



**biokit**

08186 Llissà d'Amunt  
Barcelona  
Spain

Tel.:+ 34 93 860 90 00  
Fax:+34 93 860 90 17  
e-mail: [biokit@biokit.com](mailto:biokit@biokit.com)  
[www.biokit.com](http://www.biokit.com)

Date: 12.11.07

Date:

Ref: 250/MKT/E/30

Ref:

**SUBJECT**

**Bioelisa Chagas  
Evaluation in France**



Dear Customer,

Bioelisa Chagas is playing an increasing role in Europe owing to the growth of Latin American immigration.

Testing for Chagas disease is being implemented in many European blood banks. The military blood bank in Clamart, France, evaluated three elisa assays for Chagas disease in order to select the best assay combination in their routine.

Bioelisa Chagas reported a 100% in both sensitivity and specificity with the panel of sera evaluated. Moreover, the Biokit assay is being used routinely in this laboratory.

Please find attached the hard copy of the evaluation. Although it is written in French it is self-explanatory.



## La maladie de Chagas : évaluation des tests de dépistage au centre de transfusion sanguine des armées, prévalence dans les armées

### Chagas disease: screening tests evaluation in a blood military center, prevalence in the French Army

A. Kerleguer<sup>\*</sup>, S. Massard, G. Janus, M. Joussemet

*Centre de transfusion sanguine des armées, 1, rue du Lieutenant-Raoul-Batany, 92141 Clamart, France*

Reçu le 24 mai 2007 ; accepté le 29 juin 2007

#### Résumé

La maladie de Chagas est considérée comme un véritable problème de santé publique en Amérique latine et centrale où 15 à 20 millions de personnes sont infectées et 100 millions sont considérées à risque. La région amazonienne et, notamment la Guyane française se différencient par la situation émergente de l'infection. Trois trousse Elisa Novagnost (Dade-Behring), BioElisa Chagas<sup>®</sup> (Orgentec) et Elisa Cruzi<sup>®</sup> (BioMérieux) ont été évaluées à partir de panels informatifs. La sensibilité, la reproductibilité et la spécificité (à partir de 40 donneurs n'ayant jamais quitté la métropole) ont été évaluées. Les trousse Orgentec (Ag [antigènes] recombinants) et BioMérieux (Ag natifs) sont les plus performantes. Le manque de sensibilité de la trousse Novagnost pourrait s'expliquer par la composition antigénique du test. La reproductibilité et la spécificité sont correctes (Novagnost a été retiré de l'étude). Les tests avec Ag recombinants permettent d'augmenter la spécificité, ils sont toutefois moins sensibles que les tests avec Ag natifs, dans le cadre du dépistage sérologique, les deux tests sont pratiqués en parallèle. Une étude de prévalence a été réalisée sur 11 mois : sur 1570 militaires revenant de zone d'endémie. Malgré la faible prévalence retrouvée dans la population étudiée (inférieure à 0,7 %), le dépistage de la maladie de Chagas, instauré par principe de précaution, est incontournable au centre de transfusion sanguine des armées, étant donné le nombre de donneurs ayant fait un séjour en zone d'endémie, en particulier en Guyane : 7,95 % de la population.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

Chagas disease is a major public health problem in Latin and Central America, 15 to 20 million people are affected and some 100 million is at risk of acquiring Chagas disease. Chagas disease starts to appear in amazonian area and french Guyana. Three kits: Elisa Novagnost (Dade Behring), BioElisa Chagas<sup>®</sup> (Orgentec) et Elisa Cruzi<sup>®</sup> (BioMérieux) were compared using performance panel. Sensibility, reproductibility and specificity (using 40 serum of blood donors who never went to an endemic area) were evaluated. Orgentec assay (recombinant antigens) and BioMérieux assay (whole-epimastigote antigens) performed better than Dade Behring assay. The latter was discarded from the study at this stage. Lack of sensibility seems due to the antigenic composition. Reproductibility and specificity are good for the other two tests. Mixtures of recombinants antigens increased specificity, but sensibility is better using mixtures of whole-epimastigote antigens. For routine blood donor screening both tests must be performed. A prevalence study was done during 11 months on 1570 serum of military blood donors. Despite of a low prevalence (less than 0.7%), the entire donation from donors who were in the endemic area (7.95% from our whole population) are scened for antibody against *Trypanosoma cruzi*, with these two assays.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

<sup>\*</sup> Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [alexandrakerleguer@club-internet.fr](mailto:alexandrakerleguer@club-internet.fr) (A. Kerleguer).

