

## DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASIE HEPATIQUE PAR IMMUNOFLUORESCENCE

par

S. WERY-PASKOFF, R. RENOIRTE, M. WERY et T. BENNIKE

---

**Résumé** — Les anticorps antiambiens sériques ont été dosés par la réaction d'immunofluorescence indirecte chez 151 malades suspects d'abcès hépatique. Sur les 8 cas positifs au 1/100, 5 diagnostics ont été confirmés par l'examen clinique, les examens complémentaires classiques et surtout par l'amélioration de l'état général et des constantes biologiques après une cure de *Métronidazole*. Sur les 12 cas positifs au 1/200, 11 avaient un abcès hépatique confirmé. Le douzième présentait une tumeur colique contenant des amibes. A la dilution 1/400 et plus, tous les cas ont été confirmés. Inversement, dans aucun cas d'abcès hépatique confirmé, la réaction n'a été négative.

Dans quelques cas d'amibiase intestinale, les résultats ont été plus variables. Enfin, comme contrôle de l'activité thérapeutique du *Métronidazole*, cette réaction ne paraît pas très intéressante. Le taux d'anticorps reste stationnaire dans les trois mois suivant le traitement, malgré l'amélioration de l'état clinique et des constantes biologiques du malade. Il faudrait plus de 6 mois pour assister à une baisse importante du taux d'anticorps, au moment où les constantes biologiques sont à peu près normalisées.

D'abord appliquée par Goldman en 1953 à l'étude immunologique de plusieurs souches d'amibes, la réaction d'immunofluorescence fut bientôt utilisée par de nombreux auteurs pour diagnostiquer sérologiquement l'amibiase : Jeanes, 1964, 1966 et 1969; Beltran, Biaggi, Ortega et Rivas, 1965; Coudert *et al.*, 1967 et 1968; Boonpucknavig et Nairn, 1967; Ambroise-Thomas et Kien Truong, 1969.

Nous rapportons ici les résultats de 151 examens effectués en dix-huit mois à Kinshasa, pour des malades suspects d'abcès hépatique.

### 1. Matériel et méthode

#### 1.1. Technique

L'antigène est préparé à partir de cultures d'amibes entretenues à 37 °C sur milieu diphasique de Dobell (HS re) avec addition d'amidon. Le rythme des repiquages est de deux par semaine.

Pour la préparation de l'antigène, la phase liquide de quelques tubes de culture est prélevée le troisième jour après l'ensemencement, après avoir soigneusement décollé les amibes de la surface du sérum coagulé. Afin de récupérer le maximum de parasites, la pente de sérum coagulé est rincée avec 1 ml de la solution de tampon phosphaté à pH 7,2.

La suspension ainsi obtenue contient des amibes, des bactéries et des grains d'amidon. On procède alors à la purification de l'antigène par sédimentation et deux centrifugations successives :

a) La sédimentation en tube conique éliminera les particules grossières. Elle sera éventuellement répétée une deuxième fois.

b) La centrifugation lente (800 tours/minute) et brève (3 minutes) éliminera le reste de l'amidon, les débris de sérum coagulé et les agglutinats divers.

c) Le liquide surnageant est alors récupéré et centrifugé à 1.500 tours/minute pendant 5 minutes. Les amibes se retrouvent dans le culot. Celui-ci sera resuspendu en tampon phosphate (pH 7,2) et recentrifugé dans les mêmes conditions.

Le dernier culot obtenu sera convenablement dilué de manière à obtenir une suspension présentant environ 20 parasites par champ (obj. 10 X, ocul. 10 X). Les amibes doivent présenter un aspect réfringent, non granuleux et être accompagnées d'un minimum de débris.

Trois gouttes de l'antigène ainsi préparé sont déposées sur chaque lame préalablement dégraissée. Le séchage est effectué à 37 °C puis les lames sont entreposées au congélateur à - 20 °C.

Dans ces conditions, les qualités de l'antigène se conservent pendant plusieurs semaines.

Au moment de l'emploi, les antigènes reviennent à la température du laboratoire dans un dessiccateur. Chaque lame sert à l'examen d'un sérum, dont trois dilutions seront initialement utilisées (1/10, 1/100, 1/400). Dans le présent travail, les sérums positifs à 1/100 et négatifs à 1/400 ont été réexaminés ultérieurement jusqu'à 1/200.

Les sérums positifs à 1/400 ont été étudiés à des dilutions plus fortes (de 2 en 2) jusqu'à négativation.

