

Le diagnostic sérologique de l'amibiase humaine par la technique des anticorps fluorescents*

P. AMBROISE-THOMAS¹ & T. KIEN TRUONG²

Les auteurs ont appliqué la technique de l'immunofluorescence indirecte au diagnostic de l'amibiase en utilisant comme antigène figuré soit des étalements sur lames d'Entamoeba histolytica entières soit des coupes à la congélation de foies de hamsters parasités.

Après avoir contrôlé la reproductibilité des résultats et la spécificité de la réaction, on a évalué sa valeur diagnostique par l'examen de 238 sérums d'amibiens ou anciens amibiens. Dans les formes hépatiques, la réaction d'immunofluorescence est positive dans 100 % des cas. Dans les formes intestinales aiguës, le taux de positivité est de 91 %, les titres étant relativement faibles. Chez les porteurs de formes non pathogènes, la sérologie est généralement négative. Des titres séquellaires, assez faibles, peuvent être retrouvés chez d'anciens amibiens. L'immunofluorescence paraît présenter un assez grand intérêt comme test de contrôle de l'efficacité thérapeutique dans l'amibiase hépatique.

L'ensemble de ces résultats rejoint ce qui a été obtenu avec d'autres réactions sérologiques. L'avantage principal de l'immunofluorescence est d'être soumise à des impératifs techniques moins difficilement réalisables.

De très nombreuses réactions sérologiques ont été, depuis 1914, proposées pour le diagnostic sérologique de l'amibiase. Certaines de ces techniques utilisent un antigène soluble extrait des amibes : réactions de fixation du complément, d'hémagglutination passive, de précipitation en tube ou en gélose, d'immunoélectrophorèse. D'autres méthodes font appel à un antigène figuré constitué par des amibes elles-mêmes : technique d'agglutination des trophozoïtes ou des kystes et surtout test d'immobilisation des trophozoïtes.

Chacune de ces méthodes présente une valeur indiscutable, mais les résultats dépendent essentiellement de la qualité des réactifs utilisés. Ceci explique les contradictions fréquentes que l'on relève suivant les auteurs. Par ailleurs, ces réactions sont difficilement utilisables sur une vaste échelle étant donné les

difficultés d'obtention et surtout de purification d'extraits antigéniques de bonne qualité. C'est en fonction de tous ces éléments que la sérologie de l'amibiase est, jusqu'ici, restée l'apanage de quelques équipes très spécialisées, disposant de l'expérience et des moyens matériels nécessaires à l'exécution des diverses réactions dans des conditions techniques parfaites.

Il semble que l'immunofluorescence soit susceptible d'une plus large utilisation. Cette technique a été employée dès 1953 par Goldman et ses collaborateurs pour l'étude immunologique des différentes espèces ou souches d'amibes. Ces travaux ont débouché sur une étude sérologique de l'amibiase humaine qui a été également réalisée, par immunofluorescence, par Jeanes (1964, 1966).

Depuis 1965, nous avons mis au point, avec la collaboration du Dr J. P. Georget, une technique d'immunofluorescence indirecte appliquée à l'amibiase humaine. Cette méthode est régulièrement utilisée comme moyen de diagnostic pratique pour les prélèvements qui nous sont adressés par différents laboratoires de France ou de l'étranger. Actuellement notre expérience porte sur plus de 900 sérums dont plusieurs centaines concernent des amibiens ou

* Travail de l'Institut de Médecine et d'Hygiène tropicales (Directeur: J. Coudert), Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Lyon, France. Cette recherche a bénéficié d'une aide financière de l'Organisation mondiale de la Santé.

¹ Chargé des fonctions de Maître de Conférences à la Faculté de Médecine, Université de Grenoble, France.

² Assistant au Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Lyon.

d'anciens amibiens. C'est le bilan de ces résultats que nous présentons. Nous envisagerons successivement:

- un bref rappel de la technique employée,
- la reproductibilité des résultats,
- la spécificité de la méthode,
- enfin sa valeur comme moyen de diagnostic sérologique des différentes formes d'amibiase et comme test de contrôle d'efficacité thérapeutique ou même de guérison.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

La technique employée a déjà été décrite dans plusieurs publications antérieures (Coudert et al., 1967; Georget, 1967). Schématiquement, il s'agit d'une réaction d'immunofluorescence indirecte avec contre-coloration par le bleu d'Evans à 1/200 pendant 10 minutes.¹ Nous rappelons succinctement les divers éléments de cette réaction.

