DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE L'AMIBIASE PAR IMMUNO-FLUORESCENCE. RÉSULTATS DE 160 EXAMENS

Par J. COUDERT, J.-P. GARIN, P. AMBROISE-THOMAS et J. P. GEORGET (*)

Le diagnostic biologique de l'amibiase reste basé sur les résultats de l'examen coprologique qui, s'il révèle la présence d'*Entamoeba dysenteriae* ou de ses kystes, permet d'affirmer l'existence de l'infestation. Une méthode de diagnostic sérologique de l'amibiase pourrait pourtant être précieuse, en particulier dans les cas de localisations extra-intestinales. De nombreuses techniques ont été proposées (fixation du complément, précipitation en gélose, hémagglutination, immobilisation des trophozoïtes). Aucune ne semble, jusqu'ici, être entrée dans la pratique courante faute d'une spécificité suffisante ou à cause des difficultés matérielles de certaines réactions très délicates à réaliser.

En 1953, des études ont été entreprises par l'immuno-fluorescence. Il s'agissait au départ de recherches fondamentales visant à caractériser du point de vue immunologique, des espèces ou des souches amibiennes différentes (GOLDMAN). Par la suite, ces travaux furent étendus au diagnostic sérologique de l'amibiase humaine (GOLDMAN, communication personnelle, JEANES, 1964 et 1966, SIDDIQUI, 1966).

Depuis plus de deux ans, nous avons mis au point une réaction d'immuno-fluorescence indirecte que nous avons appliquée à l'examen de plus de 150 sérums. Notre expérience est encore trop limitée pour dégager des conclusions définitives mais elle permet d'avoir une première idée de la spécificité et des possibilités diagnostiques de cette réaction.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

1° *L'antigène.*

L'antigène est constitué par des étalements sur lames réalisées à partir d'une suspension amibienne.

a) *Origine.* — Nous utilisons une souche d'*Entamoeba dysenteriae*

(*) Séance du 8 février 1967.

entretenue depuis 8 ans au Laboratoire sur milieu de l'Institut Pasteur (les repiquages sont effectués tous les 8 jours).

b) *Prélèvement et purification.* — Au 6e jour de culture on recueille les amibes qui, avec les éléments figurés, se sont rassemblées au fond des tubes de culture.

Pour la réaction d'immuno-fluorescence il est nécessaire de purifier ce prélèvement en le débarrassant des grains d'amidon et des germes microbiens qu'il contient. Cette purification constitue le seul temps vraiment délicat de la réaction. Pour la réaliser on porte le prélèvement dans un tube à centrifuger conique rempli de liquide de Ringer chauffé à 37°. Le mélange est centrifugé pendant 1 à 2 minutes à 1.000 tours/minute et le culot est remis en suspension dans une ou deux gouttes de Ringer tiédi. Pour être utilisable, ce mélange doit présenter des agglomérats assez volumineux (0,1 à 1 mm. environ). On ajoute alors 15 ml. environ de liquide de Ringer à 37° et on laisse reposer : les grains d'amidon et les diverses impuretés sédimentent « en flocons de neige » tandis que les amibes restent en suspension. Le surnageant est centrifugé (1 à 2 minutes à 1.000 tours/minute) et le culot obtenu est, comme précédemment, remis en suspension dans du liquide de Ringer. On laisse à nouveau sédimenter puis on recueille le surnageant qui est centrifugé.

En répétant ces opérations à 2 ou 3 reprises on arrive à éliminer la quasi-totalité des grains d'amidon, le culot de la dernière centrifugation ne contenant presque plus que des amibes.

Par dilution on réalise alors une concentration correspondant à environ 200 parasites par champ microscopique avec un objectif × 10 et des oculaires × 8,5.

c) *Préparation et conservation des étalements.* — Nous utilisons des lames microscopiques, en verre ordinaire, de moins de 1 mm. d'épaisseur. Sur l'une de leurs faces on grave 5 cercles de 1 cm. de diamètre environ et un numéro d'ordre.

Ces lames sont ensuite siliconées (Rhodorsil 240). Après séchage on enlève le siliconage, à l'intérieur des cercles gravés, à l'aide d'une solution de soude N/10. C'est dans ces cercles que l'on dépose une goutte de la suspension d'amibes.

Les préparations sont mises à sécher à l'étude à 37°. Elles sont directement prêtes à l'emploi et permettent chacune l'étude d'un sérum pris à 5 dilutions différentes.

