

Apport de la technique Western blot dans le diagnostic de l'hydatidose.

F. Makni (1), L. Hachicha (1), F. Mseddi (1), H. Hammami (1), F. Cheikhrouhou (1), H. Sellami (1), A. Sellami (1), R. Mzali (2), S. Boujelbène (2), R. Rebaï (3), I. Beyrouti (2) & A. Ayadi (1)

(1) Laboratoire de parasitologie-mycologie, CHU Habib-Bourguiba, Sfax, Tunisie. Tél. / fax : 00216 74 247130, e-mail : ali.ayadi@rns.tn

(2) Service de chirurgie générale, CHU Habib-Bourguiba, Sfax, Tunisie.

(3) Service de neuro-chirurgie, CHU Habib-Bourguiba, Sfax, Tunisie.

Manuscrit n° 2952. "Parasitologie". Reçu le 27 avril 2006. Accepté le 12 décembre 2006.

Summary: Apport of Western blot in diagnosis of hydatidosis.

The aim of this study is to evaluate the contribution of the immunoWesternblot for the diagnosis and the post surgical follow-up of the hydatidosis.

71 sera from patients with hydatidosis confirmed by surgery were studied. All had a negative hydatid serology by screening tests (enzyme-linked immunosorbent assay, hemagglutination, electrosyneresis). 12 patients with sera in pre and post operative were monitored for 2 years.

The Echinococcus Western blot IgG permitted to rectify the diagnosis of hydatidosis in 67.6 %. The rate of positivity was 100 % for the multivesicular liver cysts, 60 % for the young cysts and 50 % for the calcified cysts. Western blot permitted to rectify the diagnosis of lung cysts in 62.5 % of cases and in 50 % of cranial-spinal localizations.

Analysis of Western Blot evolution in the 12 patients followed in pre and post-surgical revealed the disappearance of the bands 16, 18 and 26-28kDa in 8 month in the 8 patients with complete exeresis.

This study proved the value added of Western blot compared to the other traditional techniques for the immunodiagnostic and the post-surgical monitoring of hydatidosis.

Résumé:

Le but de cette étude a été d'évaluer l'apport de l'immunoWesternblot dans le diagnostic et le suivi post opératoire de l'hydatidose.

Cette étude a porté sur 71 sérums de cas d'hydatidose confirmée chirurgicalement, ayant une sérologie hydatidique négative par les techniques classiques (enzyme-linked immunosorbent assay, hémagglutination, électrosynérèse). Durant 2 ans, 12 patients ont été suivis en pré et post-opératoire.

Le test d'Echinococcus Western blot IgG a permis de redresser le diagnostic d'hydatidose dans 67,6 % des cas (toutes localisations confondues). Le taux de positivité était de 100 % pour les kystes hépatiques multivésiculaires, de 60 % pour les kystes jeunes et de 50 % pour les kystes calcifiés. Le Western blot a permis de redresser le diagnostic des kystes pulmonaires dans 62,5 % des cas et dans 50 % des cas pour les localisations crânio-spinales.

L'analyse de l'évolution des sérologies des 12 patients suivis en pré et post opératoire a révélé une disparition des bandes 16 kDa, 18 kDa et 26 - 28 kDa au bout de 8 mois chez 8 patients ayant une exérèse complète.

Cette étude confirme la valeur ajoutée du Western blot par rapport aux autres techniques classiques pour l'immunodiagnostic de l'hydatidose dans différentes localisations ainsi que pour le suivi post opératoire.

Introduction

Le kyste hydatique (KH) demeure encore un problème majeur de santé publique en Tunisie. L'incidence chirurgicale varie de 7,5 à 22,6 pour 100 000 habitants (7), mais elle ne reflète pas totalement l'ampleur de cette pathologie. Les tests sérologiques restent encore les seuls capables de confirmer l'origine échinococcique de l'infestation. Ces techniques peuvent parfois donner des résultats sérologiques discordants ou faussement négatifs.

Beaucoup d'efforts ont été déployés pour obtenir des tests de plus en plus fiables confirmant le diagnostic sérologique.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'apport du Western blot (WB) dans le diagnostic de l'hydatidose en fonction des localisations et des stades évolutifs des kystes et son intérêt dans le suivi post-opératoire des patients traités.