Préparations antigéniques

Elles sont constituées d'étalements sur lames d'amibes en culture qui, par sédimentation et centrifugation différentielle, ont été débarrassées des éléments non parasitaires. Ces suspensions ainsi purifiées sont réparties sur des lames porte-objet, à raison d'une goutte, à l'intérieur de cercles de 1 cm de diamètre environ, gravés au diamant sur une face des lames.

Ces préparations sont séchées, à l'étuve à 37°C, sous ventilation.

Nous avons employé également des coupes à la congélation, de 5 μ d'épaisseur, de foies de hamsters inoculés par voie hépatique avec une souche d'*Entamoeba histolytica*.

Dans l'ensemble, ces préparations présentent deux avantages principaux:

a) économie de matériel parasitaire: il faut une quantité minime de parasites pour chaque réaction puisque avec 1 ml d'une suspension contenant approximativement 100 000 amibes on peut réaliser environ 100 réactions. De même, pour les coupes à la congélation, un foie de hamster parasité par *E. histolytica* fournit un matériel antigénique suffisant pour plusieurs milliers de tests;

b) préparation et conservation faciles: ce matériel, facilement préparé, peut être aisément conservé par le

froid (conservation de quelques semaines à -20°C, conservation pratiquement indéfinie dans l'azote liquide) ou bien, pour les amibes de culture, sous forme de suspension saccharosée lyophilisée (conservation également de très longue durée).

Sérums

Les sérums sont étudiés sans chauffage préalable à 56°C pendant une demi-heure. Jusqu'au moment de l'examen, ils sont conservés à basse température (azote liquide).

Conjugué

Le conjugué fluorescent anti-globulines humaines est un produit commercial (sérum fluorescent de lapin anti-globulines humaines de l'Institut Pasteur de Paris, lots N^{os} 70 000 et 70 049) qui, au moment de la réaction, est utilisé à la dilution de 1/20 dans un tampon à pH 7,2.

Lecture des résultats

L'installation microscopique comprend un microscope Reichert Zetopan. La lecture des résultats est effectuée avec un condensateur à fond clair et un objectif de très faible grossissement ($\times 10$ ou $\times 20$). On utilise un filtre BG 12/6 mm (filtre d'émission) et des filtres OG 1 et GG 9 (filtres d'arrêt).

La lecture ne laisse place à aucune interprétation subjective. Les réactions positives se traduisent par une fluorescence jaune-verte intense des parasites. Si le résultat est négatif, les amibes sont colorées en rouge, en lumière ultraviolette, par le bleu d'Evans (fig. 1).

REPRODUCTIBILITÉ

La reproductibilité de la réaction a été appréciée de deux façons:

a) examens répétés de certains sérums avec un type donné d'antigène,

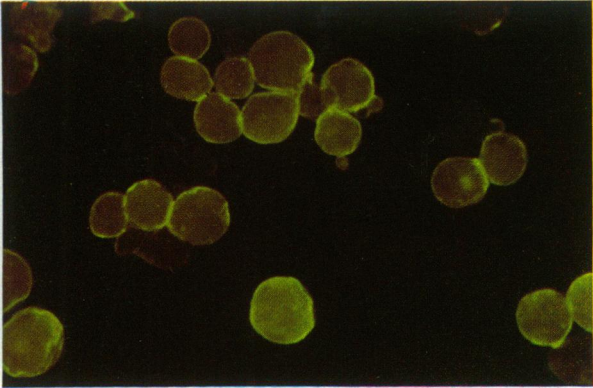
b) comparaison des résultats obtenus, pour différents lots de sérums, avec des étalements sur lames de six souches différentes d'*E. histolytica* ou des coupes à la congélation de foies de hamsters parasités par une de ces souches.

1. Plusieurs dizaines de contrôles effectués avec des sérums témoins, conservés dans de l'azote liquide, titrés sur un type donné d'antigène (étalements sur lames d'*E. histolytica* souche AS) n'ont montré aucune variation significative des titres d'anticorps fluorescents. En aucun cas, ces différences n'ont dépassé un degré de dilution.

