



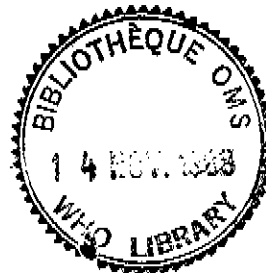
TROUSSE DE DIAGNOSTIC IMMUNO-ENZYMATIQUE RAPIDE DE LA RAGE<sup>1</sup>

Ce document décrit la composition et le mode d'emploi d'une trousse de diagnostic rapide de la rage par une technique immuno-enzymatique.

Cette technique, ainsi que la trousse, ont été développées par le Centre collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour la Rage, Institut Pasteur, Paris.<sup>2</sup> La spécificité et la sensibilité de la technique ainsi que la facilité d'emploi de la trousse ont été évaluées par ce centre au cours d'études réalisées en 1986 et 1987 auxquelles ont participé six laboratoires européens et nord américains, ainsi que 12 laboratoires situés dans différents pays d'Afrique, d'Amérique latine, et d'Asie (voir paragraphe 5). La technique s'est ainsi avérée être d'une sensibilité et spécificité comparables à celles de l'épreuve d'immunofluorescence directe.

De part sa facilité d'emploi et de lecture des résultats qui peut se faire à l'oeil nu, la trousse peut-être tout particulièrement utilisée lors de la réalisation d'enquêtes épidémiologiques intéressant un grand nombre de prélèvements ainsi que dans les laboratoires qui ne pratiquent pas les techniques d'immunofluorescence.

Ce document s'adresse au personnel des laboratoires de diagnostic de la rage.



<sup>1</sup> par H. Bourhy, P. Perrin et P. Sureau, Centre collaborateur OMS de Référence et de Recherche sur la Rage, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cédex 15, France

<sup>2</sup> P. Perrin, P.E. Rollin et P. Sureau. A Rapid Rabies Enzyme Immunodiagnosis (RREID): A useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies, *J. Biol. Stand.*, 1986, 14, 217-222.

This document is not issued to the general public, and all rights are reserved by the World Health Organization (WHO). The document may not be reviewed, abstracted, quoted, reproduced or translated, in part or in whole, without the prior written permission of WHO. No part of this document may be stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means - electronic, mechanical or other without the prior written permission of WHO.

The views expressed in documents by named authors are solely the responsibility of those authors.

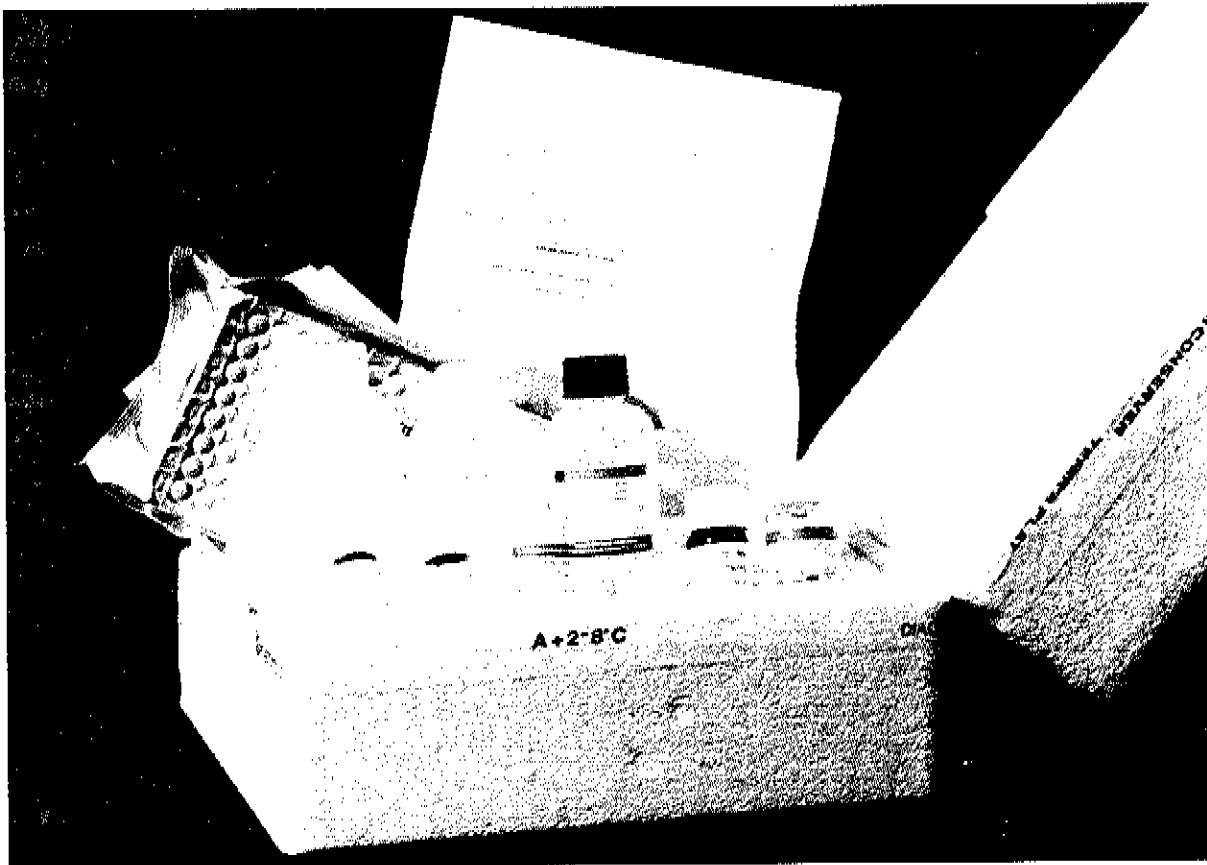
Ce document n'est pas destiné à être distribué au grand public et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Il ne peut être commenté, résumé, cité, reproduit ou traduit, partiellement ou en totalité, sans une autorisation préalable écrite de l'OMS. Aucune partie ne doit être chargée dans un système de recherche documentaire ou diffusée sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit - électronique, mécanique, ou autre - sans une autorisation préalable écrite de l'OMS.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

1. LA TROUSSE DE DIAGNOSTIC

1.1 Composition

FIGURE 1



La trousse de diagnostic se présente sous la forme d'un emballage isotherme de polystyrène contenant une notice d'explication et tous les réactifs nécessaires à la réalisation de l'épreuve (voir Figure 1). La nature et la présentation de chaque réactif sont précisées ci-dessous. Chaque constituant de la trousse porte une étiquette mentionnant le code (R1 à R10).