L'adhérence des amibes aux lames microscopiques n'a jamais posé de difficultés dans la mesure où nous avons utilisé des parasites intacts et même encore vivants (c'est pourquoi toutes les opérations de purification sont effectuées avec du liquide de Ringer porté à 37°). Par contre, si les amibes sont tuées par une série de manipulations

trop brutales, elles adhèrent mal au verre et ont tendance à se décoller au cours de la réaction d'immuno-fluorescence.

Ces préparations peuvent être conservées pendant plusieurs semaines, au congélateur à — 20° C.

2. — Exécution de la réaction

1° Sortir les préparations du congélateur. Les laisser sécher à l'air et les fixer, pendant 10 minutes, dans un bain d'acétone.

2° Répartir les diverses dilutions des sérums étudiés à raison d'une ou deux gouttes par étalement. Laisser réagir 1/2 heure à 37°, en atmosphère humide.

3° Laver dans deux bains différents de tampon à pH 7,2 (5 minutes dans chaque bain).

4° Recouvrir les étalements d'une goutte de conjugué fluorescent (anti-gamma-globulines humaines conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine, de l'Institut Pasteur, diluées au 1/30 dans du tampon à pH 7,2). Placer 1/2 heure à 37°, en chambre humide.

5° Laver à nouveau dans deux bains de tampon (deux fois 5 minutes).

6° Plonger les lames, pendant 15 minutes, dans un bain de bleu d'Évans à 1/200 dans le tampon à pH 7,2.

7° Laver comme au 3e et au 5e. Après séchage monter sous lamelles dans une goutte de glycérine tamponnée à pH 7,2.

8° Examiner au microscope à fluorescence (microscope Reichert « Zetopan ». Condensateur à fond clair. Filtres BG 12/6 mm. (émission), CG 9/1 mm. et OG 1/1,5 mm. (filtres d'arrêt).

II. — Résultats et commentaires

1° *Lecture des résultats.*

La contre-coloration par le bleu d'Évans masque la légère fluorescence des diverses impuretés encore présentes dans les préparations et qui, par simple absorption semble-t-il, retiennent une petite fraction du conjugué fluorescent. La lecture de la réaction n'étant plus gênée par ces fluorescences non spécifiques peut donc être effectuée en ne tenant compte que de l'aspect des amibes.

Celles-ci sont rouges si la réaction est négative. Si au contraire le sérum étudié est positif, les parasites présentent une vive fluorescence jaune-verte. En fonction de l'intensité de la réaction, les amibes

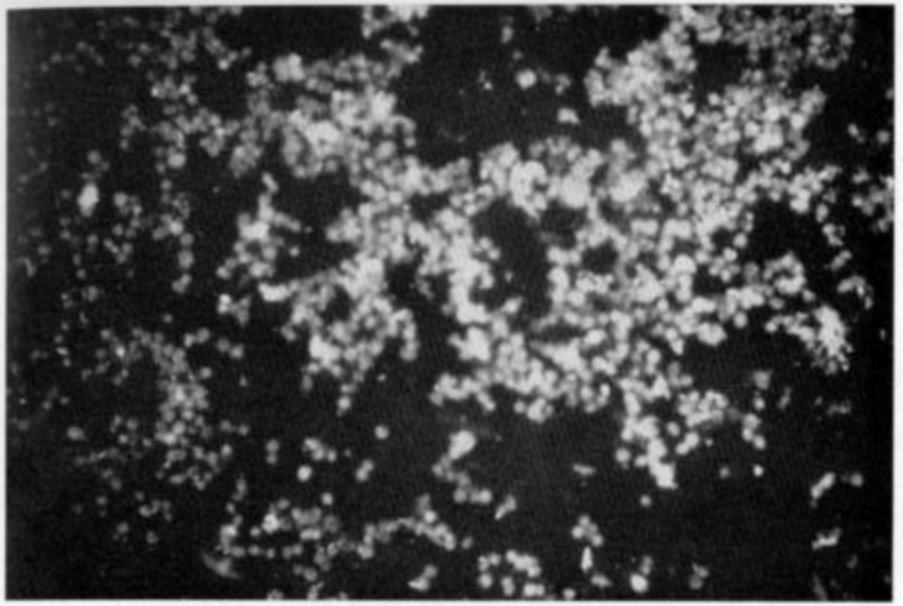

Fig. 1.