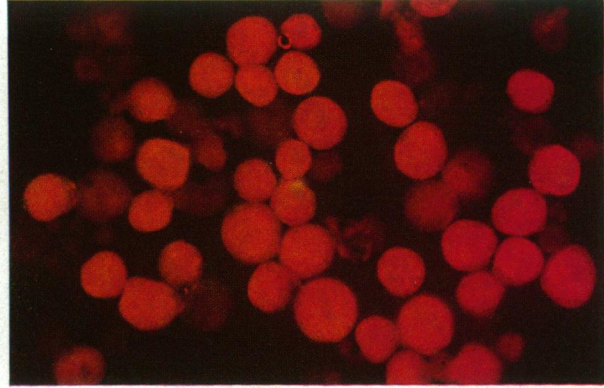
¹ Le bleu d'Evans est employé à cette concentration pour les étalements sur lames d'amibes entières. Pour les coupes à la congélation, le bleu d'Evans est utilisé au 1/10 000, également pendant 10 minutes.

FIG. 1
DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE L'AMIBIASE PAR IMMUNOFLOUORESCENCE INDIRECTE

A) Etalements sur lames d'*Entamoeba histolytica* entières

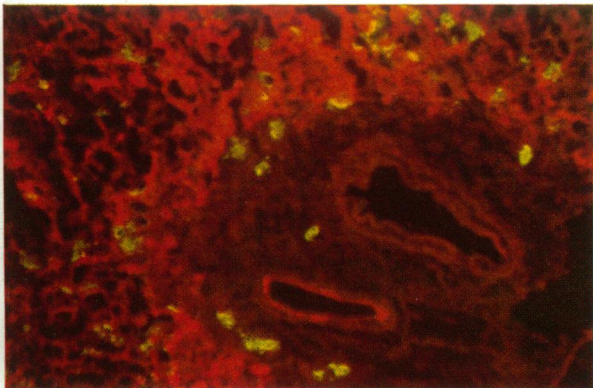


Réaction positive

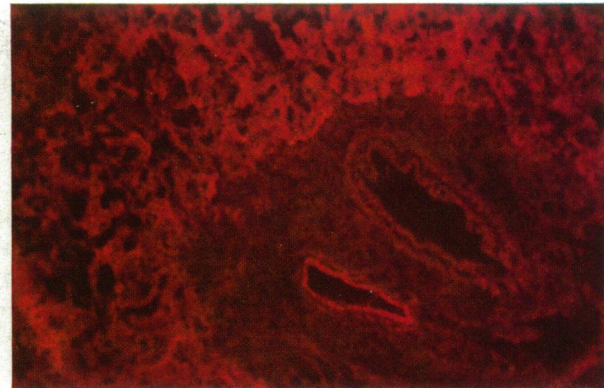


Réaction négative

B) Coupes à la congélation d'*Entamoeba histolytica* dans un foie parasité



Réaction positive



Réaction négative

2. En ce qui concerne l'utilisation de souches différentes d'*E. histolytica*, en étalements sur lames ou dans des coupes à la congélation, la reproductibilité s'est révélée également très satisfaisante. Les souches utilisées correspondent toutes à des amibes entretenues en culture *in vitro* en présence d'une flore

bactériologique complexe (souches AS, W, NS et SF) ou en milieu bactériologiquement stérile (souches HK9 et 200). Les contrôles ont porté au total sur 30 sérums d'amibiens. Les résultats, résumés dans le tableau 1, montrent que, avec les étalements sur lames d'amibes entières, les titres obtenus sont

TABLEAU 1
ACTIVITÉS ANTIGÉNIQUES COMPARÉES DE SIX SOUCHES D'*ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Sérums	Titres d'anticorps fluorescents						
	en étalements sur lames						sur coupes
	AS	W	NS	HK9	200	SF	SF
1	1/50	1/50	1/50	1/100	1/100	1/50	1/50
2	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50
3	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/100
4	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/100
5	1/50	1/50	1/50	1/50	1/100	1/50	1/200
6	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/400
7	1/100	1/100	1/100	1/200	1/200	1/100	1/400
8	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/400
9	1/200	1/200	1/200	1/400	1/200	1/200	1/800
10	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/800
11	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/800
12	1/400	1/400	1/400	1/800	1/400	1/400	1/1600
13	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/1600
14	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/1600
15	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/1600
16	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/400	1/3200
17	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/3200
18	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/3200
19	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/3200
20	1/800	1/800	1/800	1/800	1/1600	1/800	1/3200
21	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/3200
22	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/800	1/6400
23	1/800	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/800	1/6400
24	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	1/3200	1/1600	1/6400
25	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	1/6400
26	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	1/6400
27	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/6400
28	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/12800
29	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/12800
30	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/12800

