



Hydatidose HAI BMDT
Réactif d'hémagglutination en microplaque
pour la recherche d'anticorps anti-*Echinococcus granulosus*

Notice d'utilisation

Introduction

Les échinococcoses sont des cestodoses larvaires dues au développement tissulaire de la larve (hydatide) d'un ténia échinocoque. Ce sont des zoonoses qui comprennent : l'hydatidose ou l'hydatidose kystique ou kyste hydatique, due au développement larvaire d'*Echinococcus granulosus*, et l'échinococcosse alvéolaire, due à celui de la larve d'*Echinococcus multilocularis*.

Concernant l'hydatidose provoquée par l'*E. granulosus*, le cycle évolutif de ce parasite se déroule entre les canidés, tels que le chien, qui sont des hôtes définitifs hébergeant des adultes dans l'intestin grêle et des mammifères herbivores ou omnivores dont le mouton et accidentellement l'homme qui sont des hôtes intermédiaires. Chez ces derniers, tous les organes peuvent être touchés mais la localisation hépatique est la plus fréquente (50 à 70%) suivie de la localisation pulmonaire (24 à 40%).

Le diagnostic parasitologique ou de certitude est le plus souvent réalisé sur les pièces opératoires. La mise en évidence des anticorps est donc importante pour le diagnostic et de suivi de ces échinococcoses.

Pour l'hydatidose due à *E. granulosus*, ce diagnostic immunologique est réalisé avec des techniques quantitatives ou semi quantitatives [immunofluorescence indirecte (IFI), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), hémagglutination indirecte (HAI), latex agglutination (LAI)] et qualitatives [coélectrosynérèse (CoES), immunoélectrophorèse (IEP) (arc 5), immunoempreinte ou western blot (WB)].

Les résultats du diagnostic immunologique doivent être interprétés avec prudence : un résultat négatif ne permet pas d'exclure une hydatidose et un résultat positif peut résulter d'une réaction croisée avec d'autres cestodoses larvaires. Aussi il est recommandé de tester les sérums avec au moins 2 techniques.

Objectif du test

L'Hydatidose HAI BMDT est un réactif d'hémagglutination indirecte pour la recherche d'Ac anti-*E. granulosus* dans le sérum humain. Les résultats obtenus avec ce test apportent des arguments immunologiques pour le diagnostic de l'hydatidose.

Principe du test

L'Hydatidose HAI BMDT est un test utilisant des globules rouges de mouton formolés (GRF) et sensibilisés (GRS) avec des antigènes solubles obtenus à partir du liquide hydatique de la larve d'*E. granulosus*.

La technique est réalisée dans des microplaques avec des cupules en U (fond rond) dans lesquelles sont déposées des dilutions du sérum à tester et des GRS. Lorsque le sérum est positif, les GRS vont agglutiner avec les anticorps (Ac) anti-*E. granulosus*. L'agglutination des GRS se traduit par un voile brun-rouge qui tapisse la paroi de la cupule. Si la réaction est négative (absence d'Ac) les GRS sédimentent formant un anneau plus ou moins large ou un point au fond de la cupule.

L'utilisation comme témoin des globules rouges non sensibilisés (GRNS) permet de contrôler l'absence "d'Ac naturels" anti globules rouges de mouton (Ac hétérophiles)

tels que les hétéroanticorps de Forssman et les Ac présents lors de la mononucléose infectieuse.

Composition du coffret

Composition d'un coffret Hydatidose HAI BMDT pour 24 tests

R1 : Un flacon compte-gouttes contenant une suspension de globules rouges non sensibilisés (GRNS)

R2 : Un flacon compte-gouttes contenant une suspension de globules rouges sensibilisés (GRS)

R3 : Un flacon contenant une suspension de globules rouges pour adsorption (GRAds)

R4 : Deux flacons de tampon PBS

R5 : Un flacon contenant un sérum contrôle positif

R6 : Un flacon contenant un sérum contrôle négatif

Deux microplaques avec des cupules en U

Une notice d'utilisation

Matériel nécessaire non fourni

- Tubes à hémolyse avec bouchon.
- Agitateur type Vortex.
- Micropipette pour 25, 50, 100 et 1000 µl
- Agitateur pour microplaque (optionnel)
- Container pour déchets biologiques

Stockage des réactifs

- Le coffret doit être stocké entre +2° et +8°C. Les produits sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret et sur les étiquettes (y compris après ouverture).
- Ne pas congeler, ni laisser les réactifs sous une lumière intense.