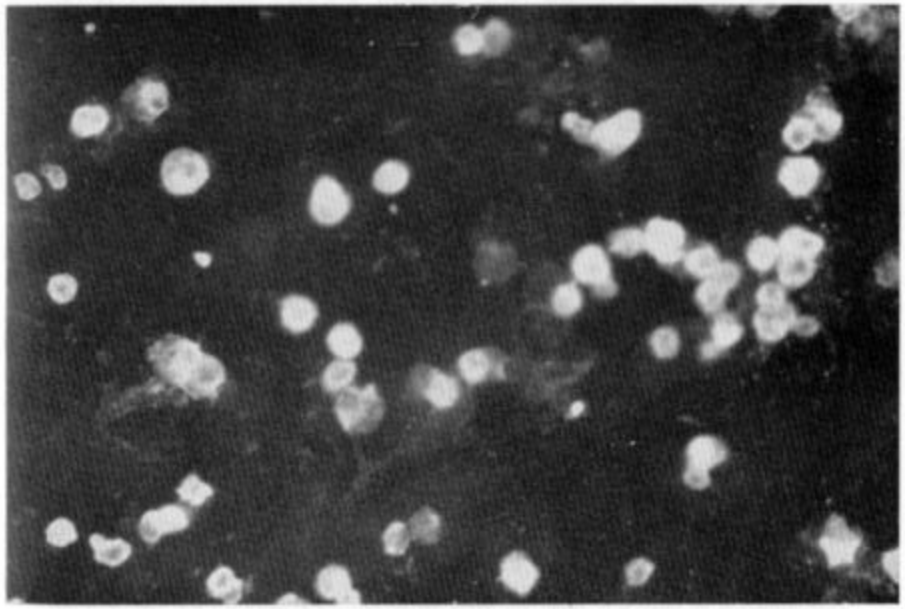

Fig. 2.

Fig. 1. — Séro-diagnostic de l'amibiase par immuno-fluorescence. Réaction positive (objectif × 10).
Fig. 2. — Séro-diagnostic de l'amibiase par immuno-fluorescence. Réaction positive (objectif × 40).

TOME LIX
PLANCHE VIII
Communication :
J. COUDERT, J. P. GARIN,
P. AMBROISE-THOMAS et J. P. GEORGET

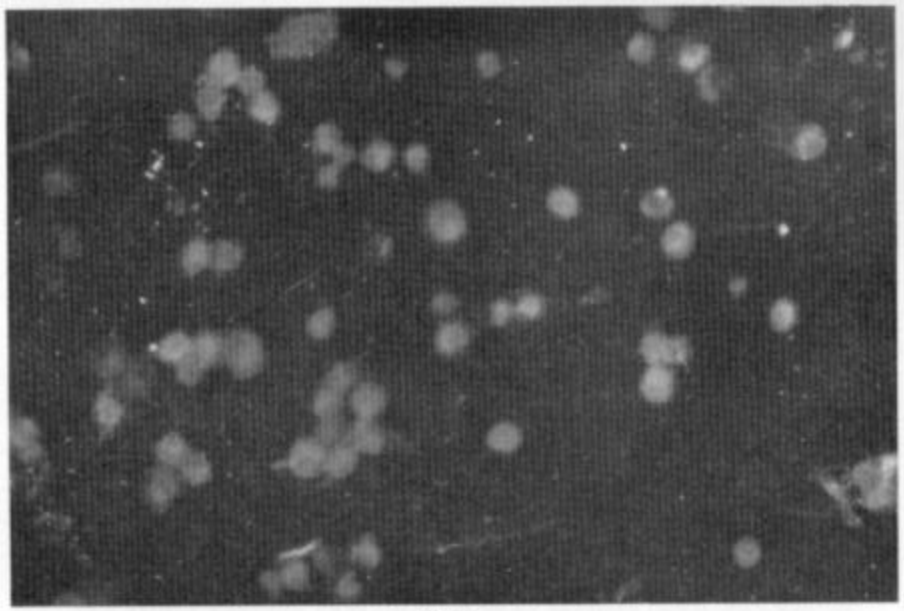

Fig. 3.