TABLEAU 2
CONTRÔLES DE SPÉCIFICITÉ SUR DES SÉRUMS TÉMOINS

Origine du sérum	Nombre de sérums examinés	Nombre de sérums de titre		
		1/12	1/25	1/50
Sujets normaux	60	44	16	0
Porteurs d' <i>Entamoeba coli</i>	5	3	2	0
Porteurs de <i>Lamblia intestinalis</i>	8	6	2	0
Porteurs de <i>Trichomonas intestinalis</i>	2	1	1	0
Malades atteints de toxoplasmose	30	24	6	0
Malades atteints de schistosomiase (<i>Schistosoma mansoni</i>)	18	11	7	0
Malades atteints de distomatose (<i>Fasciola hepatica</i>)	40	28	12	0
Malades atteints d'hydatidose	20	14	6	0
Malades atteints de syphilis	20	12	8	0
Malades atteints d'hépatite virale	5	3	2	0
Total	208	146	62	0

sensiblement identiques. L'emploi de coupes à la congélation de foies de hamsters inoculés avec une de ces souches (souche SF) entraîne un gain de sensibilité assez important et qui concerne surtout les sérums fortement positifs.

Cette différence entre les étalements sur lames et les coupes d'organe parasité relève sans aucun doute du mode de conditionnement. En effet :

a) sur les coupes à la congélation, on révèle la totalité des sites antigéniques amibiens y compris les sites intraparasitaires. Au contraire, avec les étalements sur lames d'amibes entières, ce sont surtout les sites antigéniques de surface qui sont mis en évidence ;

b) la confection des coupes à la congélation fait subir aux parasites des manipulations moins agressives que les nombreux lavages nécessaires à la purification des suspensions amibiennes employées en étalements sur lames. Il est vraisemblable que ces lavages répétés altèrent ou détachent certaines structures antigéniques qui sont au contraire préservées sur des parasites coupés *in situ* ;

c) il semble que l'on puisse rejeter l'hypothèse d'une augmentation de l'activité antigénique des amibes du fait de leur inoculation à des animaux d'expérience. En effet, les foies sont prélevés chez des hamsters inoculés, depuis trois jours au plus, avec des amibes de culture. Ce délai est trop court pour que d'importantes variations antigéniques puissent survenir.

SPÉCIFICITÉ

Les contrôles de spécificité ont porté d'abord sur l'examen de 15 sérums d'amibiens avec des étalements sur lames d'amibes non histolytiques (*E. coli* et *E. invadens*). Ces sérums ont été trouvés négatifs à des dilutions inférieures à 1/50.

Nous avons par ailleurs testé 208 sérums témoins, prélevés chez des sujets sains ou des malades présentant différentes affections parasitaires, bactériennes ou virales, vis-à-vis de différents types d'antigènes *E. histolytica*. Les résultats sont portés dans le tableau 2. Ils sont identiques pour tous les antigènes et nous ont conduits à retenir comme première dilution significative la dilution de 1/50.

A l'issue de ces contrôles de reproductibilité et de spécificité, on voit que la méthode ne risque pas d'être mise en défaut si on utilise diverses souches d'*E. histolytica* ou des types différents de préparation antigénique.

Dans tous les cas, le seuil de spécificité de 1/50 demeure inchangé. Ce n'est qu'avec des coupes à la congélation de foies parasités que la sensibilité de la réaction peut être modifiée, en révélant des titres plus élevés d'anticorps fluorescents spécifiques.¹

¹ Pour assurer l'homogénéité des résultats, nous n'avons indiqué, dans la suite de ce travail, que les titres d'anticorps fluorescents obtenus face à des étalements sur lames d'amibes entières.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Au total cette étude porte sur plus de 550 sérums d'amibiens ou d'anciens amibiens. Nous n'avons retenu que 238 résultats qui concernent des malades pour lesquels nous avons pu disposer de renseignements suffisamment précis.

Une grande partie de ces sérums a été collectée à Lyon. Le reste nous a été adressé par des correspondants de France, d'Afrique du Nord, d'Afrique noire ou d'Extrême-Orient.

Résultats

Les résultats d'ensemble sont indiqués dans le tableau 3. Nous y avons porté les titres d'anticorps fluorescents et, pour chaque catégorie de malade, la moyenne géométrique de l'inverse de ces titres (MGIT). Cette moyenne (Waugh, 1952) est donnée par :

$$\text{MGIT} = \text{antilog } \Sigma f(\log X)/N$$

où X représente l'inverse des différents titres d'anticorps fluorescents, f le nombre de sérums qui ont respectivement donné chacun de ces titres et N le nombre total d'examen.