Conservation des prélèvements

- Conserver les sérums dans des tubes hermétiquement clos.
- Utiliser les sérums fraîchement préparés ou conservés au maximum 7 jours entre +2°C et +8°C.
- Pour toute conservation supérieure à 7 jours, congeler les sérums entre -18°C et -22°C.
- Ne pas décongeler et recongeler les sérums plus de trois fois.
- Bien homogénéiser (par 4 à 5 retournements du tube ou à l'aide d'un agitateur type vortex) les sérums après décongélation.
- Ne pas utiliser les sérums hémolysés, troubles ou contaminés.

Précaution d'utilisation

- Pour usage in vitro.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Respecter les instructions de la notice d'utilisation.
- Utiliser du matériel propre tel que les pointes pour micropipette, les tubes et autre matériel de laboratoire.
- Ne pas utiliser de réactifs périmés.

- En cas de versement accidentel du réactif, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de contamination de l'environnement par les échantillons, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.
- Eviter tout contact du réactif avec la peau, les yeux et les muqueuses. Ne pas ingérer.
- Les échantillons, les composants du coffret ainsi que le matériel et les produits contaminés, doivent être éliminés dans un conteneur pour déchets contaminés, selon les recommandations et la réglementation en vigueur.
- Porter des gants appropriés, des lunettes de protection et une blouse de protection.
- Tous les produits biologiques doivent être considérés et traités comme potentiellement infectieux.

Consignes d'hygiène et de sécurité

- Observer les techniques et précautions en vigueur en matière de protection contre les dangers microbiologiques.
- Pour connaître les recommandations liées aux risques et les précautions relatives à certains produits chimiques contenus dans le coffret, consulter les pictogrammes figurant sur les étiquettes.
- La fiche technique de sécurité est disponible sur demande.

Mode opératoire

1. Il est recommandé de lire toute la notice avant de commencer le test et de suivre strictement le protocole proposé.
2. Laisser les réactifs et les sérums à analyser revenir à température ambiante (+18°C à +30°C).
3. Bien homogénéiser (par retournements du flacon ou à l'aide d'un agitateur type vortex) les suspensions de GRNS (R1), de GRS (R2) et de GRAds (R3) avant chaque utilisation.
4. Préparer une dilution au 1/40 du sérum à analyser : déposer dans un tube à hémolyse 975 µL de tampon PBS (R4), ajouter 25 µL de sérum et mélanger par agitation du tube
5. Réalisation du test dans une microplaque (tableau 1)
 - 5.1. Dilution du sérum de 1/2 en 1/2 sous un volume de 50 µL
 - 5.1.1. Distribuer 50 µL de tampon PBS (R4) dans les cupules C à H à l'aide d'une micropipette
 - 5.1.2. Déposer 50 µL de la dilution au 1/40 du sérum à tester dans les cupules A, B et C
 - 5.1.3. A partir de la cupule C mélanger à l'aide d'une micropipette le sérum et le tampon (4 à 5 aspirations/4 à 5 refoulements) et reporter 50 µL de la cupule C dans la cupule D
 - 5.1.4. Réaliser la même opération pour les cupules D et E, puis E et F, puis F et G
 - 5.1.5. Rejeter 50 µL du dernier mélange de la cupule G
 - 5.2. Agiter le flacon de GRNS (R1) et Ajouter une goutte (Tenir le flacon en position verticale compte-gouttes vers le bas) dans la cupule A

5.3. Agiter le flacon de GRS (R2) et Ajouter une goutte (Tenir le flacon en position verticale compte-gouttes vers le bas) dans les cupules B à H