- R 1 1 microplaque de 96 cupules. Les cupules sont sensibilisées avec des anticorps antinucléocapside purifiés. La plaque est placée dans une enveloppe d'aluminium scellée sous vide. La plaque peut être divisée en 6 barrettes de 16 puits chacune.
- R 2 1 flacon de solution de lavage (20 fois concentrée).
- R 3 1 flacon d'antigène négatif de contrôle (surnageant lyophilisé d'un broyat de cerveau de souris non-infectée).
- R 4 1 flacon d'antigène positif de contrôle (surnageant lyophilisé d'un broyat de cerveau de souris infectée avec la souche rabique CVS).
- R 5 1 flacon d'anticorps antinucléocapside conjugué à la peroxidase (10 fois concentré).
- R 8 1 flacon de mélange tampon de réaction enzymatique et substrat.

- R 9 1 flacon contenant 8 pastilles de chromogène (O-phénylène-diamine).  
R 10 1 flacon de solution d'arrêt de la réaction enzymatique (acide sulfurique 4N).

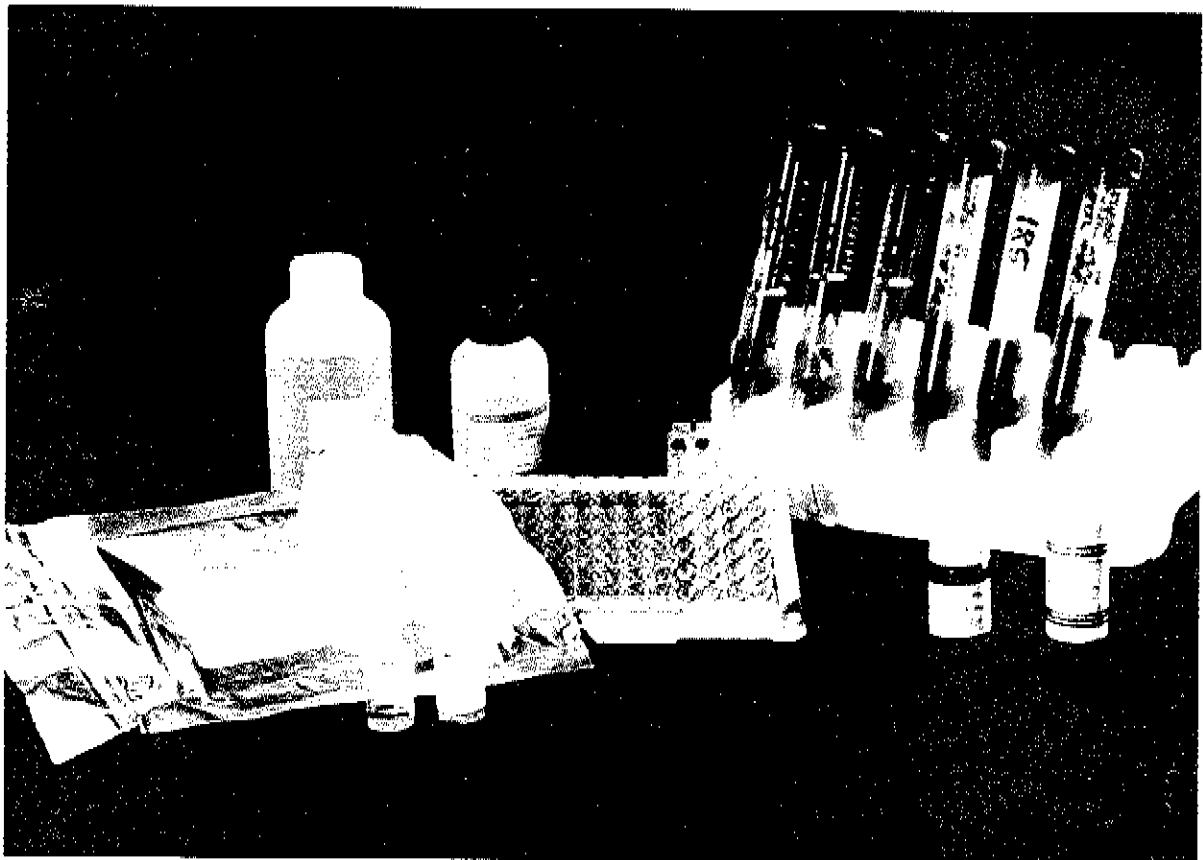
1.2 Conditions de stockage et dates de péremption

La trousse doit être stockée à 4°C. S'il n'a pas été reconstitué et s'il est gardé à 4°C, chaque constituant de la trousse peut être conservé jusqu'à la date stipulée sur l'étiquette placée sur l'emballage.

2. RECONSTITUTION DES REACTIFS

Couper l'emballage aluminium contenant la microplaque sensibilisée (R1) et retirer le nombre désiré de barrettes. Refermer le sachet et conserver les barrettes non-utilisées à 4°C (voir Figure 2).

FIGURE 2



Diluer 20 fois la solution de lavage (R2) dans de l'eau distillée avant utilisation.

Reconstituer l'antigène négatif de contrôle (R3 - inactivé par la bêta-propiolactone) avec 1 ml d'eau distillée.

Reconstituer l'antigène positif de contrôle (R4 - inactivé par la bêta-propiolactone) avec 1 ml d'eau distillée.

Diluer 10 fois l'anticorps antinucléocapside conjugué à la peroxydase (R5) avec la solution de lavage (R2) et définir les volumes à préparer en fonction des besoins.

Le tampon de réaction (R8) - Citrate 0,05 M pH = 5,6; Eau oxygénée 0,03%; et Merthiolate de sodium 0,01% - est prêt à l'emploi.