Pour la calculer, nous avons admis que tous les résultats négatifs (à la dilution seuil de 1/50) auraient été positifs à la dilution de 1/1.

Les moyennes permettent d'apprécier les différences existant globalement entre les catégories de malades. Par contre, leur comparaison directe n'est pas correcte sur le plan statistique (absence de normalité des distributions). Pour effectuer ces comparaisons, nous avons utilisé le test de Fisher en groupant les résultats en quatre catégories : négatifs, faiblement positifs (1/50 et 1/100), moyennement positifs (1/200 et 1/400) et fortement positifs (1/800 et au-dessus).

Analyse

1) Dans les formes hépatiques, la réaction est constamment positive et généralement à des titres très élevés.

La moyenne géométrique de ces titres est plus de 10 fois supérieure à celle des formes aiguës purement intestinales.

Enfin l'analyse statistique ne met pas en évidence de variations significatives en fonction de l'origine ethnique des malades. Dans l'ensemble pourtant les Africains, qui sont plus souvent et plus massivement contaminés, ont des titres sériques moyens plus élevés que ceux des Européens.

2) Dans les formes aiguës intestinales (avec présence de formes *histolytica*), la réaction peut être négative dans quelques cas qui concernent tous des Européens. Pour le reste, les titres ne dépassent que rarement les 3 premières dilutions significatives (1/50 à 1/200).

Si on compare les résultats concernant les Européens à ceux qui ont été obtenus chez des Nord-Africains, le test de Fisher révèle une différence très significative ($\alpha < 0,005$). Ceci traduit l'importance des réinfections qui sont en moyenne moins fréquentes chez les Européens.

Par ailleurs, au moins pour les Européens, l'ancienneté de l'infection (formes aiguës d'emblée ou rechutes aiguës d'affections latentes) paraît modifier sensiblement la moyenne des résultats.

3) La présence de formes non pathogènes (formes *minuta*) s'accompagne d'une sérologie toujours négative chez les porteurs sains n'ayant jamais hébergé de formes *histolytica*. Chez d'anciens amibiens guéris cliniquement mais non parasitologiquement, on peut observer des résultats faiblement positifs qui correspondent sans doute à des titres séquellaires.

4) Dans les amibiases anciennes, guéries depuis plus de 2 ans, la réaction d'immunofluorescence est, dans l'ensemble, négative. Malheureusement ceci n'est pas absolu et des résultats faiblement positifs sont observés dans 16% des cas environ. Il est donc illusoire d'espérer que l'immunofluorescence puisse résoudre le difficile problème diagnostique que pose la distinction des amibiases purement séquellaires des affections qui sont peut-être encore évolutives. En la matière, la sérologie ne peut apporter qu'un élément de présomption, et c'est à l'examen parasitologique de trancher.

5) Dans les examens systématiques, pratiqués chez des sujets ayant vécu en pays d'endémie amibienne mais ne présentant aucun signe clinique ou parasitologique d'amibiase, la sérologie est évidemment le plus souvent négative. Il est intéressant de noter combien, dans ces cas surtout, les titres moyens des sérums d'Européens sont très inférieurs à ceux des sérums d'Africains. Cette différence est d'ailleurs statistiquement très significative ($\alpha < 0,01$).

Discussion

Les résultats que nous venons d'envisager de façon analytique correspondent parfaitement à diverses données parasitologiques et épidémiologiques. Ils débouchent en outre sur des conclusions

pratiques concernant la valeur diagnostique de l'immunofluorescence.

1) Par rapport aux données parasitologiques, les résultats de la sérologie sont avant tout conditionnés par l'intimité des relations hôte-parasite. Les titres les plus élevés correspondent en effet aux formes tissulaires intrahépatiques, les formes purement intestinales s'accompagnant de sérologies moins élevées. Quant aux formes non pathogènes, vivant en simples saprophytes à la surface de la muqueuse intestinale, elles n'induisent aucune réponse immunologique et si des réactions positives sont parfois enregistrées, elles correspondent à des phénomènes séquellaires.

2) Par rapport aux données épidémiologiques, il est frappant de constater les différences qui existent entre les sérologies des Européens et celles des Nord-Africains ou des Africains. Ceci rejoint d'ailleurs ce qui a été observé par divers auteurs, notamment Powell et al. (1966), Maddison et al. (1965a-b) et Elsdon-Dew & Maddison (1952), utilisant d'autres techniques sérologiques.

