techniques d'immunofluorescence indirecte (IFI)(1) et deux réactifs sont utilisés par les dix neuf plateaux de qualification biologique des Centres de Transfusion Sanguine (CTS). Cet examen n'est pas systé-

matique et n'est réalisé que pour les donneurs de sang ayant séjourné en zone d'endémie palustre depuis plus de 4 mois et jusqu'à la 3^e année après leur retour ; un séjour remontant à moins de quatre mois en zone d'endémie est une contre-indication absolue pour le don homologue. Du 1^{er} janvier au 15 octobre 2000, 1 400 dons homologues ont bénéficié de cet examen au Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA) et 55 ont été trouvés positifs avec le réactif Falciparum-Spot IF™ (Réf : 72 751, Bio-Mérieux). Si les donateurs de groupe O représentent 47 % de l'ensemble des dons pendant cette même période, 46 (84 %) des 55 sérums entrant dans l'étude se trouvent être de groupe O. La différence est statistiquement significative ($p < 0,01$) et ne peut résulter que d'une limite de la technique sérologique. Le but de notre travail a été de comparer les résultats obtenus sur les échantillons positifs (avec la méthode utilisée en routine) en utilisant trois autres méthodes :

- le kit Falciparum-Spot IF™ après déplétion des antiglobulines naturelles selon deux méthodes : une immuno-

• Travail du Service de qualification biologique du don (C.P.S., P.G., B.S., Y.J., Spécialistes du SSA ; F.T., Technicien Paramédical de Classe Normale ; H.B., Technicien Supérieur d'Etudes et Fabrication ; M.J., Professeur agrégé du SSA, Directeur du C.T.S.A.), C.T.S.A., Clamart, France.

• Correspondance: C.P. SOLER, Service de qualification biologique du don, Centre de Transfusion Sanguine des Armées, 1 Rue du Lieutenant Batany, BP 140, 92141 Clamart Cedex, France • Fax : 01 41 46 72 37

• E-mail : sih.ctsa@wanadoo.fr

• Article reçu le 5/06/2002, définitivement accepté le 8/12/2003.

Tableau I - Résultats de la recherche d'anticorps antipaludiques en immunofluorescence chez 55 donneurs de sang en fonction du réactif utilisé et du pré-traitement des échantillons.

Réactif	Pré-traitement des échantillons	Présence d'anticorps		
		Absence d'anticorps	au seuil de détection	supérieur au seuil de détection
Falciparum-Spot IF™	aucun	0	40	15
	congélation	7	34	14
	congélation + neutralisation	48	4	3
	congélation + absorption	52	2	1
Paludix™	congélation	4	5	2

absorption sur des hématies A1 ou une neutralisation par la substance de Witebsky ;

- un autre réactif d'IFI, récemment commercialisé (Paludix™, Diagast ; Réf : 72 751), où les hématies utilisées pour la culture du parasite sont de groupe O.

MATERIEL ET METHODES

Sérums de l'étude.

Les 55 sérums de l'étude proviennent de dons disqualifiés pour présence d'anticorps anti-paludéens mis en évidence avec le réactif Falciparum-Spot IF™ ; ceux-ci ont été congelés à - 80°C ; les échantillons après décongélation ont été traités dans la journée.

Traitement des sérums.

Neutralisation des antiglobulines naturelles (anti-A et anti-B) par la substance de Witebsky (Diagast ; Réf : 69 722) : les sérums sont mélangés avec la substance volume à volume et laissés en contact 2 heures à + 4°C. La substance de Witebsky contient des antigènes des groupes sanguins A et B ; elle est utilisée en immuno-hématologie afin de mettre en évidence d'éventuels anticorps immuns après neutralisation spécifique des anticorps naturels (2).

Absorption des anticorps naturels sur des hématies A1 : les hématies sont lavées 3 fois en PBS puis réparties en aliquote de 0,5 ml après avoir ramené l'hématocrite de la suspension à 50 % ; après dilution au 1/10 en PBS, 1 ml du sérum est réparti sur le culot d'hématies ; l'incubation est de 2 heures à 37°C au bain marie, après une dernière centrifugation le surnageant est testé.

Préparations des lames d'immunofluorescence.

