

## L'INTERET DES TESTS RAPIDES PAR IMMUNOCHROMATOGRAPHIE POUR LA SURVEILLANCE DES MALADIES A CARACTERE EPIDEMIQUE DANS LES PAYS EN DEVELOPPEMENT : L'EXEMPLE DE LA PESTE A MADAGASCAR

S. CHANTEAU, F. NATO, R. MIGLIANI

- Travail du Centre Collaborateur OMS (S.C., Docteur en Sciences, Directeur du CCOMS; R.M., Professeur agrégé du SSA), Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar et de l'Institut Pasteur (F.N., Docteur en Sciences), Paris, France.
- Correspondance : S. CHANTEAU, CERMES, BP 10887, Niamey, Niger.
- E-Mail : schanteau@cermes.ne

*Med Trop* 2003; **63** : 574-576

Dans les pays en développement (PED), la biologie est généralement le parent pauvre des politiques de santé nationale. Faute de ressources suffisantes, les moyens ont été prioritairement donnés aux programmes de prévention, de soins et d'éducation des populations. A l'exception de quelques rares PED bénéficiant de la présence de centres de recherches médicales, la carence en laboratoires de biologie est la règle générale. Depuis la fin des années 90, sous la forte impulsion de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces pays ont pris conscience de l'importance capitale de la biologie dans l'aide à la définition des stratégies de lutte contre les maladies infectieuses transmissibles, et en particulier les maladies à caractère épidémique. Ils ont ainsi adopté des résolutions de renforcement de la surveillance épidémiologique de ces maladies pour une meilleure préparation à la riposte contre d'éventuelles épidémies. Les nouvelles stratégies globales de surveillance intégrée attribuent aux laboratoires un rôle déterminant dans la chaîne d'alerte aux épidémies. De petits laboratoires de biologie ont été mis en place dans les structures sanitaires nationales, au niveau des districts voire des centres de santé.

En réalité et malheureusement, la plupart de ces laboratoires en périphérie ne sont pas fonctionnels. Les difficultés qui entravent leur bonne marche sont multiples, récurrentes et bien souvent identiques d'un pays à l'autre. Il s'agit de problèmes logistiques (irrégularité de l'électricité, absence de service de maintenance des équipements, rupture de chaîne de froid, irrégularité des approvisionnements...), d'insuffisance en ressources humaines (manque de techniciens et de biologistes, mobilité du personnel, manque de motivation), de l'absence de contrôle de qualité et de supervision. Par ailleurs, les contraintes cli-

matiques (humidité, forte chaleur, poussière) sont d'autres facteurs aggravants qui peuvent retentir sur la qualité des résultats rendus.

La panoplie des techniques biologiques de diagnostic des maladies infectieuses est large, allant de la recherche simple du pathogène par observation microscopique aux méthodes génétiques les plus sophistiquées (PCR, puces à ADN), en passant par la bactériologie classique et les méthodes immunologiques (agglutination, fluorescence, ELISA). Le choix des méthodes utilisables dans les PED doit prendre en considération non seulement les classiques critères de validité des tests mais également leur technicité, le coût des investissements et des consommables, la facilité de l'approvisionnement etc... Dans la pratique le biologiste doit trouver le meilleur compromis pour un environnement local donné.

### Quel test biologique pour les PED ?

Pour les PED, un test biologique doit être très sensible et spécifique (> 98 %), fiable, d'un coût acceptable (< 1 €), simple et rapide à réaliser, ne nécessitant aucun appareillage, reproductible, facile à interpréter, à expédier et à conserver (température ambiante). En résumé il doit être robuste.

Le test biologique idéal et parfait n'existe pas. Cependant, il s'est développé au cours de la dernière décade, des méthodes semi-rapides (dot blot, spot test, test en « peigne »), déjà largement adoptées par les PED pour le diagnostic par exemple de l'infection par le VIH ou par le virus de l'hépatite B. Bien que très sensibles et spécifiques, ce sont des tests immunoenzymatiques qui se font en plusieurs étapes et doivent être conservés à +4°C.

Plus récemment, des tests rapides en une seule étape ont été développés et commercialisés. Ils sont basés sur le principe de l'immunochromatographie avec des particules pré-colorées. Ces tests sont plus communément appelés test bandelette ou test savonnette.