Dissoudre une pastille de chromogène (R9 - ortho-phénylène-diamine) dans 15 ml de tampon citrate (R8) en se servant de la pince en plastique de la trousse pour saisir les pastilles.

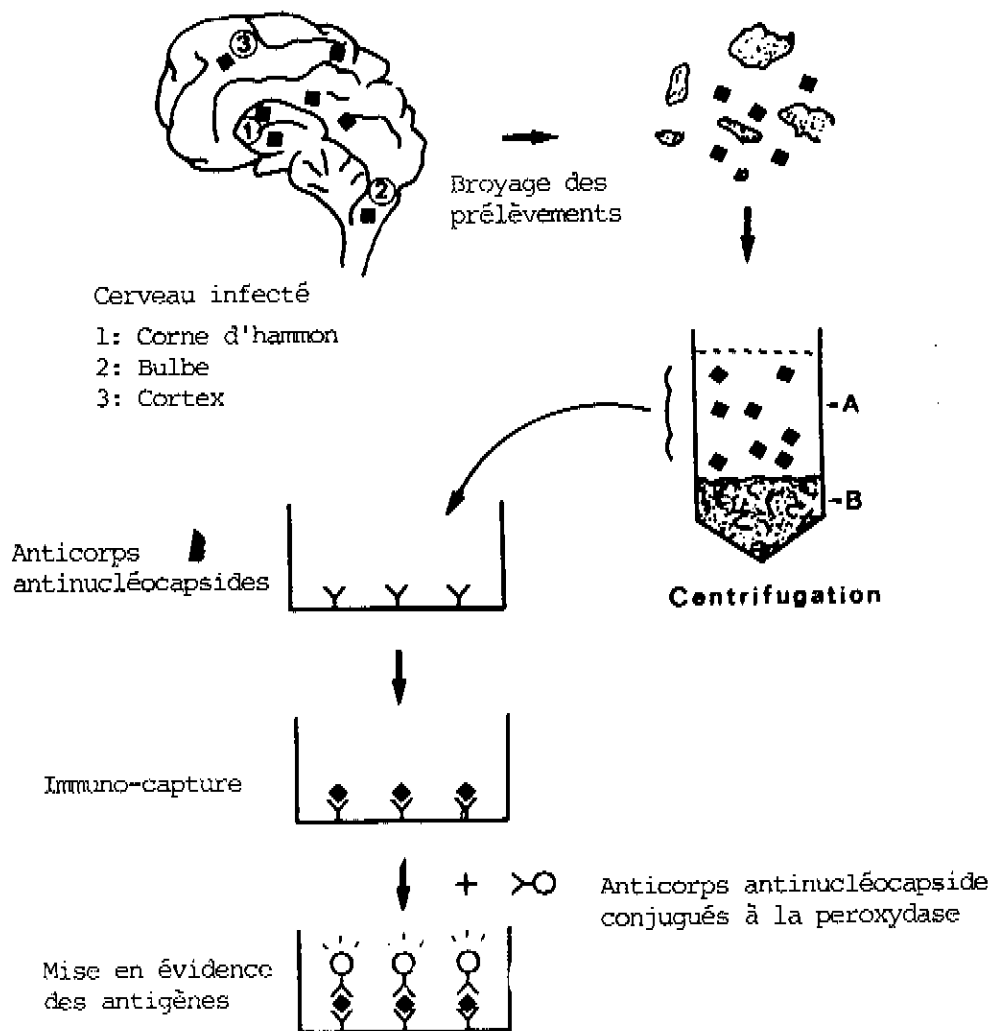
La solution d'arrêt (R10 - acide sulfurique 4N) est prête à l'emploi.

### 3. MODE OPERATOIRE

#### 3.1 Principe (voir Figure 3)

Les prélèvements de cerveau sont broyés dans une solution saline tamponnée puis clarifiés par centrifugation. Les surnageants sont ensuite placés en incubation dans les cupules sensibilisées avec des anticorps anti-nucléocapside rabique. La présence éventuelle de nucléocapside rabique dans les prélèvements est ensuite révélée par des anticorps antinucléocapside couplés à la peroxydase. L'apparition d'une coloration jaune après addition du mélange substrat-chromogène signe la présence de nucléocapside rabique dans le prélèvement.