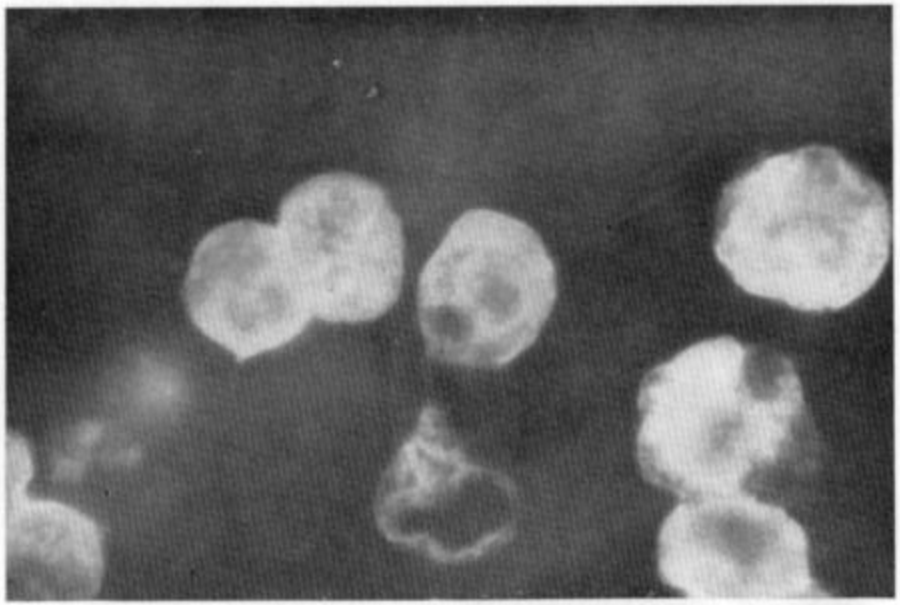

Fig. 4.

Fig. 3. — Séro-diagnostic de l'amibiase par immuno-fluorescence. Réaction négative (objectif × 40).
Fig. 4. — Séro-diagnostic de l'amibiase par immuno-fluorescence. Réaction positive (objectif × 100).

sont uniformément fluorescentes ou bien ne présentent qu'un liséré périphérique brillant tandis que la partie centrale des trophozoïtes est colorée en rouge *(photos)*. Les Blastocystis, souvent présents dans les cultures ambiennes, présentent eux aussi une fluorescence jaune verte mais celle-ci n'est pas spécifique. Compte tenu de leur rareté dans les préparations, ces Blastocystis n'entraînent pas de cause d'erreur même si la lecture des résultats est effectuée avec un très faible grossissement.

2° *Spécificité.*

La spécificité de la réaction a été vérifiée par l'étude de divers sérums que nous avons fait réagir sur des étalements d'*Entamoeba dysenteriae*. Ces contrôles ont porté au total sur 70 sérums :

— 10 sérums de sujets atteints de toxoplasmose,
— 5 sérums de paludéens,
— 10 sérums de distomiens,
— 10 sérums de syphilitiques,
— 30 sérums prélevés à Lyon chez des nouveau-nés.

Tous ces sérums ont été négatifs à la dilution initiale de 1/50, la plupart d'entre eux étant même négatifs dès le 1/25.

Inversement 8 sérums d'amibiens, positifs au 1/100 au moins avec l'antigène *Entamoeba dysenteriae* ont été étudiés avec des préparations d'*Entamoeba coli* et d'*Entamoeba invadens* (*) avec lesquelles ils ont été trouvés négatifs. Ce résultat confirme les conclusions de GOLDMAN concernant les différences antigéniques existant entre *E. dysenteriae* et *E. coli* ou *E. invadens*.

3° *Reproductibilité.*

Comme toujours la reproductibilité a été contrôlée en étudiant plusieurs sérums à diverses reprises et avec des lots d'antigène différents. Nous avons pu ainsi nous assurer que les résultats restaient qualitativement inchangés et que les variations quantitatives enregistrées n'excédaient pas un degré de dilution.

(*) Nous remercions le Professeur BOUISSET de la Faculté de Médecine de Toulouse qui a eu l'obligeance de nous faire adresser une souche d'*Entamoeba invadens*, ainsi que le Professeur M. REY, de la Faculté de Médecine de Dakar, et le Médecin-Colonel FÉLIX, de l'hôpital militaire Desgenettes, auxquels nous devons plusieurs des sérums étudiés.

4° *Sensibilité.*

La sensibilité de cette réaction d'immuno-fluorescence paraît assez grande puisque certains sérums sont encore positifs à 1/1.600. Inversement le seuil de significativité correspond à une dilution initiale de 1/50.