### Les tests rapides

Ils sont basés sur le principe de l'immunochromatographie sur membrane avec des nanoparticules d'or colloïdal naturellement colorées en rose (Fig. 1). La phase mobile, migrant le long de la bandelette, est constituée de particules d'or préalablement conjuguées à un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène cible. L'anticorps de capture, fixé en un trait fin sur la membrane centrale de nitro-cellulose, sert à retenir et concentrer les particules d'or complexées à l'antigène cible éventuellement contenu dans l'échantillon à tester. Le contrôle

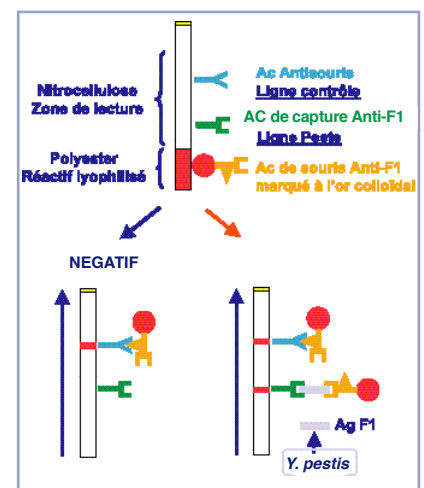


Figure 1 - Schéma de principe de l'immunochromatographie avec des particules d'or colloïdal. Exemple de la détection de l'antigène F1 de Yersinia pestis.

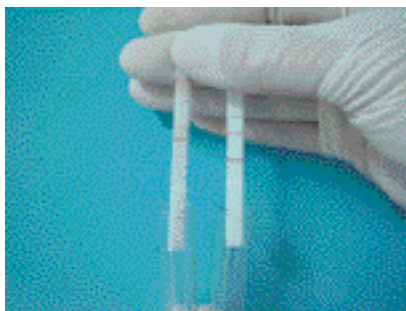


Figure 2 - Test rapide par immunochromatographie. Exemple de bandelettes négative et positive.

interne de la réaction est constitué par une deuxième ligne de capture des particules d'or conjuguées, sur la même bandelette. Après 10 à 15 minutes (Fig. 2), un résultat négatif se traduit par l'apparition d'un seul trait rose (ligne « contrôle »), tandis qu'un résultat positif apparaît en deux traits roses (ligne « contrôle » et ligne « test »).

Les tests immunochromatographiques peuvent se présenter sous forme de bandelettes nues ou encastrées dans un étui en plastique (plaquette, savonnette, carte). Avec les bandelettes, la réaction s'effectue en flux vertical dans un tube contenant 150 à 200 µl de l'échantillon à analyser. Pour les tests en plaquette, la réaction est réalisée en flux horizontal après introduction de l'échantillon biologique dans la fenêtre destinée à cet effet.

Les tests immunochromatographiques présentent de nombreux avantages :

- la praticabilité : généralement en une seule étape par simple introduction de l'échantillon biologique à tester dans un tube ou dans la fenêtre « échantillon » de la plaquette ;

- la rapidité et simplicité d'interprétation : lecture à l'œil nu après 10 à 15 minutes ;

- la très grande sensibilité : seuil de détection du même ordre que celui des tests ELISA (1 ng/ml) ;

- la très grande spécificité : grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux de très bonne qualité ;

- le contrôle de qualité intégré au test (trait « contrôle ») ;

- la facilité du transport et de la conservation grâce à leur stabilité à température ambiante (2 ans < 30°C) ;

- le test réalisable sur sérum, sang total, urine ou tout autre fluide biologique ;

- aucun appareillage nécessaire (utilisable dans les structures dépourvues d'électricité) ;

- le temps de formation du personnel très court (1 à 2 heures) ;

- la très bonne reproductibilité (peu de variation entre les manipulateurs).

Ces tests répondent pratiquement à toutes les exigences requises pour une utilisation en condition de terrain par du personnel non biologiste dans les dispensaires et les laboratoires de brousse. Les quelques faiblesses à relever sont :

- leur rapide altération en atmosphère humide. Ces tests doivent donc impérativement être conservés dans leur emballage fermé jusqu'au moment de leur utilisation ;
- l'absence de résultats quantitatifs.

Dans certains cas, l'observation de l'intensité du trait rose, par référence à une gamme de concentrations d'antigène cible, permet de rendre des résultats semi-quantitatifs.

## L'accessibilité aux tests rapides

A l'heure actuelle, les tests rapides commercialisés sont encore peu accessibles à large échelle aux PED car relativement chers (2 à 3 € par test). Ceci est vrai, si on compare leur prix à celui de l'examen microscopique. Mais, en contre partie, les tests rapides sont moins fastidieux, plus sensibles, et plus spécifiques. A l'inverse, ils sont 5 à 10 fois moins chers que les techniques de bactériologie classiques, les tests d'agglutination et les tests ELISA ou PCR. Cet avantage est encore accentué si l'on tient compte du temps nécessaire en personnel.