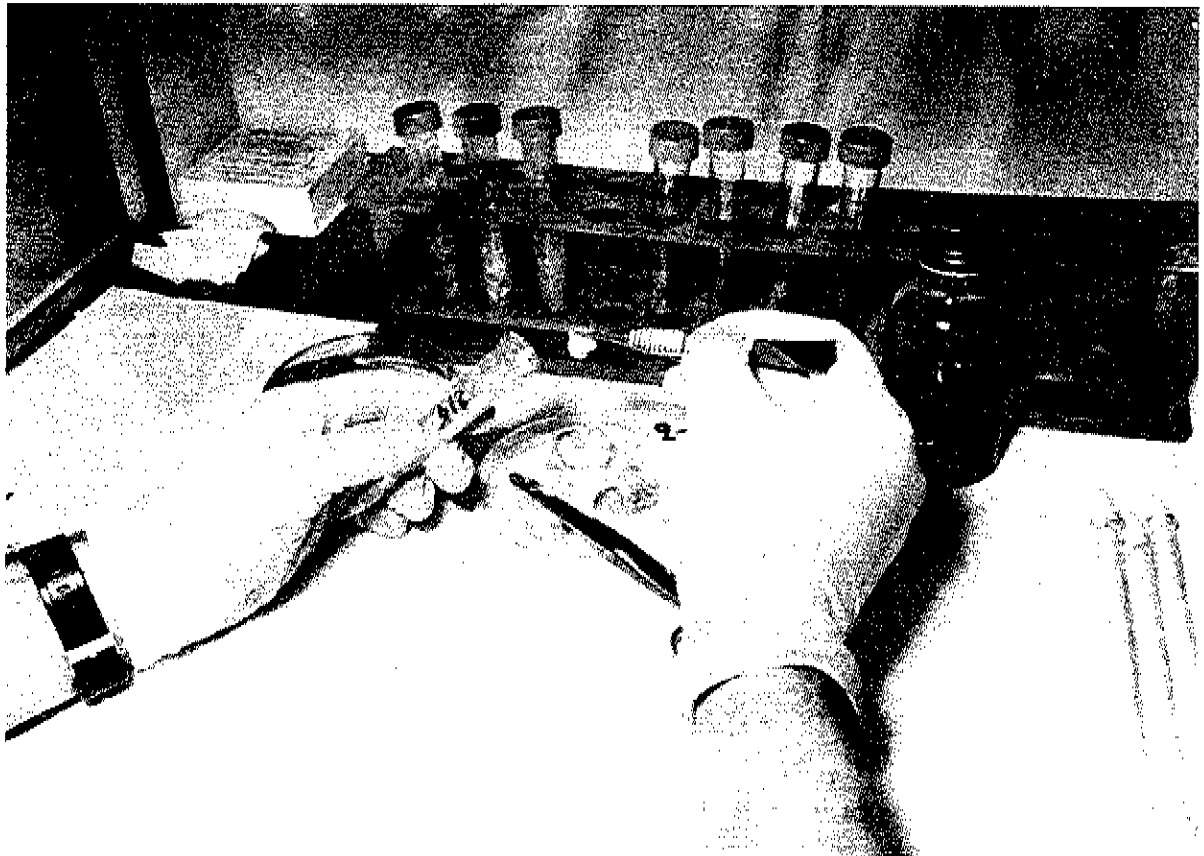
FIGURE 3



### 3.2 Préparation des prélèvements

Un morceau de bulbe, de cortex et de corne d'Ammon de chaque cerveau\* sont mélangés et broyés à 30% (poids/volume) dans du milieu de culture, du tampon phosphate pH=7,2 ou la solution de lavage R2 (voir Figure 4). Les prélèvements sont ensuite centrifugés à 3000 tours par minute pendant 20 minutes pour éliminer les plus gros fragments de matière cérébrale. Le surnageant clair sera utilisé pour la suite de l'épreuve. Ce surnageant peut être inactivé par la chaleur (séjour de 2 heures au bain-marie à 56°C).

FIGURE 4



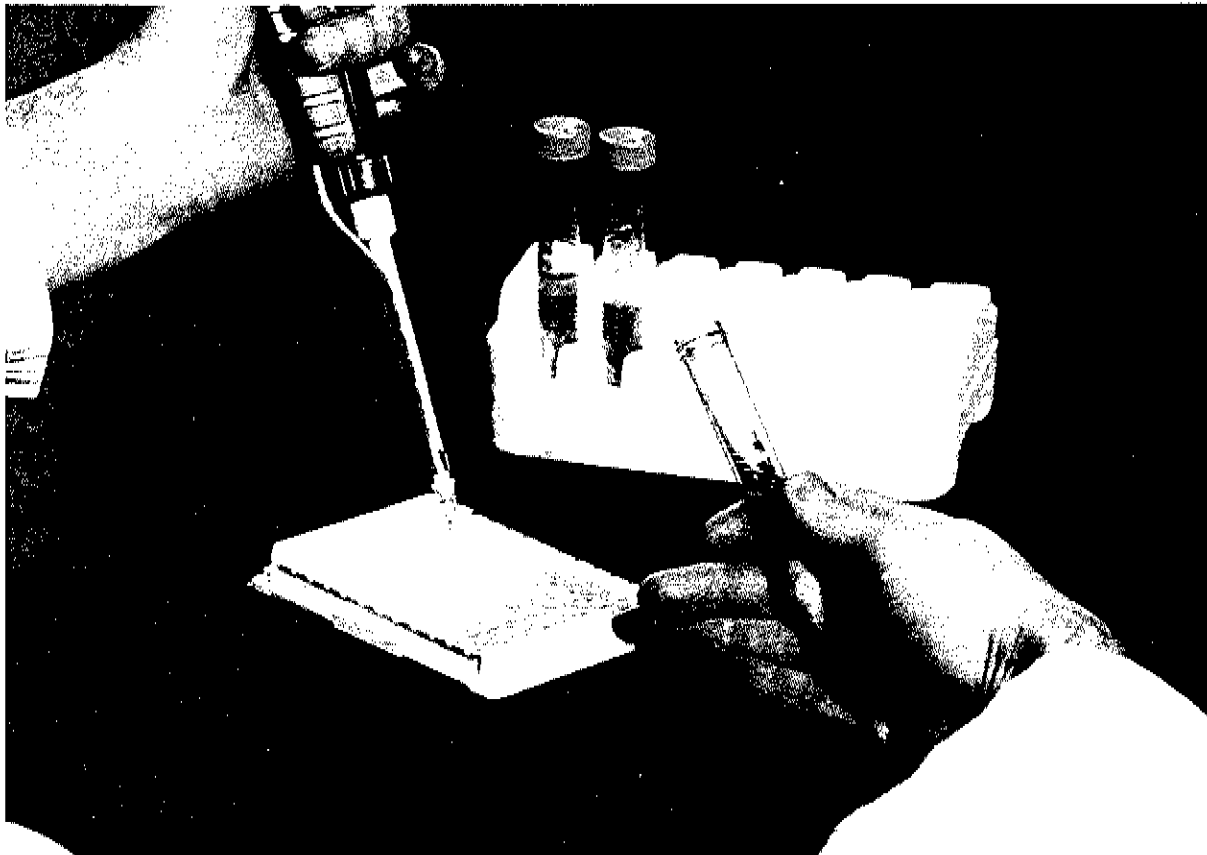
---

\* La manipulation du cadavre d'un animal suspect de rage ne doit être faite que par un personnel vacciné. Le port de gants, de lunettes et d'un masque par l'opérateur est vivement recommandé.

### 3.3 Réalisation du test

(a) Répartir dans la microplaque, à raison de 200 ul par cupule, les témoins négatifs (R3) et positifs (R4), ainsi que des surnageants des différents prélèvements à tester (Figure 5). En cas d'utilisation d'un lecteur de plaques automatique, la première rangée de cupules qui servira de témoin "blanc" pour la lecture au photomètre reçoit 200 ul de solution de lavage R2.