Materiel et méthodes

De janvier 1999 à septembre 2004, 220 cas de kyste hydatique ont été confirmés chirurgicalement. Parmi ces cas, notre étude a porté sur 71 sérums prélevés en préopératoire ayant présenté une sérologie hydatique négative par l'association de trois techniques classiques : ELISA (Sérion ELISA

hydatidosis
serology
Western blot
hospital
Sfax
Tunisie
Maghreb
Northern Afrique

hydatidose
sérologie
Western blot
hôpital
Sfax
Tunisie
Maghreb
Afrique du Nord

classic : seuil = 15 UI/ml), hémagglutination (Echinococcus Fumose : seuil = 1/320), électrosynérèse (technique maison, présence d'arc de précipitation à coalescence spécifique); il s'agit de 42 cas d'hydatidose hépatique, 16 cas d'hydatidose pulmonaire et 6 cas de kystes crânio-spinaux, dont 2 à localisation intra-orbitaire, 3 intra-cérébraux et un cas d'hydatidose rachidienne, 7 cas d'hydatidose à localisation multiple, dont une observation particulière d'hydatidose hépatique, pulmonaire et splénique chez une patiente sidéenne. Pendant 2 ans, 12 patients ont été suivis en pré et post-opératoire, et chacun ont bénéficié de 2 à 3 sérologies durant la période d'étude; ils avaient tous une localisation unique, dont 10 hépatiques et 2 pulmonaires.

Les sérums ont été testés par la technique Echinococcus Western blot IgG LDBIO Diagnostics, Lyon, France. Une réaction a été considérée comme positive sur la présence d'une bande de 7 kDa isolée (P1) ou d'une bande de 7 kDa, associée à une bande large et diffuse de 16-18 kDa (P2) ou uniquement sur une bande de 26-28 kDa isolée (P4) ou l'association de bandes 7 et 26-28 kDa (P5). Une analyse statistique a été faite pour évaluer le taux de positivité de cette technique en fonction des caractéristiques anatomo-cliniques des kystes : le test exact de Fisher et le test χ^2 corrigé de Yates. Le seuil significatif était de $p < 0,05$.

Résultats

Pour les 220 cas de kyste hydatique, les sensibilités de l'électrosynérèse, de l'hémagglutination indirecte et de l'ELISA ont été respectivement de 68,3 %, 67 % et 70 %. Pour les 71 cas d'hydatidose faussement négative par les trois techniques classiques, le WB a permis de redresser le diagnostic d'hydatidose dans 48 cas (soit 67,6 %), toutes localisations confondues. Les résultats du WB en fonction du stade, de l'état anatomo-clinique du kyste et les différents profils obtenus sont résumés dans le tableau I. Le taux de positivité était de 100 % pour les kystes hépatiques multi-vésiculaires,

de 60 % pour les kystes jeunes et de 50 % pour les kystes calcifiés.

La taille moyenne des kystes hépatiques à WB négatif est nettement inférieure à celle des kystes à WB positif ($p = 0,005$). Le taux de faux négatifs de cette technique est plus important en cas de kyste unique qu'en cas de kystes multiples ($p = 0,03$). Le taux de positivité de WB était plus important pour les kystes multi-vésiculaires que pour les kystes calcifiés ($p = 0,008$) et les kystes jeunes ($p = 0,02$).

Le recours au Western blot a permis de redresser le diagnostic des kystes pulmonaires dans 62,5 % des cas et dans 50 % des cas pour les localisations crânio-spinales (tableau I).

Chez une patiente sidéenne ayant une hydatidose disséminée, avec de multiples kystes hépatiques d'âges différents, un kyste multivésiculaire à développement sous splénique et un kyste pulmonaire, les techniques sérologiques classiques (ELISA, électrosynérèse, hémagglutination) ont été négatives, alors que le WB a permis de poser le diagnostic en montrant 2 bandes spécifiques (7 kDa et 16-18 kDa) de faible intensité qui se sont intensifiées plus tard, suite à une rupture du kyste hépatique.

Le suivi post-opératoire de 12 patients par WB a révélé une disparition des bandes 16 kDa, 18 kDa et 26-28 kDa au bout de 8 mois chez 8 patients ayant une exérèse complète et une persistance des mêmes bandes durant toute la période d'étude pour les 4 patients ayant une exérèse incomplète.