Le temps de contact des dilutions de sérums à examiner est de 30 minutes à la température du laboratoire (20 à 25 °C).

Après un rinçage de 10 minutes dans du tampon à pH 7,2, on place sur les amibes le conjugué fluorescent anti-humain de l'Institut Pasteur de Paris utilisé à la dilution 1/100. Après 30 minutes de contact et nouveau rinçage dans le tampon, une coloration de contraste par le Bleu Trypan dilué au 1/15.000 dans du tampon est effectuée pendant 5 minutes en fin de réaction.

Les lames sont examinées au microscope Zeiss Ultraphot II (filtre d'excitation : BG 12/6 mm, filtre d'arrêt : 47, objectif 16, condensateur à fond noir). En cas de réaction positive, la fluorescence doit être très franche et intéresser la totalité (membrane et cytoplasme) du corps de l'amibe.

## 1.2. Comparaison de différents antigènes

Nous avons testé l'antigénicité de 5 souches locales, isolées à Kinshasa chez des malades en poussée aiguë de dysenterie amibienne. Aucune différence n'a été observée dans les titres en anticorps obtenus suivant la souche employée. Nos résultats rejoignent là les conclusions de la plupart des auteurs : il n'y a pratiquement pas de différences antigéniques entre différentes souches d'*Entamoeba histolytica* pathogènes, cultivables exclusivement à 37° (Coudert, Kien Truong, Ambroise-Thomas et Georget, 1968).

Les différences antigéniques apparaîtraient surtout avec des souches peu pathogènes (dont l'identité avec *E. histolytica* est douteuse), isolées de porteurs non dysentériques et cultivables à 25° comme à 37 °C (Goldman, 1966; Goldman et Cannon, 1967). Des résultats similaires concernant la spécificité antigénique sont obtenus par Krupp (1966) par analyse immunoélectrophorétique de plusieurs souches d'amibes.

Par contre, il nous a semblé que plus l'isolement de la souche est récent, plus la fluorescence obtenue avec des témoins positifs est intense. La brillance des témoins négatifs n'en est pas pour autant augmentée. Il n'y a cependant pratiquement pas de différences dans les titres obtenus avec des souches plus anciennes, mais la réaction est plus aisée à lire.

## 2. Sérums étudiés et résultats

Nous avons fait la réaction sur le sérum des malades chez qui le diagnostic d'abcès hépatique pouvait être évoqué au départ : symptomatologie

hépatique (hépatomégalie, douleur dans l'hypochondre droit, parfois ictère) et dans tout syndrome clinique intéressant la base pleuropulmonaire droite, soit 151 sérums. Chez certains de ces malades (12) une amibiase intestinale était déjà connue.

Voici les résultats obtenus :

Nombre de sérums examinés	Nég. 1/100	Pos. 1/100	Pos. 1/200	Pos. 1/400	Pos. 1/800	Pos. 1/1.600	Pos. 1/3.200
151	109	8	12	13	7	1	1

Pour contrôle de spécificité, nous avons fait la réaction sur des sérums de sujets souffrants de diverses maladies parasitaires (malaria 30, trypanosomiase 30, schistosomiase 25, onchocercose 20), infectieuses (syphilis 15) ou à autoanticorps (Lupus érythémateux 7). Les sérums présentaient tous, étudiés à l'immunofluorescence avec l'antigène correspondant, un taux extrêmement élevé de positivité. Mis en présence de l'antigène amibien, aucun n'était positif à la dilution de 1/100.

### 2.1. Valeur de la réaction dans les formes hépatiques de l'amibiase

Au point de vue clinique, le diagnostic d'abcès amibien est confirmé par l'examen radiologique, la laparoscopie, la ponction exploratrice et surtout l'amélioration de l'état du malade après une cure de *Métronidazole* (à la dose de 25 ou 40 mg par kg de poids et par jour pendant 10 jours).

Parallèlement, il doit y avoir une amélioration rapide des constantes biologiques, en 20 à 30 jours au plus : vitesse de sédimentation et formule leucocytaire, équilibre protéinique et taux de fibrinogène. En se basant sur ces critères, dans tous les cas positifs au 1/400 ou plus (22 cas), le diagnostic d'abcès hépatique a été confirmé. Dans un cas (positif au 1/400), il y avait un abcès pulmonaire associé. Sur les 12 cas positifs au 1/200, 11 ont été également confirmés. A l'autopsie du douzième malade, il y avait une énorme masse colique constituée d'amibes avec infiltration de la muqueuse et de la sous-muqueuse. Mais le foie était macroscopiquement normal et l'examen microscopique ne montrait pas d'amibes (\*). Parmi les 8 sérums positifs à la dilution 1/100, 5 diagnostics ont été confirmés. Pour 2 autres cas, le diagnostic n'a pu être fermement posé : la ponction n'a rien ramené, la réponse à la cure de *Métronidazole* n'a pas été nette. Malgré l'amélioration clinique, la biologie de type inflammatoire a persisté après le traitement. Enfin dans 1 cas, le contrôle biologique n'a pas pu être fait.