FIGURE 5



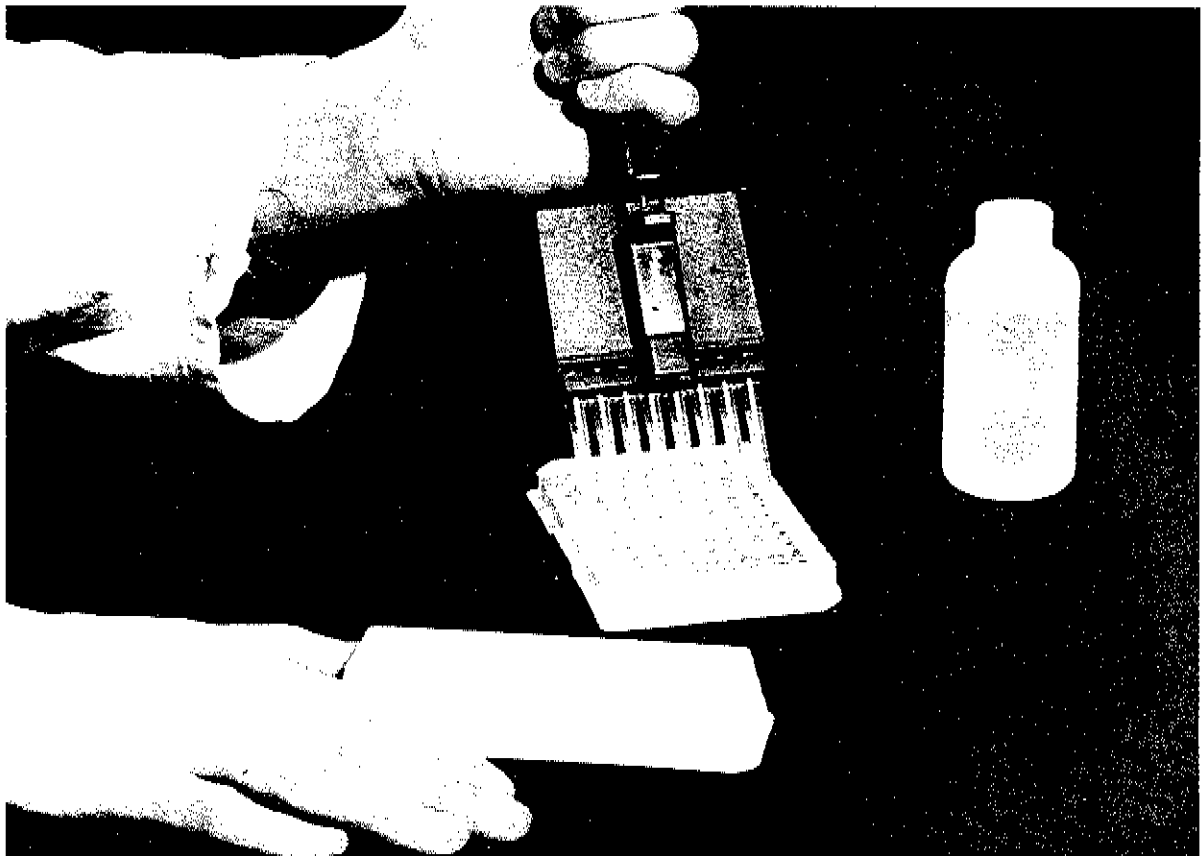
(b) Incuber la microplaque en atmosphère humide à 37°C pendant une heure.

(c) Eliminer les produits de la plaque par aspiration\* et laver les cupules avec la solution de lavage R2 (Figure 6). Pratiquer au moins 5 lavages.

---

\* Attention: Ces produits sont potentiellement virulents. Les liquides aspirés doivent être recueillis dans un récipient contenant un désinfectant (eau de Javel).

FIGURE 6



- (d) Répartir dans chaque cupule 200 ul d'anticorps anti-nucléocapside conjugué à la peroxydase (R5).
- (e) Incuber la microplaque en atmosphère humide à 37°C pendant une heure.
- (f) Eliminer le conjugué de la plaque par aspiration et laver les cupules avec la solution de lavage. Pratiquer au moins 6 lavages.
- (g) Répartir dans chaque cupule 200 ul du mélange substrat chromogène (R8 + R9).
- (h) Laisser la coloration se développer à l'obscurité et à la température du laboratoire.
- (i) Arrêter la réaction, au bout de 20 à 30 minutes selon la rapidité de la coloration, par addition de 50 ul de solution d'arrêt (R10) dans chaque cupule.
- (j) Lire, selon les besoins et l'équipement, la coloration à l'oeil nu ou au photomètre à 492nm.

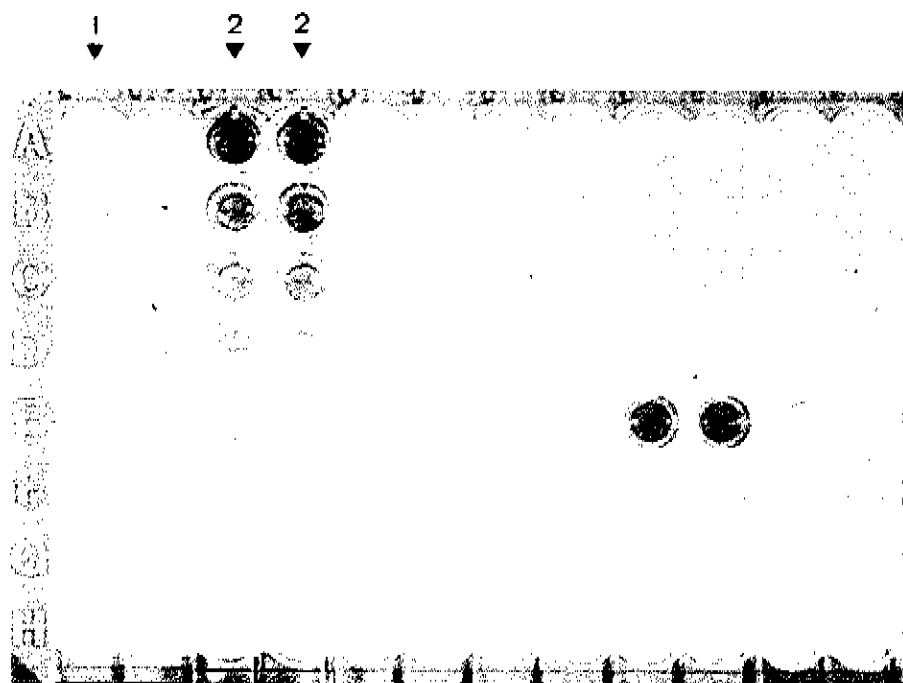
#### 4. INTERPRETATION DES RESULTATS

##### 4.1 Lecture à l'oeil nu (Figure 7)

Le contrôle positif est fortement coloré en jaune.