5° *Valeur diagnostique.*

Notre expérience actuelle du diagnostic sérologique de l'amibiase par immuno-fluorescence porte sur plus de 150 sérums. Nous avons retenu 93 résultats correspondants à des malades pour lesquels nous disposions de renseignements cliniques suffisants. Notre étude porte :

— sur l'examen systématique de sujets contacts,
— sur des anciens amibiens et des porteurs de kystes ou de formes minuta,
— enfin sur des cas d'amibiases évolutives, intestinales ou extra-intestinales.

Pour trois de nos malades nous avons pu suivre l'évolution sérologique après traitement.

a) *Examens systématiques de sujets contacts.*

Chez 34 sujets ayant séjourné en zone d'endémie amibienne mais ne présentant ni troubles cliniques, ni antécédents amibiens et pour lesquels l'examen coprologique était négatif, les résultats ont été les suivants :

	Négatif	1/50	1/100	Taux moyens
Européens : 18	18			0
Africains : 16	16	3	2	1/21

Il faut noter que les trois sérologies positives concernent des Africains pour lesquels l'hypothèse d'une infestation ancienne est difficile à éliminer et paraît en tout cas plus probable que pour les Européens dont certains n'avaient fait qu'un court séjour en zone d'endémie et qui tous ont donné des réactions d'immuno-fluorescence négatives.

b) *Porteurs de kystes ou de formes minuta et anciens malades.*

	Nég.	1/50	1/100	Taux moyens
Amibiases anciennes — sans séquelles ni parasites : 13 cas	9	1	3	1/27
— sans séquelles mais avec des formes minuta : 11 cas	6			0
Colites méta-amibiennes — sans parasites : 11 cas	9	2		1/9
— avec des kystes ou des formes minuta : 6 cas	3	2	1	1/36
Porteurs de formes minuta (primo-infestation) : 1 cas	1			0

Pour tous les anciens malades, le taux d'anticorps fluorescents reste assez bas (1/17,5 en moyenne) et ne présente pas de variations bien significatives suivant que l'examen coprologique montre ou non des kystes ou des formes minuta.

Il est d'ailleurs logique que la présence de ces formes non pathogènes n'entraîne aucune réponse immunologique ce que confirme le résultat négatif observé chez un porteur de formes minuta, récemment contaminé.

c) *Amibiases évolutives.*

	nég.	1/50	1/100	Taux moyens
Rechutes aiguës d'amibiases anciennes : 6 cas	2	1	3	1/58
Amibiases intestinales aiguës : 6 cas	2	1	3	1/58

	1/300	1/400	1/600	1/800	1/1600	Taux moyens
Amœbome cæcal : 1 cas	1					1/300
Abcès amibiens du foie : 5 cas		1	1	1	2	1/1.000

Pour les formes intestinales aiguës, qu'il s'agisse d'affections récentes ou non, le taux moyen de 1/58 est légèrement supérieur au seuil de significativité. Toutefois, 4 examens sur 12 ont été négatifs ce qui montre que l'immuno-fluorescence n'a pas une valeur diagnostique absolue pour ces formes purement intestinales.

Pour les formes extra-intestinales, la sérologie est au contraire constamment positive et ceci à des taux très élevés. Ceci est d'autant plus intéressant que c'est précisément dans les amibiases tissulaires que le diagnostic immunologique est particulièrement précieux.

Afin de mieux dégager les possibilités de l'immuno-fluorescence dans le diagnostic sérologique de l'amibiase, nous avons réuni dans le tableau suivant, les taux moyens en anticorps fluorescents obtenus dans chacun des cas considérés.

TABLEAU RÉCAPITULATIF

Examens systématiques de sujets contacts : 34 cas	1/10
Amibiases intestinales anciennes : 19 cas	1/18
Colites méta-amibiennes : 17 cas	1/17
Porteur de formes Minuta (primo-infestation) : 1 cas	0
Rechutes aigues d'amibiases intestinales anciennes : 6 cas	1/58
Amibiases intestinales aigues récentes : 6 cas	1/58
Amœbome cæcal : 1 cas	1/300
Abcès du foie : 5 cas	1/1000

Malgré la légère différence entre les taux moyens obtenus dans chaque cas, il ne semble pas que l'immuno-fluorescence permette de distinguer avec certitude les colites séquellaires des rechutes amibiennes aiguës. D'ailleurs, dans ces formes, l'étude sérologique n'a qu'un intérêt relatif car le diagnostic peut être fait par l'examen coprologique.