Parmi les sérums négatifs à l'immunofluorescence, un diagnostic autre que l'amibiase hépatique a le plus souvent été posé. En particulier tous les cas d'hépatomes (30) se sont révélés absolument négatifs à l'immunofluorescence. Les cas douteux ont subi un traitement d'épreuve au *Métronidazole* sans aucun résultat.

(\*) Nous remercions les Drs J. P. Bastin et P. Ruiz-Avuso du service d'Anatomopathologie des Cliniques Universitaires de Lovanium.

## 2.2. Résultats chez quelques cas d'amibiase intestinale

Notre étude n'a pas été systématique mais a été faite, à l'occasion, sur des malades chez qui l'on pouvait suspecter une localisation hépatique et qui présentaient une amibiase intestinale connue.

Sur les 12 sérums, les résultats étaient les suivants :

	Nég.	Pos. 1/20	Pos. 1/50	Pos. 1/100
Trophozoïtes dans les selles	1	2	1	1
Kystes dans les selles	2	4	1	

Les résultats sont beaucoup trop fragmentaires mais il ne semble pas que cette réaction puisse être d'un grand secours dans le diagnostic des amibiases intestinales. De toute façon, le test perd ici de son intérêt puisque le diagnostic peut être posé par l'examen microscopique des selles.

Remarquons aussi que pour ces quelques malades, on n'a pas pu mettre en évidence de localisation hépatique, même chez celui qui était positif à la dilution 1/100.

Il faut noter chez un des patients dont le sérum était positif au 1/20, outre le diagnostic de dysenterie amibienne, la présence d'un abcès dans le parenchyme hépatique. A l'examen bactériologique du pus ponctionné, l'agent étiologique s'est révélé être un staphylocoque.

## 2.3. Valeur de la réaction d'immunofluorescence comme test de contrôle thérapeutique

Là encore, il ne s'agit pas d'une étude suivie, mais de quelques résultats fragmentaires. Des sujets qui ne souffrent plus ne viennent que très rarement en consultation. Dans quelques cas cependant, nous avons pu faire une, deux ou même trois réactions de contrôle, après le traitement.

Taux initial avant le traitement	Temps écoulé après le traitement					
	8 jours	30 jours	45 jours	2 mois	3 mois	7 mois
		négatif au				
1/100		1/100				
1/100	1/200					
1/200		1/200				
1/200		1/200				
1/200		1/400			1/200	
1/400	1/400					
1/400			1/400			
1/400		1/200				
1/800		1/800		1/800		1/100
1/800		1/400		1/400		

Parmi les malades revus un mois après, les taux étaient stationnaires dans 3 cas et avaient baissé d'une dilution dans 2 cas (un positif au 1/100 s'était négativé à cette dilution).

Deux mois après, dans 2 cas, il n'y avait toujours pas de baisse importante du taux d'anticorps.

Nous avons pu revoir un malade trois mois après le traitement.

Il se portait bien, ses constantes biologiques tendaient vers la normale mais son taux d'anticorps restait stationnaire (1/200).

Enfin, nous avons pu suivre pendant 7 mois un malade présentant un abcès amibien ponctionné sous laparoscopie. Après injection de *Lipiodol*, l'abcès se révéla volumineux (800 ml environ) et ne fut plus reponctionné. La biologie de ce malade était de type nettement inflammatoire : vitesse de sédimentation 84 mm à la première heure, taux de fibrinogène 825 mg p. cent, leucocytose 19.200 avec 73 p. cent de neutrophiles. La réaction d'immunofluorescence de recherche des anticorps anti-amibiens du sérum était positive jusqu'à la dilution 1/800. Il n'y eu pas de variations dans le titre des anticorps anti-amibiens du sérum dosé 1 et 2 mois après le traitement. Les constantes biologiques, bien qu'améliorées, restaient perturbées. Nous avons pu revoir le malade 5 mois plus tard (soit 7 mois après la fin de son traitement). Il se sentait bien. A l'examen radioscopique, on ne voyait plus le *Lipiodol* injecté. Ses constantes biologiques étaient redevenues normales : vitesse de sédimentation 6 mm, taux de fibrinogène 214 mg/p. cent, leucocytose 5.900 avec 26 p. cent de neutrophiles. Le taux des anticorps anti-amibiens était tombé à 1/100.