Mots clés : Maladie de Chagas ; Dépistage ; Transfusion sanguine ; Évaluation de trousse ; Prévalence

Keywords: Chagas disease; Screening; Blood transfusion; Assays evaluation; Prevalence

## 1. Introduction

La trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas (Carlos Chagas, 1909) sévit dans le continent américain du 18<sup>e</sup> degré de latitude Nord au 43,5<sup>e</sup> degré de latitude Sud, elle est endémique dans 21 pays de l'hémisphère occidental sud, 15 à 20 millions de personnes sont infectées et 100 millions sont considérées à risque. La zone d'endémie comprend les pays allant du Mexique à la pointe sud de l'Argentine. Elle constitue un problème de santé publique, c'est la quatrième maladie transmise en Amérique latine.

La maladie de Chagas est une anthroponose due à un protozoaire flagellé, *Trypanosoma cruzi*, dont le tropisme est sanguin et tissulaire ; la transmission est assurée par des insectes hématophages, les triatomés.

L'histoire naturelle de la maladie de Chagas comporte trois phases :

- une phase aiguë survenant sept à dix jours après l'infestation, caractérisée par une parasitémie importante, durant quatre à huit semaines. Mis à part le signe de Romana (œdème bipalpebral unilatéral rougeâtre, peu douloureux), pathognomonique d'une porte d'entrée conjonctivale, la phase aiguë est souvent asymptomatique et passe inaperçue ;
- une phase chronique asymptomatique, avec un taux élevé d'anticorps de type IgG, situation fréquente en zone d'endémie ;
- une phase chronique symptomatique chez 30 % des sujets infectés, principalement avec des manifestations cardiaques et/ou digestives.

La maladie a émergé en Guyane française, l'ensemble du département est considéré à risque. La zone Caraïbe est exclue (notamment les deux DOM français).

Cette étude a permis d'évaluer trois tests de dépistage disponibles en France, ainsi que d'évaluer la prévalence de la maladie dans une population exposée au risque.

## 2. Problématique en transfusion sanguine

La décision d'une approche coordonnée internationale pour le contrôle de la maladie de Chagas en Amazonie (initiative intergouvernementale sur la vigilance et prévention de la maladie de Chagas en Amazonie : AMCHA) a été prise au cours d'une première réunion qui s'est déroulée à Manaus du 19 au 22 septembre 2004. Les objectifs de l'initiative AMCHA regroupant neuf pays du bassin amazonien (Bolivie, Brésil, Équateur, Guyane française, Pérou, Surinam, Colombie, Venezuela, Guyana) sont le contrôle de la transmission autochtone et importée de la maladie de Chagas en Amazonie.

Une seconde réunion en décembre 2005 portait sur les projets devant faire l'objet d'une gestion coordonnée, et notamment du contrôle des banques de sang (deuxième réunion d'initiative des pays amazoniens pour la surveillance et le contrôle de la maladie de Chagas, Cayenne, Guyane française, 2–4 novembre 2005).

### 2.1. Pourquoi le dépistage ?

- En Amérique centrale et du Sud, les initiatives de lutte antivectorielle et de contrôle des banques de sang ont considérablement réduit l'incidence des nouveaux cas. Les phases aiguës sont exceptionnelles et surviennent presque toujours chez des enfants.

La situation en Guyane et peut-être dans le reste des pays amazoniens est très différente de celle du reste de l'Amérique centrale et du Sud (il y a environ 15 cas en Guyane, pour 15 millions de cas dans les pays d'Amérique centrale, de la région andine et du Cône sud).

En Guyane, outre les probables cas de transmission vectorielle, les cas identifiés semblent en partie des cas de contamination alimentaire, avec une symptomatologie aiguë et un pronostic vital à court terme (effet souche ? Taille de l'inoculum ?) [1].

La population de donneurs militaires, parmi lesquels un certain nombre est susceptible de participer à des opérations d'aguerrissement en zone tropicale, peut être exposée à des risques particuliers, et notamment à certaines parasitoses comme la maladie de Chagas. Cette maladie endémique en Amérique centrale et du Sud est en train d'émerger en Guyane [2], département d'Outre-mer où les troupes de l'armée française effectuent régulièrement des séjours.

Il y a donc deux situations différentes :

- en diagnostic clinique où l'algorithme doit considérer la possibilité de l'existence de cas aigus et donc l'éventuelle utilité des IgM ;
- en transfusion sanguine où la probabilité de développer une phase aiguë au moment d'un don est infime, d'autant que cette phase est couverte par l'interrogatoire prédon ;
- plusieurs cas de transmissions transfusionnelles ont été publiés dans des pays où la transmission vectorielle est absente (six aux États-Unis, un au Canada). Ces cas étaient tous associés à un séjour ou une naissance dans un pays endémique [3]. Le dépistage est systématiquement réalisé aux États-Unis depuis 2003, malgré le faible risque de transmission [4].