Pour réduire le coût de production, les tests rapides sont de plus en plus fabriqués sous licence dans les pays du Sud. Déjà pour des tests phares comme ceux pour le diagnostic du VIH et du paludisme, les tarifs proposés aujourd'hui sont de l'ordre de 1 €, considérés comme acceptables par les PED. Il est sans doute possible de négocier d'avantage pour des achats groupés importants.

De plus en plus de tests rapides sont disponibles sur le marché, mais ils ne concernent pratiquement que les maladies sévissant dans les pays du Nord, ou des maladies qui touchent un nombre important d'individus.

## Un test de diagnostic rapide de la peste humaine

En ce qui concerne les maladies infectieuses rares ou qui ne frappent que les pays à ressources limitées, peu d'industriels sont motivés pour investir dans le développement de nouveaux tests. C'est le cas de la peste humaine qui sévit encore dans une vingtaine de pays parmi les plus défavorisés. Elle ne touche que quelques milliers de personnes par an, mais son potentiel épi-



Figure 3 - Diagnostic rapide de la peste par un agent sanitaire malgache.

démique est très élevé si des mesures de lutte ne sont pas appliquées très rapidement. La peste est une maladie des rongeurs due à *Yersinia pestis* et transmise par leurs puces. On observe généralement une mortalité des rats précédant d'une dizaine de jours les premiers cas humains. Madagascar est un des foyers les plus actifs de peste dans le monde et près de 40 de ses 111 districts sanitaires sont touchés. Cette anthroponose sévit le plus souvent dans les régions très enclavées dépourvues de laboratoire. La confirmation bactériologique des cas suspects de peste n'est réalisée qu'au laboratoire de référence dans la capitale et nécessite un délai d'une semaine. Très souvent, il se passe 2 à 3 semaines avant que les prélèvements ne soient réceptionnés au laboratoire central. Or le succès de la lutte et de la prévention contre les épidémies dépendent de la précocité de l'alerte et de la riposte.

Afin d'améliorer le diagnostic de la peste, nous avons eu l'initiative de développer un test rapide de détection de l'antigène F1 très spécifique de *Y. pestis* (Fig. 1 et 3). En l'an 2000, ce test a été mis au point et évalué par les Instituts Pasteur de Madagascar et de Paris (1). Son excellente



Figure 4 - Diagnostic de la peste bubonique : ponction d'un bubon axillaire

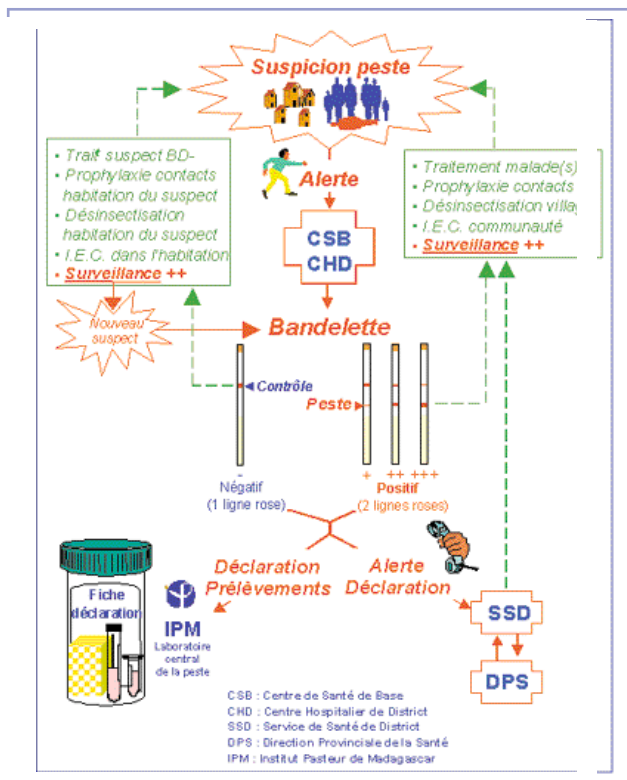


Figure 5 - Algorithme homme.