Cette préparation s'est faite en fonction des recommandations des fournisseurs. Pour le kit Diagast, dilution de chaque sérum au 1/32 et au 1/64 (sérums non traités) ; pour le Falciparum-Spot IF™ dilution au 1/20 et au 1/40, en tenant compte des dilutions du sérum lors de la neutralisation. Pour cette dernière technique, l'étude des 55 sérums a été réalisée avec les sérums non traités, les sérums absorbés sur les hématies A1, les sérums neutralisés par la substance de Witebsky. Sur chaque lame un témoin négatif et un témoin positif titrant au 1/320 ont été inclus.

Critères d'interprétation.

Le seuil de positivité retenu est celui des fournisseurs : 1/40 pour le Falciparum-Spot IF™ et 1/64 pour Paludix™. Chaque lame est lue par trois opérateurs possédant une bonne expérience du microscope à fluorescence ; les positivités affirmées par au moins deux opérateurs ont été retenues et le titre a été effectué avec la même méthode de dépistage. Le vrai positif peut se définir comme le sujet effectuant un don de sang, ayant séjourné en zone impaludée depuis plus de quatre mois et moins de trois ans et porteur d'anticorps antipaludiques.

RESULTATS

L'ensemble des résultats est présenté sur le tableau I. Sur les 55 sérums positifs, 7 / 55 (12,7 %) sont retrouvés négatifs lors de l'utilisation de la même technique (sérum non traités) ; initialement leur titre était de 40 et les sujets de groupe O. Après absorption ou neutralisation des antiglobulines naturelles, les sérums se révèlent négatifs dans des proportions respectives de 94,5 % et 87 %. Quelle que soit la technique employée, les différences entre les résultats avec et sans traitement des sérums sont significatives ($p < 0,001$). Quarante huit (87 %) sont retrouvés négatifs avec le réactif Paludix™ ($p < 0,001$). Seulement trois sérums sont retrouvés positifs après absorption sur les hématies A1 ; par ailleurs le titre de ces échantillons apparaît moins élevé que pour les autres techniques (1 à 2 dilutions). Le titre du témoin positif se révèle également moins important après absorption (perte d'une dilution pour les trois opérateurs). Depuis mi-avril 2001 la technique associant la neutralisation des antiglobulines naturelles et le Falciparum-Spot IF™ a été validée dans notre service et est utilisée en routine pour le

Tableau II - Répartition des groupes sanguins des échantillons positifs en IFI anti-paludique et répartition des groupes sanguins testés pendant les deux périodes (en %).

Groupe Sanguin	O	A	B	AB
01/01/2000-15/04/2001				
- échantillons positifs	86	3	11	0
- échantillons testés(28 991)	44,5	42	9,5	4
16/04/2001-30/04/2002				
- échantillons positifs	53	38	9	0
- échantillons testés(21 999)	44,3	42	9,7	4

dépistage des anticorps anti-paludiques. L'amélioration de la spécificité de la technique a eu pour conséquence une meilleure gestion des réserves en produits sanguins labiles : du 1^{er} janvier 2000 au 15 avril 2001, 2248 dons ont bénéficié d'une sérologie antipaludique, 113 ont été rendus positifs (soit 5,02 %) ; du 16 avril 2001 au 30 avril 2002, seulement 29 dons ont été positifs (1,62 %) sur les 1792 testés (différence significative : $\chi^2 = 48$ avec $p < 0,001$). Le gain de spécificité est confirmé par une répartition des groupes sanguins apparaissant plus proche de celle observée au CTSA (Tableau II).

DISCUSSION

Actuellement le manque de sensibilité des techniques ELISA pour le dépistage des anticorps anti-paludiques ne permet pas leur utilisation en transfusion sanguine (3, 4) ; en effet la première qualité de la technique utilisée est la sensibilité qui doit tendre vers les 100 %. Ces techniques ne permettent que le dépistage des IgG spécifiques (5, 6).

En l'absence de standard, c'est l'IFI qui sert de référence. Un manque de spécificité est connue pour le réactif bioMérieux et s'expliquerait en grande partie par la culture de la souche de *Plasmodium falciparum* utilisée comme antigène sur des hématies de groupe A1 : les anticorps naturels anti-A peuvent se fixer sur les hématies parasitées et provoquer une fluorescence non spécifique de *P. falciparum*. Le fabricant recommande une absorption préalable sur des hématies A1 ; pour des raisons pratiques (manque de temps, de personnel) cette étape n'est pas réalisée au CTSA, comme dans les autres centres de transfusion utilisant ce kit (renseignement fourni par les autres CTS utilisateurs du kit). Sur les 55 sérums rendus positifs avec le Falciparum-Spot IFTM, 84 % provenaient de donneurs de groupe 0 ; cette sur-représentation suggère l'existence de faux positifs, source de disqualifications d'autant plus préjudiciables qu'il s'agit de donneurs universels. Il en est de même pour les sérums de groupe B ; ce groupe représentait 9 % des dons pendant la période de l'étude et 6 sérums étiquetés positifs présentaient ce groupe (11 %). Ces réactivités non spécifiques de *P. falciparum* s'expliqueraient par la fixation des anticorps naturels sur les hématies A1 et par l'utilisation d'un conjugué anti-immunoglobulines humaines totales.