Tout prélèvement qui donne une coloration jaune est considéré comme positif (le contrôle négatif ne doit pas être coloré). Cette lecture rapide est souvent suffisante pour porter le diagnostic de la rage. Elle a surtout l'avantage de ne nécessiter aucun équipement.

FIGURE 7



1 : Témoin négatif

2 : Dilution en série du témoin positif

##### 4.2 Lecture au photomètre

Il faut tout d'abord s'assurer de la validation du test, c'est à dire, que le contrôle positif présente une densité optique (DO) supérieure à 1,5 unité et le contrôle négatif une DO inférieure à 0,1 unité. On obtient ensuite la valeur minimale de positivité en ajoutant 0,080 unité à la DO enregistrée pour le contrôle négatif.

## 5. EVALUATION DE LA TECHNIQUE

### 5.1 Spécificité et sensibilité

Six laboratoires européens et nord-américains, dont quatre Centres collaborateurs OMS ont testé 1253 prélèvements provenant de 27 espèces animales et de 10 origines géographiques différentes.<sup>1</sup>

Les résultats obtenus avec la trousse de diagnostic immunoenzymatique ont été comparés à ceux obtenus par le test des anticorps fluorescents. Les deux techniques ont donné le même résultat pour 1220 échantillons. La concordance des techniques est donc de 97,4% (voir tableau 1). Cependant, la technique immunoenzymatique s'est révélée légèrement moins sensible que l'épreuve d'immunofluorescence. A la demande de l'Organisation, le Centre collaborateur OMS de Paris a fait évaluer la technique par des laboratoires de diagnostic de la rage situés dans différents pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique latine. Douze laboratoires ont communiqué leurs résultats (voir tableau 2). La concordance entre les deux techniques a été de 96,31%.<sup>2</sup> Ces résultats confirment donc ceux obtenus au cours de la première phase de l'évaluation.

Enfin, le Centre national de Référence pour la Rage de l'Institut Pasteur de Paris a étudié 1755 prélèvements pour lesquels la concordance entre la technique immunoenzymatique et l'immunofluorescence a été de 98,9%. Des détails sont donnés dans le tableau 3 pour les 1007 premiers prélèvements traités par cette technique.

### 5.2 Facilité de mise en oeuvre

L'ensemble de ces travaux d'évaluation confirme par ailleurs que la technique est facile à mettre en oeuvre, rapide et d'interprétation aisée. Le temps nécessaire à l'obtention du résultat par cette technique, comparé à ceux exigés dans les autres méthodes de diagnostic de laboratoire est donné dans le schéma No 1, placé en annexe.

### 5.3 Coût

Comparée à l'immunofluorescence, la technique nécessite peu d'investissement en matériel spécifique pour être mise en oeuvre, la lecture directe donnant satisfaction. D'un autre côté, le prix de revient par échantillon examiné, lorsqu'une cupule seulement est utilisée, est légèrement supérieur à celui de l'immunofluorescence.

#### - Coût d'investissement

Le coût du matériel de laboratoire nécessaire à l'exécution de la technique est inférieur à US \$2500 lorsque la lecture est faite par observation directe. Lorsqu'un photomètre est utilisé le coût s'élève à environ US \$9000. Ces coûts, qualifiés de minimum et maximum sont montrés dans le schéma No 2 en annexe et comparés à ceux des autres techniques courantes de diagnostic de la rage.

<sup>1</sup> Results of a collaborative study of an experimental kit for the Rapid Rabies Enzyme Immunodiagnosis, P. Perrin and P. Sureau, WHO Bulletin, 4, 1987, 489-493

<sup>2</sup> Résultats de la technique RREID obtenus par divers laboratoires de diagnostic d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie, P. Sureau et H. Bourhy (soumis pour publication dans le Bulletin de l'OMS), 1988

- Coût d'un diagnostic

Le prix d'une trousse (commercialisée par Diagnostics Pasteur) est d'environ US \$185. L'examen d'un prélèvement revient à environ US \$2 en point simple (1 cupule). Une comparaison des coûts d'un examen selon la technique mise en oeuvre est donnée sur le schéma No 3 en annexe.

6. CONCLUSION

La technique de diagnostic immuno-enzymatique de la rage présente une spécificité et sensibilité comparable à celle de l'immuno-fluorescence directe. Elle s'avère rapide et facile à mettre en oeuvre. Elle permet, en outre, de porter un diagnostic sur des prélèvements dans un état de putrefaction avancée.

Etant donné que la lecture directe donne satisfaction, cette technique nécessite moins d'investissement en matériel spécifique que l'immuno-fluorescence.

L'utilisation de cette technique peut être recommandée dans les conditions de la pratique

- soit comme épreuve de confirmation de l'immuno-fluorescence (qui comporte toujours un élément subjectif lors de la lecture au microscope);
- soit comme l'épreuve de choix lorsqu'un grand nombre de prélèvements doivent être examinés (études épidémiologiques);
- ou bien comme substitut de l'immuno-fluorescence pour les laboratoires qui ne disposent pas de l'équipement requis pour la pratiquer.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier vivement Mademoiselle Florence Durand pour la réalisation des photographies, ainsi que le Docteur Jacques Barrat pour celle des schémas.