Il est possible que, dans ces différences, interviennent des facteurs ethniques. Beaucoup plus important et vraisemblable nous semble le rôle joué par les conditions économiques et sociales qui influencent aussi bien l'équilibre alimentaire que la fréquence et l'importance des recontaminations.

3) En ce qui concerne la valeur diagnostique pratique de l'immunofluorescence, il faut distinguer :

a) les amibiases hépatiques, où cette valeur diagnostique est certaine puisque la réaction est positive dans 100% des cas et généralement à des titres très élevés.

Ceci est d'autant plus précieux que ce sont précisément les formes hépatiques qui posent de difficiles problèmes diagnostiques: on trouve rarement les amibes dans le liquide ponctionné ou dans des fragments biopsiques¹ et le plus souvent on doit se contenter, en l'absence de données sérologiques, d'un diagnostic de probabilité fondé sur :

— des notions anamnestiques (contage ou antécédents amibiens),

¹ Signalons qu'en ce domaine l'immunofluorescence peu présenter un grand intérêt pour le diagnostic direct de l'amibiase. En effet, sur les coupes de foie que nous avons utilisées comme antigènes, les parasites n'étaient pratiquement pas reconnaissables par les techniques habituelles de coloration. Au contraire, l'immunofluorescence permettait leur mise en évidence de façon particulièrement démonstrative.

— le fait que le pus prélevé est bactériologiquement stérile (au moins dans la grande majorité des cas);

b) les amibiases intestinales aiguës, où la sérologie est irrégulièrement positive (91% des cas environ) et quelquefois à des titres bas qui peuvent également correspondre à des affections anciennes.

L'immunofluorescence n'a donc ici qu'une valeur relative d'autant que l'on dispose d'un moyen de diagnostic indiscutable avec l'examen parasitologique des selles;

c) les formes intestinales subaiguës, pour lesquelles le problème est souvent de savoir s'il s'agit de manifestations purement séquellaires ou de parasitoses qui continuent à évoluer. Il est illusoire dans ces cas d'attendre de l'immunofluorescence autre chose qu'une présomption, qu'elle ne fournit d'ailleurs que rarement.

INTÉRÊT DE L'IMMUNOFLUORESCENCE COMME TEST D'EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE OU DE CONTRÔLE DE GUÉRISON

Résultats

Dans des cas d'amibiase hépatique, nous avons pu suivre les malades après traitement. Les examens sérologiques n'ont certes pas été effectués dans tous les cas avec la même régularité, mais l'ensemble permet néanmoins de dégager l'évolution sérologique post-thérapeutique.

Pour cela, nous avons regroupé dans le tableau 4 les résultats correspondants à différents intervalles de temps après le traitement: 10^e jour (du 6^e au 15^e jour), 20^e jour (du 16^e au 25^e jour), etc.

Commentaires et discussion

Dans la figure 2 nous avons porté, pour chaque intervalle de temps, la moyenne des titres d'anticorps ainsi que les valeurs extrêmes correspondantes.

Cette courbe montre qu'à partir du 20^e jour suivant le début du traitement s'amorce une diminution rapide des titres d'anticorps fluorescents qui, au 2^e mois, sont tombés à moins de 1/12 de leur valeur initiale d'avant le traitement.

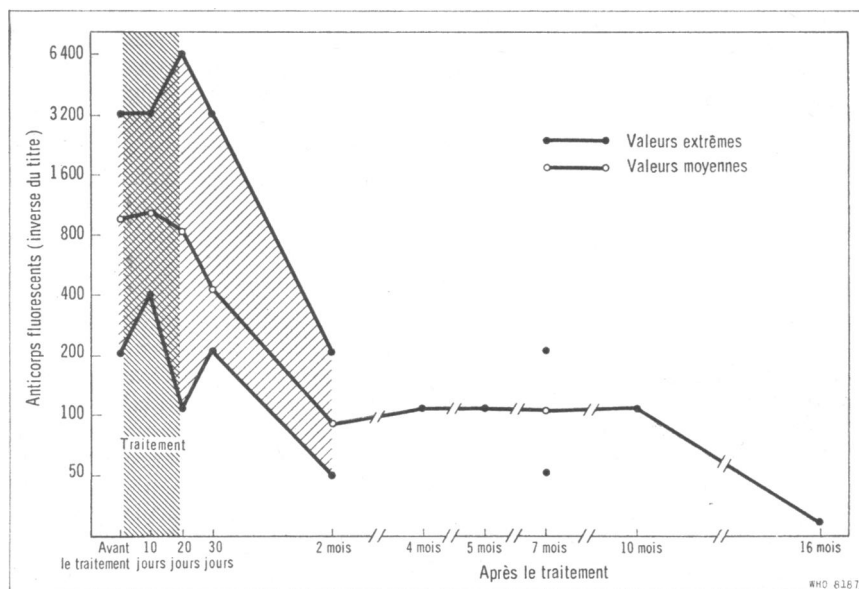
Au-delà du 2^e mois, la sérologie semble se maintenir à un niveau sensiblement constant et qui paraît assez bas.