Cupule	A	B	C	D	E	F	G	H
Tampon PBS μL	-	-	50	50	50	50	50	50
Sérum au 1/40 μL	50	50	50	50	50	50	50	-
GRS (40 à 50 μL)	-	+	+	+	+	+	+	+
GRNS (40 à 50 μL)	+	-	-	-	-	-	-	-
Dilution 1/ ?	80	80	160	320	640	1280	2560	80

Tableau 1 : schéma pour la réalisation de l'Hydatidose HAI BMDT en microplaque
 Cupule A : cupule témoin pour la recherche d'Ac anti-GR de mouton qui doit être négative. Si elle est positive, il faut réaliser une adsorption avec des GRAds
 Cupules B à G : cupules réaction positive ou négative en Ac anti *E. granulosus*
 Cupule H : cupule témoin GRS en tampon/ La réaction doit être négative. Si elle est positive le réactif est non conforme

- 5.4. Bien homogénéiser le contenu des cupules manuellement en tapotant sur les côtés de la microplaque ou à l'aide d'un agitateur pour microplaque
- 5.5. Placer la microplaque sur une surface plane à l'abri des vibrations pendant 2 heures
6. Lecture du test
 - 6.1. Présence d'un point ou d'un anneau plus ou moins large au fond de la cupule : réaction négative
 - 6.2. Présence d'un voile de couleur rouge-marron qui tapisse la cupule : réaction positive (dans certains cas un liseré périphérique est observé)
 - 6.3. Lorsque la concentration en Ac anti-*E. granulosus* est très élevée, un phénomène de zone ou de pro-zone peut être observé. Il y a alors rétraction du voile (sédimentation en "tache") dans les premières cupules
 - 6.4. Si la cupule A présente une réaction positive, le sérum contient des Ac anti globule rouge de mouton. Il faut donc adsorber ce sérum avec des GRAds (R3) (point 7) et recommencer la réaction
 - 6.5. Si les cupules B à G présentent une réaction positive il faut poursuivre les dilutions pour obtenir le titre du sérum en Ac anti-*E. granulosus*
7. Adsorption des sérums avec les GRAds (R4) pour éliminer les Ac anti globule rouge de mouton
 - 7.1. Déposer dans un tube à hémolyse 150 μL de la suspension de GRAds et ajouter 50 μL de sérum
 - 7.2. Agiter et incubé 45 à 60 minutes à la température ambiante (18°C à 30°C)
 - 7.3. Ajouter 1,8 mL de tampon PBS
 - 7.4. Agiter et centrifuger le tube 15 à 20 minutes à 2000-2200 g
 - 7.5. Prélever le surnageant, correspondant au sérum dilué au 1/40
8. Reprendre la réalisation du test dans une microplaque (point 5) en utilisant le sérum adsorbé dilué au 1/40

Interprétation des résultats

1. Sérum ayant un Titre (inverse de la dilution) < 80 : Réaction négative
 - 1.1.1. Absence d'argument immunologique en faveur d'un d'hydatidose
 - 1.1.2. Tester le sérum avec une autre technique
 - 1.1.3. Refaire une sérologie dans 2 à 3 semaines
2. Sérum ayant un Titre (inverse de la dilution) de 80 ou 160 : Réaction douteuse

2.1.1. Tester le sérum avec une autre technique

2.1.2. Refaire une sérologie dans 2 à 3 semaines

3. Sérum ayant un Titre (inverse de la dilution) > 160 : Réaction positive

Présence d'argument immunologique en faveur d'un d'hydatidose

NB: Pour le suivi d'un patient en cas de résultats douteux ou après traitement chirurgicale et/ou médicamenteux, il est recommandé de tester les sérums en parallèles avec le même lot du réactif Hydatidose HAI BMDT (le même coffret).

Contrôle qualité de l' Hydatidose HAI BMDT

1. Après agitation, les suspensions de GRNS (R1), de GRS (R2) et de GRAdS (R3) doivent être parfaitement homogène et de couleur rouge-marron.
2. Le contrôle positif et le contrôle négatif permettent de vérifier la bonne réactivité des suspensions de GRNS (R1) et des GRS (R2). Une réaction positive et une réaction négative doivent être observées respectivement avec le contrôle négatif et le contrôle positif.
3. Pour le contrôle positif un titre (inverse de la dilution) de 640 (plus ou moins une dilution : titre de 320 à 1280) doit être obtenu (Photo ci-dessous)

Dilutions du sérum							PBS
GRNS	GRS						GRS
1/80	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	



4. Le réactif ne doit pas être utilisé lorsqu'il n'agglutine pas avec le contrôle positif, ou s'il agglutine avec le contrôle négatif (Ces mauvais résultats peuvent être dus à une mauvaise conservation du coffret d' Hydatidose HAI BMDT ou à une contamination d'un des réactifs).