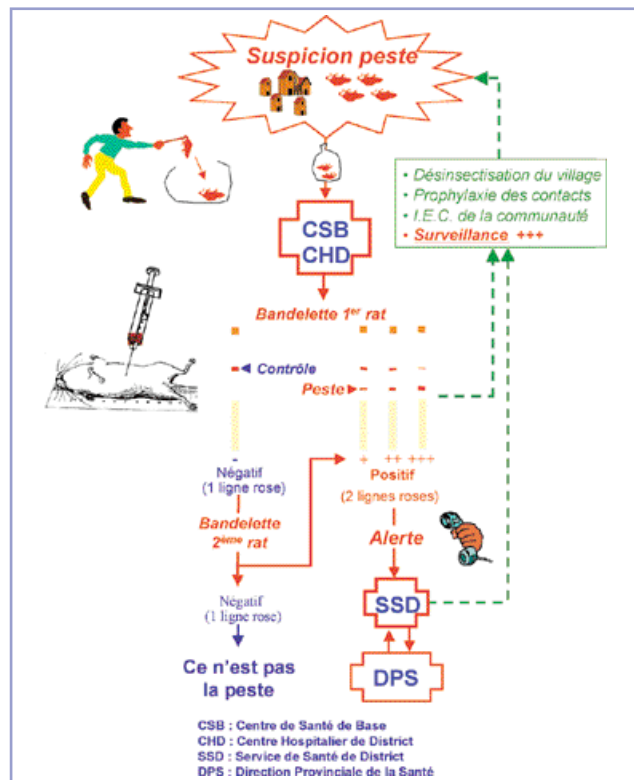


Figure 6 - Algorithme rat.

performance a été démontrée au laboratoire et sur le terrain pour le diagnostic des formes bubonique et pulmonaire de la maladie. Il permet désormais de dépister la peste au chevet des patients en une quinzaine de minutes dans les villages les plus reculés du pays (Fig. 4). Sa performance a également été démontrée pour le diagnostic étiologique de la peste sur des rats trouvés morts (2). L'utilisation de bandelette de diagnostic sur le terrain permet dans les deux cas de donner l'alerte et d'engager immédiatement les mesures de lutte et de prévention qui s'imposent : antibiothérapie pour le malade, mesures de prévention pour l'entourage et désinsectisation de l'environnement pour tuer les puces vectrices de la maladie. Il s'agit d'un progrès considérable pour la surveillance et la lutte contre cette maladie ré-

émergente, très souvent mortelle en l'absence d'un traitement précoce.

Au vu de ces résultats remarquables, le Ministère de la Santé malgache a décidé d'intégrer l'utilisation de ce test rapide dans son Programme National de Lutte contre la Peste. Deux algorithmes décisionnels ont été élaborés pour l'alerte précoce et la surveillance de la peste, l'un pour les malades (Fig. 5) et l'autre pour les rats morts (Fig. 6). Grâce à un prêt de la Banque Mondiale, une petite unité de production a été installée dans le laboratoire central de la peste à l'Institut Pasteur de Madagascar. Désormais opérationnelle, elle permet la fabrication des 5 000 à 10 000 kits de diagnostic (test bandelette et matériels de prélèvement) nécessaires au pays chaque année. En l'an 2002, nous avons formé une

centaine de responsables de santé qui à leur tour ont formé les agents sanitaires exerçant dans les centres de santé de base. Les bandelettes sont disponibles dans près de 400 centres de soins des hauts plateaux malgaches. La possibilité de faire bénéficier d'autres pays de ces kits est aujourd'hui à l'étude au sein de l'OMS et de l'Institut Pasteur de Madagascar.

Selon le même principe et la même démarche, nous avons également mis au point deux bandelettes pour le diagnostic du choléra, le sérotype universel O1 et le sérotype émergent O139. Ces deux tests ont été évalués avec succès à Madagascar et au Bangladesh (3, 4). D'autres tests sont en cours de développement pour la surveillance des maladies à caractère épidémique (méningites) ■

## POUR EN SAVOIR PLUS

- 1 - CHANTEAU S, RAHALISON L, RALAFIARISOA L *et Coll* - Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *The Lancet* 2003; **361** : 211-216.
- 2 - CHANTEAU S, RAHALISON L, RALAFIARISOA A *et Coll* - Un nouveau test de diagnostic rapide de la peste. Compte rendu de la Conférence Internationale sur la Peste, Juillet 2001, Marseille. 2003 (sous presse).
- 3 - NATO F, BOUTONNIER A, RAJERISON M *et Coll* - One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; **10** : 476-478.
- 4 - BHUIYAN NA, OADRI F, FARUQUE ASG *et Coll* - Rapid diagnosis of cholera cause by *Vibrio cholerae* O1 and O139 from rectal swabs using dipsticks. *J Clin Microbiol* 2003; **41** : 3939-3941.