TABLEAU 1. CONCORDANCE ENTRE LES RESULTATS DES TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES  
ET DES ANTICORPS FLUORESCENTS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA RAGE  
(CAS DE SIX LABORATOIRES EUROPEENS ET NORD-AMERICAINS)

Laboratoire	Total d'échan- tillons	Nombre d'échantillons				Concordance* %
		+FAT +RREID	-FAT -RREID	+FAT -RREID	-FAT +RREID	
A	155	79	66	10	0	93.3
B	130	39	89	1	1	98.5
C	474	115	352	4	3	98.5
D	199	150	41	1	7	96.0
E	39	34	1	4	0	89.7
F	256	234	20	2	0	99.2
Total :	1253	651	569	22	11	97.4

$$* \text{Concordance} = \frac{\text{nombre des positifs avec les deux techniques} + \text{nombre de négatifs avec les deux techniques}}{\text{nombre total de prélèvements examinés}} \times 100$$

TABLEAU 2. COMPARAISON DES RESULTATS DE LA TECHNIQUE D'IMMUNOENZYMATIQUE ET DE L'EPREUVE DES ANTICORPS FLUORESCENTS (CAS DE 12 LABORATOIRES SITUES DANS DIFFERENTS PAYS D'AFRIQUE, D'AMERIQUE LATINE, ET D'ASIE

Laboratoire	Total	+RREID + IF	+RREID - IF	-RREID + IF	-RREID - IF
1	93	73	0	3	17
2	94	37	0	3	54
3	50	28	0	0	22
4 A	68	47	0	11	10
4 B	63	31	0	1	31
5	78	23	1	1	53
6	87	17	0	0	70
7	42	28	0	0	14
8	34	13	0	0	21
9	30	9	0	1	20
10	12	8	1	1	2
11	64	27	0	1	36
12	103	87	3	0	13
Total :	818	428	5	22	363

Concordance RREID avec IF :  $704/731 = 96,69\%$

Spécificité RREID/IF :  $428 \text{ IF+}/433 \text{ RREID+} = 98,84\%$

Sensibilité RREID/IF :  $433 \text{ RREID+}/450 \text{ IF+} = 96,22\%$

TABEAU 3.

Corrélation entre les résultats obtenus par immunofluorescence directe (IF), par isolement sur culture de neuroblastomes ( $N_{2a}$ ) et par le test de diagnostic immuno-enzymatique rapide de la rage (RREID).

		NOMBRE DE PRELEVEMENTS				IF -	
		IF +		IF -			
$N_{2a} +$	$N_{2a} -$	$N_{2a} +$	$N_{2a} -$	$N_{2a} +$	$N_{2a} -$	$N_{2a} +$	$N_{2a} -$
RREID +	RREID -	RREID +	RREID -	RREID +	RREID -	TOTAL	TOTAL
169	4	7	9	0	2	816	1007

IF +/IF - = Résultat en Immunofluorescence directe sur calque.

$N_{2a+}/N_{2a-}$  = Résultat de l'isolement sur culture de neuroblastomes ( $N_{2a}$ ).

RREID+/RREID--= Résultat avec le test de diagnostic immuno-enzymatique rapide de la rage.

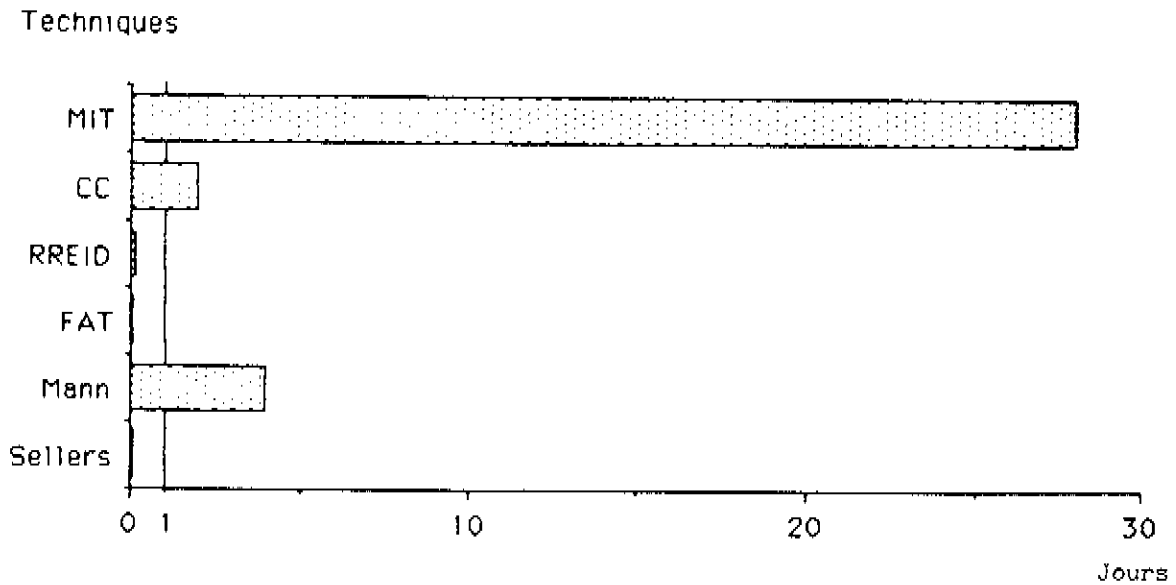
	RREID	$N_{2a}$	
- Concordance avec IF <sup>(a)</sup> (%)	98,51	98,41	
- Sensibilité <sup>(b)</sup> (%)	93,12	91,53	(on définit V.P par vrais positifs, V.N par vrais négatifs, F.P par faux positifs et F.N par faux négatifs, et la prévalence (%) = 18,77).
- Spécificité <sup>(c)</sup> (%)	99,76	100	
- Valeur prédictive positive <sup>(d)</sup> (%)	98,95	100	
- Valeur prédictive négative <sup>(e)</sup> (%)	98,43	98,08	

(a) =  $V.P. + V.N./\text{Nombre de prélèvements}$  - (b) =  $V.P. / (V.P. + F.N.)$  - (c) =  $V.N. / (V.N. + F.P.)$ .