Remarque pour la conservation des microplaques

Après utilisation d'une ou de plusieurs rangées de cupules de la microplaque, cette dernière sera conservée, avec son couvercle, à l'abri de la poussière et à la température du laboratoire (entre 15° et 25°C), pour une utilisation ultérieure. Un dessèchement du contenu des cupules utilisées peut être observé après une conservation de plusieurs jours. Pour la réalisation d'un nouveau test il faut utiliser une rangée de cupules vierges.

Performances

1. Précision

La répétabilité et la reproductibilité du réactif Hydatidose HAI BMDT ont été étudiée en utilisant : 3 lots d' Hydatidose HAI BMDT, deux pools de sérums positifs et un pool de sérums négatifs (tableau 2). Les coefficients de variation (CV) obtenu pour les pools de sérums positifs étaient inférieurs à 50%. Ces CV sont conformes pour un test d'hémagglutination qui est une technique semi-quantitative.

Répétabilité (Reproductibilité intra-lot)	Nombre de tests	Moyenne du titre	CV
Pool de sérums positifs avec un titre de 1280	33	1318±355	27%
Pool de sérums positifs avec un titre de 320	33	368±116	31%
Pool de sérums négatifs	33	Négatif (<80)	NA

Reproductibilité inter-lots		Moyenne du titre	CV
Pool de sérums positifs avec un titre de 1280		1706±739	43%
Pool de sérums positifs avec un titre de 320		426±184	43%
Pool de sérums négatifs		Négatif	NA
Tableau 2 : Coefficients de variation obtenus des études de répétabilité et de reproductibilité			

2. Spécificité et sensibilité

Les études de spécificité et de sensibilité ont été réalisées à l'aide de :

- sérums connus comme étant positifs en sérologie hydatidose,
- sérums de patients ayant une pathologie hépatique non parasitaire,
- sérums de patients atteints de diverses parasitoses (amoebiose, ascaridiose, distomatose, schistosomose),
- sérums de sujets apparemment sains.

Tous les sérums ont été testés, pour la recherche d'Ac anti-*E. granulosus*, avec l'Hydatidose HAI BMDT, une HAI Hydatidose commercialisée et marquée CE et une technique d'ELISA.

Les résultats obtenus ont montré (Tableaux 3 et 4) que le test Hydatidose HAI BMDT présentait :

- Une sensibilité de 100 % pour l'hydatidose hépatique et de 66,6 à 83,3% pour l'hydatidose pulmonaire (résultats douteux considérés comme négatifs ou positifs). Cette sensibilité relativement faible pour la localisation pulmonaire a été rapportée par d'autres auteurs,
- Une spécificité de 95 à 100 % (résultats douteux considérés comme positifs ou négatifs),
- Une valeur prédictive positive (VPP) de 87,5 à 100% (résultats douteux considérés comme positifs ou négatifs),
- Une valeur prédictive négative (VPN) de 95,24 à 98,28% (résultats douteux considérés comme négatifs ou positifs),
- Un X^2 (Khi carré) supérieur à 63 qui démontre une liaison statistiquement significative entre le diagnostic de l'hydatidose et le résultat du test Hydatidose HAI BMDT.

L'analyse des résultats obtenus avec les 3 techniques utilisées (Hydatidose HAI BMDT, HAI Hydatidose Fumouze, ELISA Hydatidose Kalidiv) ne montrait pas de différence significative.