Discussion

L'interprétation de la sérologie pour le diagnostic de l'hydatidose avec les techniques classiques est parfois délicate devant des résultats discordants ou faussement négatifs (2, 8, 16). Dans notre série, les pourcentages de positivité avec les trois méthodes de routine sont moins importants que ceux rapportés par CAPRON *et al.* (4). Ceci montre la valeur ajoutée du Western blot, dont la sensibilité est de 70 à 100 % (1, 9, 13, 18). Elle varie avec la fraction antigénique reconnue par les anticorps anti-*Echinococcus* des sérums (14, 15, 17). Notre étude rend compte de l'intérêt du Western blot qui nous a permis de résoudre certaines difficultés d'interprétation rencontrées par les techniques classiques. Elle s'est avérée en effet de meilleure performance permettant de redresser totalement le diagnostic dans les kystes hépatiques multivésiculaires et pratiquement dans plus de la moitié des cas de kystes hépatiques jeunes et calcifiés. Ces derniers ont présenté des bandes de faible intensité pouvant correspondre à une cicatrice sérologique (2). De même, le Western blot trouve un intérêt dans les localisations d'hydatidose extra hépatiques peu immunogènes (3). C'est ainsi que nous avons pu confirmer la moitié des cas d'hydatidose pulmonaire et cérébrale faussement négative par les techniques classiques.

Par ailleurs, nous n'avons pas constaté une variation de type des profils en Western blot en fonction des différentes localisations et des stades évolutifs des kystes hépatiques. En effet ce test ne permet pas de distinguer entre les formes actives et inactives des kystes (5, 10).

Nous n'avons pas pu malheureusement tester la spécificité du Western blot sur des sérums d'autres cestodoses telles que l'échinococcose alvéolaire, la cénurose et la cysticerose, faute de disposer de

Tableau I.

Résultats du Western blot en fonction des caractéristiques des kystes hydatiques.

Results of immunoblot according to hydatid cysts.

localisation du KH	état du KH	profils du Western blot				Western blot	
		P1	P2	P4	P5	positif	négatif
hépatique	stade (I, II) K. jeunes n = 15	3	4	1	1	9 (60 %)	6
	stade (III) K. multivésiculaires n = 11	4	4	2	1	11 (100 %)	0
	stade (IV, V) K. calcifiés n = 16	4	2	1	1	8 (50 %)	8
total :	n = 42	11	10	4	3	28 (66,6 %)	14
taille moyenne (cm)		13	14	12	13	13	8,9
pulmonaire	sain	1	0	0	0	1 (10 %)	6
	infecté	4	1	1	0	6 (60 %)	0
	fistulisé	1	2	0	0	3 (30 %)	0
total :	n = 16	6	3	1	0	10 (62,5 %)	6
crânio-spinal	cérébrale	2	0	0	0	2	0
	orbitaire	0	0	0	0	0	2
	fosse post	0	0	0	0	0	1
	rachidienne	0	1	0	0	1	0
total :	n = 6	2	1	0	0	3 (50 %)	3
multiple							
total :	n = 7	2	4	0	1	7 (100 %)	3
total	n = 71	21	18	6	3	48	23
		(43,8 %)	(37,5 %)	(12,5 %)	(6,3 %)	(67,6 %)	

P1 : 7kDa isolée; P2 : 7kDa+16-18kDa; P4 : 26-28kDa isolée; P5 : 7 + 26-28 kDa

sérums de ce type. D'ailleurs MORO *et al.* n'ont pas constaté de réactions croisées entre l'hydatidose et la cysticercose (12). Certains auteurs ont rapporté une spécificité de 100 % de la bande 8kDa (11), mais d'autres ont constaté la présence de réactions croisées dans 12 % des cas (19).

Chez notre patiente sidéenne, le Western blot a été la seule technique qui a permis de confirmer l'origine hydatique de ses multiples kystes. L'intensification des deux bandes à la deuxième sérologie est due à la rupture ou à la fissuration des kystes hépatiques. En effet, la rupture des kystes a été suivie d'une synthèse immédiate d'anticorps, d'où une forte positivité de la réaction, phénomène déjà signalé par plusieurs auteurs (2, 8).