Ce n'est sans doute qu'après un recul de plus d'un an que l'on peut espérer voir se négativer totalement la réaction, mais notre expérience actuelle est encore beaucoup trop fragmentaire pour que nous puissions l'affirmer.

TABLEAU 4
ÉVOLUTION SÉROLOGIQUE POST-THÉRAPEUTIQUE DES CAS D'AMIBIASE HÉPATIQUE

Date du titrage	Nombre de sérums examinés	Nombre de sérums de titre									Moyenne géométrique de l'inverse des titres
		Négatif	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	
Avant le traitement	42	0	0	0	2	6	16	11	7	0	1020
Après le traitement											
Après 10 jours	11	0	0	0	0	3	3	3	2	0	1028
Après 20 jours	4	0	0	1	1	0	0	0	1	1	800
Après 30 jours	9	0	0	0	4	1	3	0	1	0	446
Après 2 mois	4	0	2	1	1	0	0	0	0	0	84
Après 4 mois	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	—
Après 5 mois	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	—
Après 7 mois	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	—
Après 10 mois	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	—
Après 16 mois	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	—

FIG. 2
ÉVOLUTION SÉROLOGIQUE POST-THÉRAPEUTIQUE (AMIBIASE HÉPATIQUE)



Malgré cette réserve, il semble que l'immunofluorescence constitue un bon test d'activité thérapeutique ou même de contrôle de guérison. En effet, la chute brutale et rapide des titres d'anticorps fluores-

cents, dans un délai de moins de 2 mois, est extrêmement évocatrice et peut être facilement appréciée.

Sur un plan plus général, cette évolution sérologique post-thérapeutique doit être rapprochée de

celle de diverses helminthiases (schistosomiase, distomatose, hydatidose) que nous avons étudiées également par la technique d'immunofluorescence. Dans ces affections, l'efficacité du traitement se traduit par une augmentation, transitoire mais importante, du titre des anticorps fluorescents qui ne diminuent qu'ultérieurement. Ceci est indiscutablement lié à la libération, sous l'effet de la thérapeutique, d'antigènes provenant de la destruction des helminthes.

Il ne semble pas que ce phénomène soit observé pour les protozooses (amibiase, paludisme) où l'on ne retrouve pas de clochers sérologiques après traitement. L'explication de cette différence entre protozooses et helminthiases tient sans doute à de multiples facteurs.

CONCLUSION

Au total, la réaction d'immunofluorescence indirecte paraît présenter une valeur diagnostique très grande pour les amibiases hépatiques (où elle est

positive dans tous les cas) et un intérêt plus relatif pour les amibiases aiguës purement intestinales. Au moins dans les cas d'abcès amibien du foie, cette méthode peut constituer un moyen utile de contrôle du traitement.

Nous avons jusqu'ici assez peu de documents précis sur la valeur des autres méthodes sérologiques comme test de contrôle thérapeutique. En ce qui concerne leur valeur diagnostique, ces diverses réactions (fixation du complément, hémagglutination conditionnée, précipitation en gélose ou immobilisation des trophozoïtes) paraissent avoir sensiblement les mêmes possibilités que l'immunofluorescence. Cependant, à cause des multiples difficultés matérielles qu'elles supposent, elles ne donnent vraiment de bons résultats que dans les mains d'un petit nombre d'équipes très spécialisées.