### 2.2. Stratégie de dépistage

Dans le cadre de la qualification biologique du don, il s'agit de détecter le portage sanguin d'anticorps anti-

*Trypanosoma cruzi* chez un sujet qui ne présente par ailleurs aucun signe clinique évocateur de la maladie et sans possibilité de le tester à plusieurs reprises.

Il est important de sélectionner des tests présentant une sensibilité importante (évitant ainsi les faux-négatifs au dépistage), ainsi qu'une bonne spécificité (évitant les faux-positifs par les réactions croisées avec d'autres maladies tropicales comme les amibiases ou le paludisme).

La stratégie de dépistage dans les pays de forte endémie ne peut compter sur un seul test dans la mesure où il pourrait engendrer un nombre inacceptable de faux-négatifs. Les difficultés initiales du dépistage sérologique des donneurs de sang résultent des trop faibles sensibilités et spécificités des tests commercialisés, de sorte qu'ils ne peuvent être utilisés seuls [5]. Les banques de sang boliviennes utilisent deux techniques (Elisa et Hémagglutination) avec généralement un test avec antigènes recombinants et un test avec antigène natif. Les tests avec antigènes recombinants permettent d'augmenter la spécificité, mais ils sont moins sensibles que les tests avec antigène natif [6].

Dans les pays amazoniens, il semble exister des souches particulières de parasites mettant en défaut les performances des tests commerciaux utilisés habituellement dans les autres pays d'Amérique latine. Ce manque de sensibilité pourrait s'expliquer par la faible production d'anticorps dans une population encore peu immunisée contre cette infection.

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1. Tests disponibles

Dix dispositifs de diagnostics in vitro revendiqués pour le dépistage sérologique de la maladie de Chagas ont été recen-

Tableau 1  
Tests disponibles

Technique Elisa		Marquage CE
Elisa Cruzei®	Fabricant : BioMérieux (Brésil)	Non Dérogration Affssaps
BioElisa Chagas®	Fabricant : Biokit SA (Espagne) Distributeur français : Orgentec (SA)	Oui
Chagatest Elisa recombinante v3.0	Fabricant : Wiener lab Group (Argentine) Pas de distributeur en France	Oui
Novagnost Chagas IgG®	Fabricant : NovaTec Immundiagnostica (GmbH) Distributeur français : Dade-Behring Marburg (GmbH)	Oui
Chagatek Elisa	Fabricant : Lemos (Argentine)	Non
<i>Technique d'agglutination</i>		
ID Pagia Chagas antibody test	Diamed AG (Suisse)	Oui
<i>Technique d'hémagglutination</i>		
Hemacruzir	Fabricant : BioMérieux (Brésil)	Non
<i>Technique d'immunofluorescence</i>		
ImunoCruzi	Fabricant : BioMérieux (Brésil)	Non
Immunofluor Chagas	Fabricant : Bioscientifica SA (Argentine) Pas de distributeur en France	Oui
<i>Autres tests</i>		
Chagas 20 quick test	Cypress diagnostic (Belgique)	Oui

sés, dont six disposent du marquage CE. Le test Elisa Cruzei® de la société BioMérieux ne dispose pas du marquage CE, mais a obtenu une dérogation de l'Afssaps pour être utilisé en test de dépistage (Tableau 1).

Trois sociétés ont répondu à notre appel d'offres : BioMérieux, Orgentec et Dade-Behring.

#### 3.2. Matériel

Nous avons évalué ces trois tests sur l'automate BEP 2000 (validé au CTSA en 2002) :

- deux tests étaient élaborés avec des antigènes recombinants :
  - BioElisa Chagas® de la société Biokit, commercialisé par la société Orgentec, comprenant quatre épitopes immunodominants de *Trypanosoma cruzi* (TcD, TcE, PEP-2 et TcLo1-2) ;
  - Novagnost Chagas IgG® de la société NovaTec, commercialisé par la société Dade-Behring, constitué uniquement par deux peptides de *Trypanosoma cruzi* ;
- un test était élaboré avec des antigènes natifs :
  - Elisa Cruzei® de la société BioMérieux.