Au contraire, la découverte d'un taux d'anticorps fluorescents supérieur à 1/300 paraît hautement significative et doit orienter vers la possibilité d'une localisation viscérale, hépatique en particulier.

d) *Évolution sérologique après traitement.*

Pour les amibiases intestinales aiguës, il nous est encore impossible d'apprécier l'évolution sérologique post-thérapeutique. Par contre, dans deux cas d'abcès amibiens du foie et dans un cas d'amœbome cæcal, nous avons effectué des réactions d'immuno-fluorescence avant et après traitement.

Abcès du foie.

1. Positif à 1/400 : 2 mois après traitement, positif à 1/100.

2. Positif à 1/600 : 1 mois après traitement positif à 1/300 ; 3 mois plus tard positif, à 1/100.

Amoebome caecal.

Positif à 1/300. 5 mois après ablation : positif à 1/100.

Ces résultats, encore très limités, montrent que le traitement entraîne une chute importante du taux d'anticorps fluorescent. Cependant, même après plusieurs mois, la sérologie reste assez élevée (1/100) ce qui montre l'importance des phénomènes immunologiques intervenant dans les formes viscérales de l'amibiase.

CONCLUSION

Par ses qualités de spécificité et de sensibilité aussi bien que par sa réalisation assez facile, la réaction d'immuno-fluorescence semble s'affirmer comme l'une des meilleures méthodes de diagnostic sérologique de l'amibiase.

Les résultats obtenus sont particulièrement nets dans les cas de localisations viscérales (abcès amibiens du foie ou amœbome cæcal) pour lesquelles l'étude des anticorps fluorescents peut constituer un précieux moyen de diagnostic et de contrôle thérapeutique.

RÉSUMÉ

Les auteurs rapportent une première série de résultats obtenus dans le séro-diagnostic de l'amibiase humaine par la technique d'immuno-fluorescence.

La spécificité a été vérifiée en étudiant, avec des préparations antigéniques d'*Entamoeba dysenteriae*, 40 sérums des sujets diversement parasités et 30 sérums de sujets sains. Inversement des sérums d'amibiens ont été testés face à *Entamoeba coli* et *Entamoeba invadens*.

Aucune réaction croisée n'a été notée à partir de la dilution initiale de 1/50.

La reproductibilité paraît satisfaisante et la sensibilité est assez élevée, certains sérums atteignant le taux de 1/1.600.

Des examens sérologiques ont été pratiqués chez des porteurs sains, chez d'anciens amibiens ou chez des malades présentant des amibiases évolutives. Pour trois d'entre eux on a pu suivre l'évolution sérologique après traitement.

Les résultats ont confirmé la valeur diagnostique de la réaction qui semble particulièrement précieuse dans les cas d'abcès amibiens du foie ou d'amœbome cæcal.

Summary

Serological diagnostic of amebiasis by means of immunofluorescence.

In amebiasis extra-intestinal localizations (hepatic, pulmonary amebiasis), the diagnostic of the disease can be performed by means of immunological tests (complement fixation, agglutination tests). The immunofluorescent test on ameba smears (antigen) and patients sera (antibody) may yield valid responses, although its sensitivity is lower than that of complement fixation test.

Laboratoire de Parasitologie
et de Pathologie Exotique
de la Faculté de Médecine de Lyon.

Bibliographie

1. Biagi (F.), Beltran (F.) et Ortega (P.). — Comparación de las reacciones de inmovilización y de immunofluorescence en la amibiasis. Congrès de Parasitologie, Rome, 1964.
2. Goldman (M.). — Use to fluorescein-tagged antibody to identify cultures of *Entamœba histolytica* and *Entamœba coli*. *Am. J. Hyg.*, 1954, **59**, 318-325.
3. Goldman (M.) et Gleason (N. M.). — Antigenic analysis of *Entamœba histolytica* by means of fluorescent antibody. IV. Relationships of two strains of *Entamœba histolytica* and one of *Entamœba hartmani* demonstrated by cross-absorption techniques. *J. Parasit.*, 1962, **48**, 778-783.
4. Goldman (M.). — Communication personnelle.
5. Jeanes (A. L.). — Indirect fluorescent antibody Test in diagnosis of hepatic amœbiasis. *Brit. Med. J.*, 11 juin 1966, 1464.
6. Siddiqui (W. A.) et Balamuth (W.). — Serological comparison of selected parasitic and freeliving amœbae *in vitro*, using gel diffusion, precipitation and fluorescent antibody technics. *J. Protozol. U. S. A.*, 1966, **13**, nº 1, 175-182.