Au contraire, l'immunofluorescence nous paraît susceptible d'une plus large utilisation, compte tenu surtout de la facilité de préparation et de conservation des antigènes figurés qu'elle utilise. C'est là, sans doute, que réside sa supériorité.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos très vifs remerciements à l'Organisation mondiale de la Santé; au D^r Lambert et au D^r Jarumilinta, des Laboratoires Ciba, de Bâle; au D^r Schneider, des Laboratoires Parke Davis, d'Ann Arbor; au D^r Goldman; au D^r Powell, de Durban; aux nombreux parasitologues étrangers ou français

qui ont bien voulu nous adresser des sérums; enfin au Médecin-Lieutenant-Colonel Defayolle, Chef de la Division de Psychologie, ainsi qu'au Pharmacien-Capitaine Jacq et à M. Chassé, de la Section de Méthodologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, à Lyon.

SUMMARY

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF HUMAN AMOEBIASIS BY THE FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE

The authors have for some years used an indirect fluorescent antibody (FA) technique for the serodiagnosis of human amoebiasis. In the present paper, they review the results achieved, briefly outlining the method and discussing the reproducibility of the technique and its value as a diagnostic tool.

The antigen used is either a smear of *Entamoeba histolytica* derived from *in vitro* cultures or a 5- μ section cut with a freezing microtome from the liver of a hamster previously intrahepatically inoculated. Test sera are not pre-heated, but, on the contrary, maintained in liquid nitrogen until the moment of testing. A commercial

anti-human globulin fluorescent conjugate is used, and readings are made with a Reichart Zetopan fluorescence microscope at $\times 10$ or $\times 20$. Positive reactions show up as an intense yellow-green fluorescence of the amoebae, and negative reactions as a red coloration resulting from the counter-staining with Evan's blue as viewed by ultraviolet light (Fig. 1).

The reproducibility has been assessed (a) by repeated tests on the same sera with the same antigen (these have yielded no significant variation in FA titres), and (b) by comparison of the results obtained with different sera tested against 6 antigenic strains of *E. histolytica* on

smears or 1 strain in sections (these, too, have given closely similar results but with considerably higher titres in the liver-section material).

Specificity tests on over 200 sera show the lowest significant dilution to be 1/50.

To assess the diagnostic value of the technique, it has been tested on 238 sera from known amoebiasis cases, from cases previously treated and considered cured, or from persons with no indications of amoebiasis but who have resided in areas where the disease is endemic. In hepatic amoebiasis, positive reactions were seen in 100% of cases, generally at high titres. In acute intestinal amoebiasis, only 91% of cases gave positive reactions, mostly at low titres. Among persons with non-pathogenic forms, the reaction was generally negative, but some low residual titres were sometimes encountered in cases considered cured.

These tests reflected the differences between amoebiasis in Europeans who had lived but a short time in areas where the disease is endemic and that in Africans and North Africans, in whom the disease was usually of considerably longer duration and who were more frequently re-exposed to infection.

The authors conclude that the greatest value of the technique is in its use for the diagnosis of hepatic amoebiasis and that its greatest advantage lies in the fact that it is easier to carry out than the more commonly used serological methods, which require highly purified antigenic reagents and, in some cases, more sophisticated equipment. The method is also useful for evaluating the treatment of the hepatic form of the disease: there is a very sharp drop in fluorescent antibody from 20 days to 2 months following treatment (Fig. 2).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Coudert, J., Garin, J. P., Ambroise-Thomas, P. & Georget, J. P. (1967) *Bull. Soc. Path. exot.*, **60**, 44-52
- Elsdon-Dew, R. & Maddison, S. E. (1952) *J. trop. Med. Hyg.*, **55**, 208-211
- Georget, J. P. (1967) *Le diagnostic sérologique de l'amiabiose par immuno-fluorescence. A propos de 560 examens*, Lyon (Thèse)
- Goldman, M. (1953) *Amer. J. Hyg.*, **58**, 319-328
- Jeanes, A. J. (1964) *Brit. med. J.*, **2**, 1531
- Jeanes, A. J. (1966) *Brit. med. J.*, **1**, 1464
- Maddison, S. E., Powell, S. J. & Elsdon-Dew, R. (1965a) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **14**, 551-553
- Maddison, S. E., Powell, S. J. & Elsdon-Dew, R. (1965b) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **14**, 554-557
- Powell, S. J., Maddison, S. E., Hodgson, R. G. & Elsdon-Dew, R. (1966) *Lancet*, **1**, 566-567
- Walls, K. W., Goldman, M. & Gogel, M. S. (1961) *Gastroenterology*, **40**, 649-653
- Waugh, A. E. (1952) *Elements of statistical method*, 3rd ed., New York, McGraw-Hill