Le kit PaludixTM permet un gain de spécificité non négligeable, sans traitement préalable des échantillons. L'existence de 15 puits réactionnels permet l'étude de six échantillons (2 dilutions) et la réalisation d'un témoin conjugué. Cependant au cours de l'étude il nous est apparu que l'importance de la densité des hématies fixées sur les puits est à l'origine d'images peu nettes et que la mise en place de la lamelle après dépôt de la glycérine est parfois associée à la formation de bulles d'air gênant la lecture.

L'absorption des sérums sur des hématies A1 est recommandée par le fournisseur pour le kit Falciparum-Spot IFTM ; les bonnes pratiques de qualification du don la préconisent aussi « en cas de réactivité et si nécessaire » (7). Cette technique est longue, pose des problèmes de faisabilité. Le nombre de dons récupérés est plus élevé par rapport aux autres techniques mais elle est à l'origine d'une chute des titres et peut faire craindre une perte de sensibilité.

La substance de Witebski a été utilisée au préalable pour traiter nos 55 sérums avec le kit FalciparumSpot IFTM ; les résultats sont identiques à ceux obtenus avec le réactif PaludixTM. Si les 2 heures de contact entre le sérum et la solution constituent un inconvénient pour leur mise en œuvre en pratique routinière, les images en fluorescence sont très nettes et aucune chute des titres de positivité n'est observée pour les échantillons rendus positifs.

Les techniques d'immuno fluorescence indirecte présentent de nombreux inconvénients vis à vis des techniques ELISA : outre l'importance de l'appréciation individuelle et l'absence de reproductibilité, elles souffrent d'un manque d'automatisation et de traçabilité (répartition manuelle des échantillons avec risques d'erreurs), notions essentielles en transfusion. Dans le cadre de la sérologie du paludisme, de nouvelles trousse ELISA, plus performantes car prenant en compte les IgM, sont en cours de fabrication et l'une d'entre elles sera validée dans notre laboratoire prochainement. L'introduction de ces techniques immunologiques permettrait un plus grand débit d'échantillons traités, élément à prendre en considération, compte tenu de l'augmentation constante du tourisme en zone d'endémie et de fréquentes missions outre-mer pour les militaires. Dans la pratique du CTSA, 8 % des dons homologues bénéficient de cet examen.

REFERENCES

- 1 - AMBROISE-THOMAS P, GOLVANY J - Paludisme. In « Les nouvelles techniques en parasitologie ». Flammarion Médecine-Sciences ed, Paris, 1990, pp 227-236.
- 2 - WATKINS WM - Blood group substances. *Science* 1966; **152** : 172-181.
- 3 - MERTENS G, VERVOORT T, HEYLEN S, MUYLLE L - Malaria antibody ELISA insufficiently sensitive for blood donor screening. *Vox Sang* 1999; **77** : 237-238.
- 4 - ASSAL A, KAUFFMANN-LACROIX C, RODIER MH *et Coll* - Comparaison de deux techniques de détection des anticorps anti-Plasmodium falciparum : Falciparum-spot IF (bioMérieux) et Malaria IgG Celisa (BMD). Résultats préliminaires. *Transfus Clin Biol* 1999; **6** : 119-123.
- 5 - CHIODINI PL, HARTLEY S, HEWITT PE *et Coll* - Evaluation of a malaria antibody ELISA and its value in reducing potential wastage of red cell donations from blood donors exposed to malaria, with a note on a case of transfusion-transmitted malaria. *Vox Sang* 1997; **73** : 143-148.
- 6 - Note 99/004 du 7 janvier 1999 de l'Agence Française du Sang.
- 7 - Arrêté du 4 janvier 1995 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de qualification biologique du don et pris en application de l'article L. 668-3 du Code de la santé publique (Chap. VI, 4). P.1620.