Il s'agit là de résultats très fragmentaires dont il est difficile de tirer des conclusions. Cependant, les variations d'une dilution en plus ou en moins étant minimales, il ne semble pas y avoir de changements bien nets dans la courbe des anticorps dans les 3 mois suivant le traitement. Il est à noter, d'autre part, que le mode de traitement de l'amibiase s'est modifié. Au lieu de ponctionner les abcès tous les 7 à 10 jours, tant que la ponction précédente avait ramené plus de 100 ou 200 ml de pus, on se contente d'une première ponction évacuatrice et même parfois d'une simple ponction diagnostique avec injection in loco de *Lipiodol* pour visualiser la localisation et les dimensions de l'abcès. Car avec le *Métronidazole* l'amélioration clinique est beaucoup plus rapide. Cependant, il se pourrait que tant que tout le pus n'a pas été résorbé, la biologie reste encore inflammatoire. Or cette résorption prend de 2 à 3 mois pour un abcès de dimension moyenne (300 ml) tandis que cela peut prendre plus de 6 mois pour les gros abcès, ou les abcès multiples (plus de 500 ou même 1.000 ml). Il est possible que le taux des anticorps anti-amibiens ne commence à diminuer que lorsque le pus s'est entièrement résorbé. Ces faits expliqueraient peut-être la divergence de nos résultats avec ceux d'Ambroise-Thomas et Kien Truong (1969) qui ont pu constater après traitement, une chute brutale des anticorps en moins de 2 mois. Jeanes (1969) a aussi constaté une baisse très importante des anticorps chez 3 malades mais revus respectivement au bout de 11, 16 et 20 mois.

### 3. Conclusions

Cette réaction nous paraît être d'un appoint important dans le diagnostic de l'amibiase hépatique.

Suivant les auteurs, elle serait positive dans 93 à 100 p. cent des cas (100 p. cent des cas dans notre étude). Les résultats paraissent plus variables dans l'amibiase intestinale, ce qui en diminuerait la valeur comme technique de diagnostic de masse dans une étude épidémiologique de

l'amibiase intestinale. Mais elle reste une technique précieuse, en clinique, pour des cas individuels.

*Nous remercions le Docteur Audier qui nous a fait parvenir les sérums de la Clinique de la Croix-Rouge Danoise.*

*Nous tenons aussi à remercier Mr J. Weyn du Laboratoire de l'Institut de Médecine Tropicale « Prince Léopold » pour l'entretien des souches d'amibes et Mr A. Kashimba du Laboratoire de Bactériologie pour son aide technique.*

**Samenvatting — Serologische diagnose van leveramibiase door middel van de Immunofluorescentie test.**

In het serum van 151 patiënten, welke verdacht werden te lijden aan een leverabces, veroorzaakt door amiben, werden de antilichamen tegen amiben gedoseerd door middel van de indirecte immunofluorescentietest. Op 8 gevallen welke positief waren bij een serumverdunding van 1/100, werden er bij 5 de diagnose bevestigd door het klinisch onderzoek, aanvullende testen, en vooral door de verbetering van de algemene toestand van de patiënt en het normaal worden van hun biologische constanten, na een behandeling met *Metronidazole*. Bij 12 patiënten welke een positieve test hadden bij een serumverdunding van 1/200, konden er bij 11 leverabces aangetoond worden; de twaalfde leed aan een colontumor, welke amiben bevatte. Bij alle patiënten die positief waren bij een serumverdunding van 1/400 werd een leverabces aangetoond. Nooit was de test negatief bij patiënten bij dewelke een leverabces, veroorzaakt door amiben, werd aangetoond.

De resultaten van de test waren echter zeer uiteenlopend bij de gevallen van darmamibiase. Verder is de immunofluorescentietest van kleine waarde om het resultaat van een behandeling met *Metronidazole* na te gaan. De hoeveelheid antilichamen blijft constant tijdens de eerste drie maanden welke op de behandeling volgen. Dit ondanks de verbetering van de algemene toestand van de patiënten en de verbetering van hun biologische constanten. Men dient 6 maanden te wachten alvorens men een duidelijke daling van de hoeveelheid antilichamen kan waarnemen; deze daling gaat gepaard met het bijna normaal worden van de biologische constanten.