	Hydatidose HAI BMDT				
	Positif	Douteux	Négatif	Total	
HAI Hydatidose réactif commercialisé (CE)	Positif	20	0	0	20
	Douteux	0	0	0	0
	Négatif	0	1*	1*	2
	Total	20	1	1	22

Tableau 3 : nombre de sérums positifs, négatifs ou douteux obtenu avec les 22 sérums connus comme étant positifs en sérologie hydatidose
* ces sérums provenaient de patients ayant une hydatidose pulmonaire

	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN	X ²
Résultats douteux considérés comme négatifs	86,36%	100%	100%	95,24%	67,45
Résultats douteux considérés comme positifs	95,45%	95%	87,5%	98,28%	63,62

Tableau 4 : performance du test Hydatidose HAI BMDT

VPP : valeur prédictive positive / VPN : valeur prédictive négative / X² : Khi carré

3. Réaction croisée

Dix sérums de patients ayant une pathologie hépatique non parasitaire et 28 sérums de patients atteints de diverses parasitoses (amoebiose, ascariidose, distomatose, schistosomose) ont été testés avec l'Hydatidose HAI BMDT. Un résultat négatif a été obtenu avec tous les sérums.

Des réactions croisées ont été signalées entre les antigènes d'*E. granulosus* et les antigènes d'*E. multilocularis*. Des réactions positives peuvent donc être observées avec les sérums de sujets atteints d'échinococcose alvéolaire, due à *E. multilocularis*.

Limites de Hydatidose HAI BMDT

La sensibilité analytique du réactif Hydatidose HAI BMDT n'a pas été évaluée car il n'y a pas pour la recherche anticorps anti-*E. granulosus* de sérum étalon.

La sensibilité diagnostique a été évaluée à 83,3-95,4% selon que les résultats douteux soient considérés comme négatifs ou positifs.

Le diagnostic d'une hydatidose ne peut être posé que sur la base d'un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques et immunologiques.

Bibliographie

1. Aslan M, Yüksel P, Polat E, Cakan H, Ergin S, Öner YA, Zengin K, Arıkan S, Saribas S, Torun MM, Kocazeybek B. The diagnostic value of Western blot method in patients with cystic echinococcosis. *New Microbiol.* 2011; 34:173-177.
2. Bauomi IR, El-Amir AM, Fahmy AM, Zalat RS, Diab TM. Evaluation of purified 27.5 kDa protoscolex antigen-based ELISA for the detection of circulating antigens and antibodies in sheep and human hydatidosis. *J Helminthol.* 2015;89:577-583
3. Bhutani N, Kajal P. Hepatic echinococcosis: A review. *Ann Med Surg (Lond).* 2018;36:99-105
4. Deininger S, Wellingshausen N. Evaluation of a new combined Western and line blot assay (EUROLINE-WB) for diagnosis and species identification of Echinococcus infection in humans. *GMS Infect Dis.* 2019;7:Doc01.
5. Fathi S, Jalousian F, Hosseini SH, Parsa H, Kordafshari S. A Study of Cross-Reactivity Between Recombinant EPC1 Antigen of Echinococcus granulosus in Serum from Patients with Confirmed Cystic Echinococcosis Infection and Other Parasitic Infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94:1313-1317
6. Gao CH, Wang JY, Shi F, Steverding D, Wang X, Yang YT, Zhou XN. Field evaluation of an immunochromatographic test for diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. *Parasit Vectors.* 2018;11:311
7. Hadj Rabia S, Benmoussa F, Benzaid A, Baz A. Hydatidosis: Preparation and evaluation of radiolabeled antigens and antibodies. *Exp Parasitol.* 2018;187:67-74.
8. Hernández-González A, Sánchez-Ovejero C, Manzano-Román R, González Sánchez M, Delgado JM, Pardo-García T, Soriano-Gálvez F, Akhan O, Cretu CM, Vutova K, Tamarozzi F, Mariconti M, Brunetti E, Vola A, Fabiani M, Casulli A, Siles-Lucas M. Evaluation of the recombinant antigens B2t and 2B2t, compared with hydatid fluid,