#### 3.3. Méthodes

L'évaluation au laboratoire a été effectuée à l'aide :

- du panel de la société BBI Diagnostics (anti-*Trypanosoma cruzi* performance panel) comprenant 15 aliquotes de plasma : 14 positifs provenant du Brésil (deux), d'Argentine (deux), du Venezuela (quatre), du Nicaragua (trois), de l'Honduras (trois) et un négatif (États-Unis) ;

- d'un témoin positif : ACCURUN 190 anti-*Trypanosoma cruzi* Positive Control.

L'évaluation a comporté :

- une étude de sensibilité du panel ;
- une étude des dilutions successives du témoin ACCURUN 190 ;
- une étude de spécificité, réalisée sur des sérums de 40 donneurs n'ayant jamais effectué de séjours en zone d'endémie.

#### 4. Résultats

##### 4.1. Étude de sensibilité du panel

###### 4.1.1. Novagnost Chagas IgG<sup>®</sup> (Dade-Behring)

Ce test n'a dépisté qu'une partie du panel BBI et le contrôle positif a toujours été trouvé négatif (Tableau 2).

Ce manque de sensibilité du test pourrait s'expliquer par la composition antigénique des réactifs comprenant uniquement deux peptides de synthèses, contre quatre pour le réactif BioElisa Chagas<sup>®</sup> (Biokit).

###### 4.1.2. BioElisa Chagas<sup>®</sup> (Biokit)

Les 14 sérums positifs du panel ainsi que le témoin positif ont été dépistés (Tableau 2).

Tableau 2  
Sensibilité des différentes trousse

SOUCHES	Dade Behring		Orgentec		BioMérieux	
	RATIO	Résultats	RATIO	Résultats	RATIO	Résultats
Contrôle négatif	0,011	-	0,02	-	0,01	-
Contrôle positif	25,91	+	4,93	+	7,16	+
1- Brésil (+)	0,605	?	4,56	+	3,30	+
2- Argentine (+)	0,435	-	4,50	+	4,13	+
3- Argentine (+)	0,199	-	3,55	+	1,82	+
4- Vénézuéla (+)	0,261	-	4,05	+	7,32	+
5- Vénézuéla (+)	0,627	?	3,36	+	4,33	+
6- Vénézuéla (+)	1,436	+	7,07	+	6,26	+
7- Nicaragua (+)	2,920	+	7,33	+	10,02	+
8- Nicaragua (+)	0,819	+	5,57	+	2,22	+
9- Nicaragua (+)	0,634	?	6,22	+	5,10	+
10- Honduras (+)	0,992	+	7,32	+	3,83	+
11- Honduras (+)	0,406	-	4,95	+	5,75	+
12- Honduras (+)	0,779	+	5,67	+	5,60	+
13- Brésil (+)	0,201	-	4,71	+	9,75	+
14- Vénézuéla (+)	1,376	+	6,90	+	4,25	+
15- USA (-)	0,059	-	0,03	-	0,05	-
ACCURUN 190	0,48	-	3,26	+	2,23	+




	Résultats faussement négatifs
	Résultats positifs
	Résultats douteux « zone grise »

Tableau 3  
Résultats de l'étude spécificité

	Elisa Cruzei <sup>®</sup> (BioMérieux)		BioElisa Chagas <sup>®</sup> (Orgentec)	
	Ratio moyenne	Spécificité (%)	Ratio moyenne	Spécificité (%)
Premier passage	0,071 (0,02 à 0,20)	100	0,057 (0,01 à 0,31)	100
Second passage	0,045 (0,00 à 0,22)	100	0,060 (0,00 à 0,33)	100

Pour citer cet article : A. Kerleguer et al., La maladie de Chagas : évaluation des tests de dépistage au centre de transfusion sanguine des armées, prévalence dans les armées, Pathologie Biologie (2007), doi: 10.1016/j.patbio.2007.06.008.

##### 4.1.3. Elisa Cruzei<sup>®</sup> (BioMérieux)

Tous les sérums positifs et le témoin positif ont été dépistés (Tableau 2).

##### 4.2. Dilutions successives du témoin ACCURUN 190

- Novagnost Chagas IgG<sup>®</sup> (Dade-Behring) : le témoin a toujours été trouvé négatif ;
- BioElisa Chagas<sup>®</sup> (Biokit) : détection jusqu'à la dilution 1/4 ;
- Elisa Cruzei<sup>®</sup> (BioMérieux) : détection jusqu'à la dilution 1/2.

##### 4.3. Étude de spécificité

Les études de spécificité ont été réalisées uniquement avec les réactifs BioElisa Chagas<sup>®</sup> (Biokit) et Elisa Cruzei<sup>®</sup> (BioMérieux). Le réactif Novagnost Chagas IgG<sup>®</sup> (Dade-Behring) a été éliminé du fait de sa faible sensibilité.