Dans notre étude, la disparition des bandes 26-28 kDa dès le 8^e mois après traitement chirurgical, ainsi que celle des bandes 16 et 18 kDa, pourraient être considérées comme un bon marqueur de guérison chez les patients ayant eu une exérèse complète. Par contre, pour d'autres auteurs, les bandes 39 et 42 kDa seraient les plus spécifiques dans la surveillance post chirurgicale (6). Il convient aussi de signaler la précocité de la disparition des anticorps décelés par cette technique, par rapport aux autres classiques, telles que l'ELISA et l'hémagglutination (6). Cependant, il est à remarquer que l'expression antigénique faisant suite à des modifications de l'activité de l'hydatide dans le temps provoque la production des différents isotopes d'immunoglobulines, dont la détection sera par conséquent fonction du moment de prélèvement (17).

Références bibliographiques

- AYADI A, DUTOIT E, SENDID B & CAMUS D – Specific diagnostic antigens of *Echinococcus granulosus* detected by Western blot. *Parasite*, 1995, **2**, 119-123.
- BIAVA MF, DAO A & FORTIER B – Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. *World J Surg*, 2001, **25**, 10-14.
- BITKOWSKA E, GOLAB E, PLONKA W & DZBENSKI TH – Use of Western blot methods for serodiagnostic of hydatidosis in Poland. *Med Dosw Mikrobiol*, 1997, **49**, 215-223.
- CAPRON A, YARZABAL L, VERNES A & FRUIT J – Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine (Bilan personnel à propos de 400 observations). *Path Biol*, 1970, **18**, 357-365.
- DAEKI AO, CRAIG PS & SHAMBESH MK – IgG subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann Trop Med Parasitol*, 2000, **94**, 319-328.
- DOIZ O, BENITO R, SBIHI Y, OSUNA A, CLAVEL A & GOMEZ-LUS R – Western blot applied to the diagnosis and post-treatment monitoring of human hydatidosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2001, **41**, 139-142.
- HSAIRI M & CHAHED MK – The surgical incidence rate of hydatidosis in Tunisia (1988-1992). Report of the D.S.S.B (Direction de la Santé et des Soins de Base). Ministry of public health, 1993.
- KADDAH MH, MAHER KM, HASSANEIN HI, FARRAG AI, SHAKER ZA & KHALAFALLAH AM – Evaluation of different immunodiagnostic techniques for diagnosis of hydatidosis in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*, 1992, **22**, 653-665.
- KANWAR JR, KAUSHIK SP, SAWHNEY IM, KAMBOI MS, MEHTA SK & VINAYAK VK – Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognized by immunoblotting. *J Med Microbiol*, 1992, **36**, 46-51.
- LIANCE M, JANIN V, BRESSON-HADNI S, VUITTON DA, HOUIN R & PIARROUX R – Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western blot. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**, 3718-3721.
- MADDISON SE, SLEMENDA SB, SCHANTZ PM, FRIED JA, WILSON M & TSANG VCW – A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg*, 1989, **40**, 377-383.
- MORO PL, GUEVARA A, VERASTEGUI M, GILMAN RH, POMA H *et al.* – Distribution of hydatidosis and cysticercosis in different Peruvian populations as demonstrated by an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB). *Am J Trop Med Hyg*, 1994, **51**, 851-855.
- PAUL M & STEFANIAK J – Comparison of the dot immunobinding assay and two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the diagnosis of liver cystic echinococcosis. *Hepato Res*, 2001, **21**, 14-26.
- RAFIEI A & CRAIG PS – The immunodiagnostic potential of protoscolex antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. *Ann Trop Med Parasitol*, 2002, **96**, 383-389.
- RIGANO R, PROFUMO E & SIRACUSANO A – New perspectives in the immunology of *Echinococcus granulosus* infection. *Parasitologica*, 1997, **39**, 275-277.
- ROBERT-GANGNEUX F & TOURTE-SCHAEFER C – Valeur comparée de deux techniques de Western blot pour le diagnostic de confirmation d'une hydatidose. *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, **92**, 13-17. <http://www.pathexo.fr/pages/Bull-somm/1999/1999n1som.html>
- SBIHI Y, JANSSEN D & OSUNA A – Specific recognition of hydatid cyst antigens by serum IgG, IgE, and IgA using Western blot. *J Clin Lab Anal*, 1997, **11**, 154-157.
- SHAPIRO SZ, BAHR GM & HIRA PR – Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. *Ann Trop Med Parasitol*, 1992, **86**, 503-509.
- VERASTEGUI M, MORO P, GUEVARA A, RODRIGUEZ T, MIRANDA E & GILMAN RH – Enzym linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. *J Clin Microbiol*, 1992, 1557-1561.