(d) =  $[(\text{prévalence}) (\text{sensibilité})] / [(\text{prévalence}) (\text{sensibilité}) + (1-\text{prévalence}) (1-\text{spécificité})]$ .

(e) =  $[(1-\text{prévalence}) (\text{spécificité})] / [(\text{prévalence}) (1-\text{sensibilité}) + (1-\text{prévalence}) (\text{spécificité})]$ .

SCHEMA No 1. COMPARAISON DES DUREES NECESSAIRES A L'OBTENTION  
DES RESULTATS PAR DIFFERENTES TECHNIQUES



MIT = Inoculation à la souris

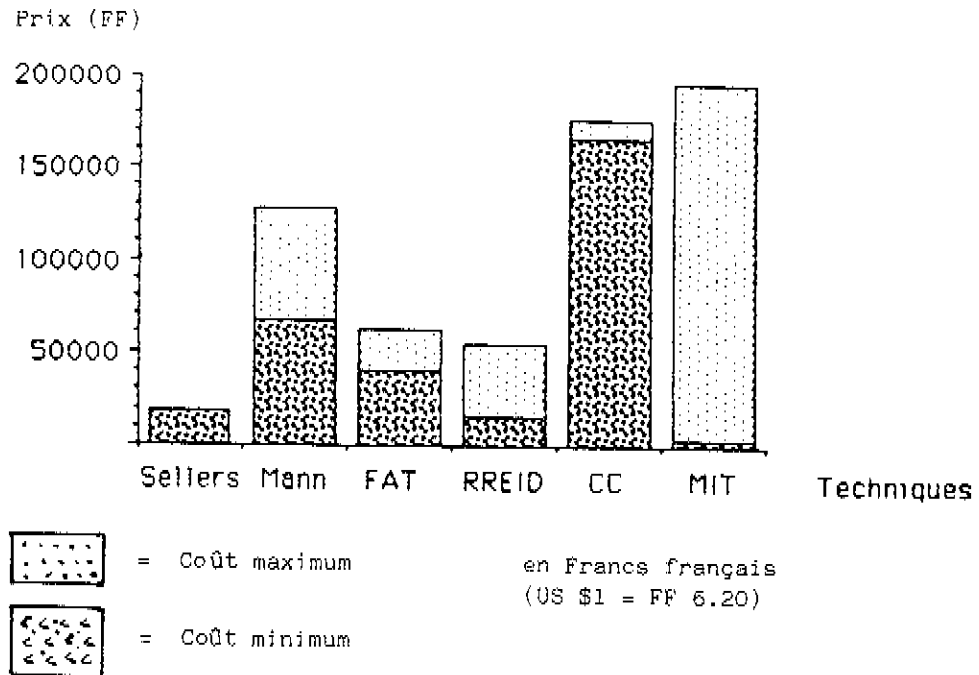
CC = Culture cellulaire

RREID = (Rapid Rabies Enzyme Immuno-Diagnosis) = Technique de diagnostic immuno-enzymatique rapide de la rage

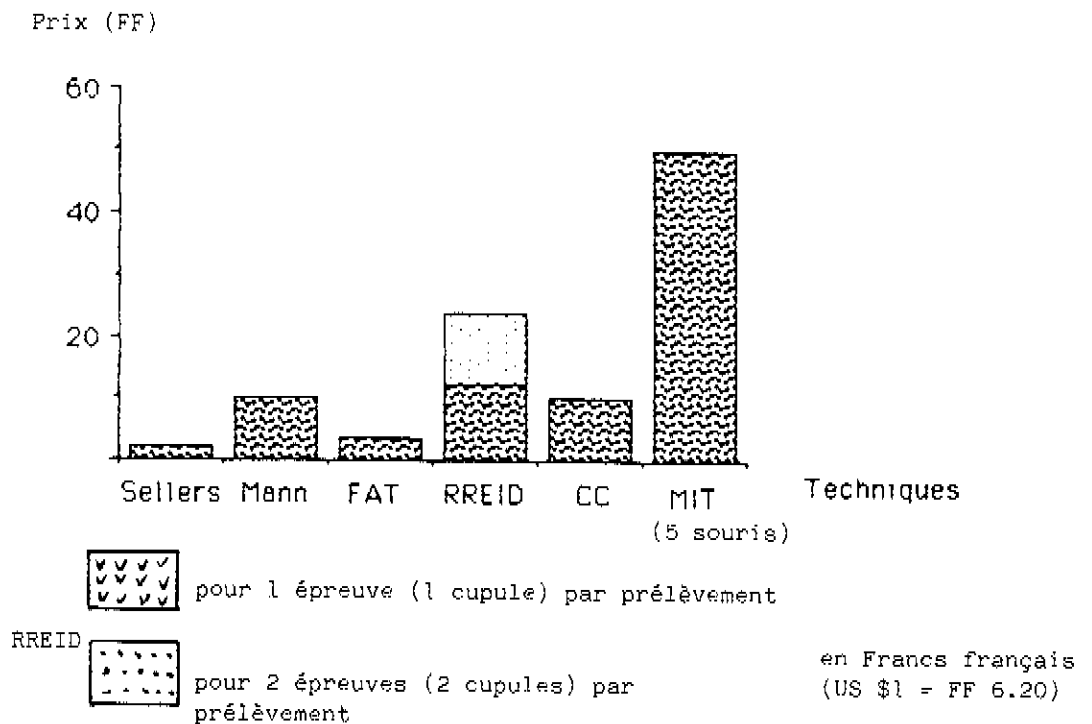
FAT = Epreuve des anticorps fluorescents

Mann  
Sellers = Techniques histologiques

SCHEMA No 2. COMPARAISON DES COUTS DU MATERIEL DE LABORATOIRE NECESSAIRE A LA MISE EN OEUVRE DE DIFFERENTES TECHNIQUES



SCHEMA No 3. COMPARAISON DES COUTS DE L'EXAMEN D'UN PRELEVEMENT SUSPECT, SELON LA TECHNIQUE MISE EN OEUVRE



\*\*\*\*\*