L'étude a été réalisée à parti de sérums de 40 donneurs n'ayant jamais quitté la métropole, ces sérums ont été passés deux fois de suite ; les résultats retrouvés étaient tous négatifs (Tableau 3).

##### 4.4. Tests retenus

- Le test Novagnost Chagas IgG<sup>®</sup> de la société NovaTec, commercialisé par la société Dade-Behring, n'a pas été retenu du fait de sa faible sensibilité due probablement au nombre (deux uniquement) et/ou au choix des peptides recombinants ;
- les deux autres tests évalués ont été retenus : pour leur sensibilité, leur spécificité et une bonne reproductibilité obtenue lors de l'évaluation.

Pour les deux tests retenus, nous avons également réalisé une étude de répétabilité, à l'aide d'un pool positif élaboré avec les 14 sérums positifs du panel BBI. Ce pool a été passé dix fois au sein de la même plaque, intercalé avec des sérums négatifs.

Les ratios obtenus vont :

- pour le réactif bioMérieux, de 7,08 à 8,37, avec une moyenne à 7,64, un écart-type à 0,46 et un coefficient de variation à 6,04 ;
- pour le réactif Biokit, de 1,22 à 1,48, avec une moyenne à 1,36, un écart-type à 0,07 et un coefficient de variation à 5,74.

Il n'a pas été constaté d'effet bord, ni de contamination au sein de la plaque.

## 5. Étude de prévalence

### 5.1. Population étudiée

Il est important de déterminer les populations à risque. Les sources de contamination du donneur sont diverses : vectorielle, alimentaire, materno-fœtale et transfusionnelle, on considérera donc comme donneurs de sang à risque, tous les candidats au don :

- présentant un antécédent de maladie de Chagas ou de sérologie positive ;
- ayant séjourné dans une zone d'endémie, quelle que soit la durée du séjour (contamination vectorielle ou alimentaire) ;
- nés dans une zone d'endémie (contamination materno-fœtale).

Les antécédents de transfusion étant en France une contre-indication permanente au don du sang, le donneur sera exclu pour ce motif indépendamment du risque Chagas.

Une étude de prévalence a été réalisée sur 11 mois : sur 1570 militaires revenant de zone d'endémie et essentiellement de Guyane française.

Lors des dons de sang, les sérums prélevés sont testés en parallèle sur le BEP 2000 avec les deux tests retenus.

Tous les résultats des sérologies étaient négatifs, avec une prévalence inférieure à 0,7 ‰.

Ce résultat corrobore les résultats du suivi épidémiologique au sein des armées, puisque depuis 1998 aucun cas de maladie de Chagas n'a été déclaré par le *Bulletin Épidémiologique des Armées* [7].

## 6. Conclusion

L'émergence ponctuelle de maladie transmissible fait partie du risque transfusionnel, la maladie de Chagas en est l'exemple le plus récent. La stratégie est à chaque fois de trouver une parade pour minimiser les risques sans augmenter le nombre de donneurs de sang exclus. L'approche par un questionnaire d'exclusion et une recherche d'anticorps dirigés contre *Trypanosoma cruzi* semble la meilleure solution. Pour le dépistage de la maladie de Chagas, endémique en Amérique latine, peu de tests étaient disponibles en Europe. Par ailleurs, il fallait trouver des tests spécifiques, sans réaction croisée avec d'autres parasitoses, et sensibles, la maladie de Chagas étant essentiellement diagnostiquée au stade chronique, la phase aiguë étant le plus souvent asymptomatique.

## Références

- [1] Cardoso AV, Lescano SA, Amato Neto V, Gakiya E, Santos SV. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48(5):287–9.
- [2] Jeannel D, Noireau F, Chaud D, Blanchet D, Aznar C. Pourquoi la maladie de Chagas risque d'émerger en Guyane : arguments épidémiologiques et entomologiques. Rapport InVS, Journées de Veille sanitaire, Paris, 29–30 novembre 2005.
- [3] Sanchez Negrette O, Mora MC, Basombrio MA. High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics* 2005;115(6):e668–72.
- [4] Mc Carthy M. American red cross to screen blood for Chagas' disease. *Lancet* 2003;362:1988.
- [5] Pirard M, Iihoshi N, Boelaert M, Basanta P, Lopez F, Van der Stuyft P. The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyper endemic region. *Transfusion* 2005;45(4):554–61.
- [6] Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 2003;43(1):91–7.
- [7] *Bulletin Épidémiologique des Armées*. Maladies à transmission vectorielle de 1998 à 2005. N° 1/2006. 2006