- in IgG-ELISA and immunostrips for the diagnosis and follow up of CE patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006741.
9. Khanbabaie S, Riazi M, Chang CH, Yunus MH, Noordin R. Lateral flow dipstick antigen assay for human cystic echinococcosis. *Acta Trop*. 2019;190:171-176.
 10. Lissandrin R, Tamarozzi F, Piccoli L, Tinelli C, De Silvestri A, Mariconti M, Meroni V, Genco F, Brunetti E. Factors Influencing the Serological Response in Hepatic Echinococcus granulosus Infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94:166-171
 11. Pagnozzi D, Biossa G, Addis MF, Mastrandrea S, Masala G, Uzzau S. An easy and efficient method for native and immunoreactive Echinococcus granulosus antigen 5 enrichment from hydatid cyst fluid. *PLoS One*. 2014;9:e104962.
 12. Manzano-Román R, Sánchez-Ovejero C, Hernández-González A, Casulli A, Siles-Lucas M. Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future? *Biomed Res Int*. 2015;2015:428205
 13. Reiterová K, Auer H, Altintaş N, Yolasmaz A. Evaluation of purified antigen fraction in the immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Parasitol Res*. 2014;113:2861-2867.
 14. Sarink MJ, Koelewijn R, Slingerland BCGC, Tielens AGM, van Genderen PJJ, van Hellemond JJ. Performance of the commercially available SERION ELISA classic Echinococcus IgG test for the detection of cystic echinococcosis in clinical practice. *J Helminthol*. 2019;93:636-639.
 15. Sarkari B, Rezaei Z. Immunodiagnosis of human hydatid disease: Where do we stand? *World J Methodol*. 2015;5:185-195
 16. Savardashtaki A, Mostafavi-Pour Z, Arianfar F, Sarkari B. Comparison of the Utility of Recombinant B8/2 Subunit of the Antigen B, Native Antigen, and a Commercial ELISA Kit in the Diagnosis of Human Cystic Echinococcosis. *Iran Biomed J*. 2019;23:246-252
 17. Santivañez SJ, Arias P, Portocarrero M, Rodriguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, Gavidia CM, Garcia HH. Serological diagnosis of lung cystic hydatid disease using the synthetic p176 peptide. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:944-947.
 18. Sedaghat F, Sadjjadi SM, Hosseini SV, Kazemian S, Sarkari B. Evaluation of a simple Dot-ELISA in comparison with counter-current immunoelectrophoresis for diagnosis of human hydatidosis. *Clin Lab*. 2011;57:201-205
 19. Siles-Lucas M, Casulli A, Conraths FJ, Müller N. Laboratory Diagnosis of Echinococcus spp. in Human Patients and Infected Animals. *Adv Parasitol*. 2017;96:159-257
 20. Souki N, El Khattabi W, Bopaka RG, Aichane A, Afif H. Apport de la sérologie hydatique dans le diagnostic positif de l'hydatidose. *Revue des Maladies Respiratoires*. 2015;32:16
 21. Stojkovic M, Junghans T. Cystic and alveolar echinococcosis. *Handb Clin Neurol*. 2013;114:327-34
 22. Tamer GS, Dündar D, Uzuner H, Baydemir C. Evaluation of immunochromatographic test for the detection of antibodies against Echinococcus granulosus. *Med Sci Monit*. 2015;21:1219-22
 23. Velasco-Tirado V, Alonso-Sardón M, Lopez-Bernus A, Romero-Alegría Á, Burguillo FJ, Muro A, Carpio-Pérez A, Muñoz Bellido JL, Pardo-Lledias J, Cordero M, Belhassen-García M. Medical treatment of cystic echinococcosis: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2018;18:306.
 24. Wang JY, Gao CH, Steverding D, Wang X, Shi F, Yang YT. Differential diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis using an immunochromatographic test based on the detection of specific antibodies. *Parasitol Res*. 2013;112:3627-33.
 25. Wuestenberg J, Gruener B, Oeztuerk S, Mason RA, Haenle MM, Graeter T, Akinli AS, Kern P, Kratzer W. Diagnostics in cystic echinococcosis: serology versus ultrasonography. *Turk J Gastroenterol*. 2014;25:398-404
 26. Zait H, Achir I, Guerchani MK, Hamrioui B. Profil épidémiologique de 290 cas d'échinococose kystique humaine diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger (2006 à 2011). *Pathol Biol (Paris)*. 2013;61:193-198.