**Summary — Serological diagnosis of hepatic amoebiasis by the use of the indirect fluorescent antibody test.**

Fluorescent antibody titration was performed in the serum of 151 patients with suspected hepatic abscess. Amongst 8 patients with a serum positive at a dilution of 1/100, amoebic liver abscess were found in five by clinical examination, biological analysis and chiefly by a very rapid recovery after treatment with *Metronidazole*. Amongst 12 patients with a serum positive at 1/200, eleven were found to suffer from amoebic liver abscess. The twelfth had a colic tumor containing amoebae. For patients with serum positive at a dilution of 1/400 or more, diagnosis was always confirmed. On the other hand, every patient with confirmed amoebic liver abscess, had a positive test.

A few cases with intestinal amoebiasis were also examined, but the results were less uniform. The fluorescent antibody test does not seem convenient either for control of the efficiency of the treatment with *Metronidazole*. The antibody titer remained unchanged for at least three months after the treatment was completed, in spite of the improvement in health of the patients. The antibody titer would drop only after about 6 months, when the values of other biological tests are back to near normal.

S. Wéry-Paskoff : Département de Bactériologie, Université Lovanium, Directeur : Professeur Gatti.

R. Renoirte : Service de Médecine Interne des Cliniques Universitaires de Lovanium.

M. Wéry : Laboratoire de l'Institut de Médecine Tropicale « Prince Léopold » à Lovanium.

T. Bennike : Service de Médecine Interne. Hôpital d'enseignement de la Croix-Rouge Danoise, Kinshasa.

Reçu pour publication le 30 septembre 1970.

REFERENCES

- Ambroise-Thomas, P., Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Thèse Lyon, 1969.
- Ambroise-Thomas, P. et Kien Truong, T., Le diagnostic sérologique de l'amibiase humaine par la technique des anticorps fluorescents. Bull. Wld Hlth Org., 1969, 40, 103-112.

- Beltran, F., Biagi, F., Ortega, P. S. et Rivas, C., Observaciones sobre la reaccion de inmunofluorescencia y la reaccion de inmunizacion con *Entamoeba histolytica*. Rev. Gastroent. Mex., 1965, **30**, 491-496.
- Boonpucnavic, S. et Nairn, R. C., Serological diagnosis of amoebiasis by immunofluorescence. J. Clin. Path., 1967, **20**, 875-878.
- Coudert, J., Garin, J. P., Ambroise-Thomas, P. et Georget, J. P., Diagnostic sérologique de l'amibiase par immunofluorescence (résultats de 160 examens). Bull. Soc. Path. Exot., 1967, **60**, 44-52.
- Coudert, J., Garin, J. P., Ambroise-Thomas, P., Kien Truong, T. et Georget, J. P., Diagnostic sérologique de l'amibiase par immunofluorescence. La Presse Médicale, 1968, **76**, 1721-1722.
- Coudert, J., Kien Truong, T., Ambroise-Thomas, P. et Georget, J. P., Etude antigénique de 6 souches d'*Entamoeba histolytica* par immunofluorescence indirecte. Résultats comparés, pour une de ces souches des étalements sur lames et des coupes à la congélation. Bull. Soc. Path. Exot., 1968, **61**, 435-444.
- Georget, J. P., Le diagnostic sérologique de l'amibiase par immunofluorescence. A propos de 560 examens. Thèse Médecine Lyon, 1967.
- Goldman, M., Cytochemical differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli* by means of fluorescent antibody. Am. J. Hyg., 1953, **58**, 319-328.
- Goldman, M., Evaluation of a fluorescent antibody test for amoebiasis using two widely differing strains as antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966, **15**, 694-700.
- Goldman, M. et Cannon, L. T., Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. V. Comparison of 15 strains of *Entamoeba* with information on their pathogenicity to guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1967, **16**, 245-254.
- Jeanes, A. J., Immunofluorescent diagnosis of amoebiasis. Brit. Med. J., 1964, **2**, 1531.
- Jeanes, A. J., Indirect fluorescent antibody test in diagnosis of hepatic amoebiasis. Brit. Med. J., 1966, **1**, 1464.
- Jeanes, A. J., Evaluation in clinical practice of the fluorescent amoebic antibody test. J. Clin. Path., 1969, **22**, 427-429.
- Krupp, I. M., Immunoelectrophoretic analysis of several strains of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966, **15**, 849-854.