Ann. Soc. belge Méd. trop.
1974, **54**, 1, 65-71

L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASE. POSSIBILITES D'APPLICATION EPIDEMIOLOGIQUE

par

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

Résumé — Dans cette étude, il est rapporté les résultats obtenus par l'immunofluorescence dans le diagnostic sérologique de l'amibiase intestinale, mais surtout de l'amibiase tissulaire.

En cas de localisation tissulaire, la réaction est plus régulièrement positive (98 p. cent des cas contre 78 p. cent, dans les amibiases intestinales aiguës). Deux critères importants peuvent aider au diagnostic : soit un taux élevé d'anticorps, soit une hausse des anticorps saisie au début de la maladie.

Enfin la technique d'immunofluorescence appliquée sur des prélèvements de sang séché pourrait permettre une étude séro-épidémiologique de l'amibiase.

KEYWORDS : Amebiasis; Serodiagnosis; Fluorescent Antibody Technic; Mass Screening.

Nous rapportons dans cette étude, les résultats obtenus dans le diagnostic sérologique de l'amibiase par immunofluorescence, chez des malades hospitalisés, cliniquement suspects.

En nous appuyant sur les résultats obtenus, nous avons essayé de modifier cette technique pour la rendre applicable à des diagnostics sérologiques de masse.

I. **Etude sérologique des malades cliniquement suspects**

La technique d'immunofluorescence utilisée a été décrite précédemment (Wéry-Paskoff *et al.*, 1971). La positivité commence à être prise en considération à partir de la dilution 1/100 (+ + + et + + + +).

Nous analyserons séparément les résultats obtenus dans les amibiases intestinales et les amibiases tissulaires, la valeur de la méthode ne paraissant pas égale dans l'un ou dans l'autre cas.

1. *Résultats obtenus dans les amibiases intestinales* (tableau 1)

Sur 44 patients présentant une dysenterie amibienne avec présence de trophozoïtes hématophages dans les selles, 28 ont donné une réaction nettement positive, 6 une réaction douteuse (++ à la dilution 1/100) et 10 étaient complètement négatifs (soit 21,3 p. cent).

TABLEAU 1

	Nombre total	Négatifs	1/100++ douteux	1/100+++	1/200+++	≥ 1/400+++
Formes végétatives hématophages dans les selles	44	10	6	15	5	8
Diarrhée sanglante sans visualisation d'amibes	16	9	—	3	2	2
Kystes	17	11	—	2	2	2

Sur 65 malades étiquetés amibiase intestinale aiguë, sans autre précision, 27 étaient négatifs (41,5 p. cent). Ceci montre une fois de plus l'importance de l'examen parasitologique. Inversement, parmi 16 malades présentant une diarrhée sanglante sans mise en évidence d'amibes, 7 étaient franchement positifs sans qu'aucune localisation tissulaire n'ait été signalée.

Enfin sur 17 examens demandés pour présence de kystes d'*E. histolytica* dans les selles, 11 étaient négatifs. Les patients ne présentaient d'ailleurs aucun symptôme clinique d'amibiase. Les 6 autres étaient positifs, soit au 1/100 (2) soit au 1/200 (4). Mais un des positifs au 1/100 et tous les positifs au 1/200 et plus ont été par la suite trouvés porteurs d'un abcès hépatique.

2. *Résultats obtenus dans les amibiases tissulaires (tableau 2)*

Des analyses sérologiques furent demandées chez 1.400 personnes présentant des symptômes pouvant être rattachés à une amibiase tissulaire (abcès hépatique et beaucoup plus rarement pulmonaire).

Schématiquement, les résultats furent les suivants :

— 1.211 personnes furent négatives sérologiquement (pourtant 2 d'entre elles présentaient un abcès hépatique amibien certain).

— 46 présentaient une réaction douteuse à la dilution 1/100. Sur ces 46 malades, 22 furent des abcès hépatiques confirmés (chez 21 d'entre eux, les anticorps atteignirent très rapidement, dans les jours suivants, des taux significatifs).

TABLEAU 2

Taux d'anticorps obtenu à la première analyse	Nombre total	Perdus de vue	Amibiase non confirmée	Abcès hépatique	Abcès pulmonaire
1/100+ +	46	6	18	22 (dont 21 avec hausse)	—
1/100+ + +	38	7	6	25	—
1/200+ + +	49	9	3	37	—
⩾ 1/400+ + +	56	2	1	51	2
	189	24	28	135	2

— 38 sujets furent trouvés positifs à la dilution 1/100 (dont 25 abcès hépatiques confirmés).

— 49 furent positifs à la dilution 1/200 (dont 37 confirmés).

— Enfin, sur les 56 positifs à des taux supérieurs au 1/200, 51 furent des abcès hépatiques et 2 des abcès pulmonaires.

Commentaires

a. Dans les localisations tissulaires de l'amibe, la réaction d'immunofluorescence semble plus régulièrement positive que dans les localisations intestinales. En effet, si l'on considère le patient ayant gardé une réaction douteuse à la dilution 1/100 tout au long de sa maladie comme sérologiquement négatif, nous avons eu, sur les 140 cas d'amibiases tissulaires confirmés cliniquement, 3 cas sérologiquement négatifs (2,1 p. cent).

b. Au point de vue diagnostic, deux critères nous paraissent importants :

— le taux élevé d'anticorps;

— la hausse des anticorps lorsque l'on peut la saisir, tout au début de la maladie.

Le titre des anticorps n'est naturellement pas un critère absolu. Mais dans l'ensemble, une réaction nettement positive à la dilution 1/100 est déjà suspecte lorsqu'elle s'accompagne de signes cliniques. Le taux de 1/200 et *a fortiori* des taux supérieurs deviennent très fortement évocateurs. Le taux d'anticorps n'est certes pas proportionnel à la gravité des symptômes cliniques mais les chances de se tromper diminuent avec l'augmentation du taux des anticorps.

Le deuxième critère qui, lui, nous paraît très sûr est la hausse du taux des anticorps saisie au tout début de la maladie et qui fait passer le malade sérologiquement douteux au positif franchement suspect. Ce qui nous a amené à prendre en considération, chez les malades hospitalisés, ce taux de 1/100 douteux qui en lui-même ne signifie rien mais qui implique, dans notre laboratoire, un contrôle demandé systématiquement.

Dans 21 cas tous confirmés, il y a eu une hausse des anticorps très nette amenant le malade à des fluorescences très franches aux dilutions 1/100 (6) et plus (15).

D'autre part, cette hausse des anticorps paraît très rapide. Pour les échantillons envoyés de 8 jours (5) à 15 jours (5) après la première analyse, nous ne pouvons pas tirer de conclusions. Mais dans les autres cas, nous avons pu obtenir le contrôle en 2 jours (chez 2 malades), en 3 jours (chez 7 malades) et en 5 jours (chez 2 malades).

Enfin, si dans 15 cas cette hausse est survenue après la mise en marche d'un traitement antiamibien donné immédiatement après la première analyse, nous l'avons cependant observée, dans 4 cas, en dehors de tout traitement. La mise en route d'un traitement antiamibien par la suite n'a pas modifié le taux des anticorps chez les 2 malades que nous avons pu suivre.

Donc, cette hausse des anticorps nous paraît un critère sûr (100 p. cent de confirmation) et utile au diagnostic puisqu'elle est relativement rapide.

c. Une fois la maladie diagnostiquée, l'étude de la courbe des anticorps perd un peu de son intérêt. Si l'on considère le cas des malades ayant un taux d'anticorps significatif dès la première analyse, le traitement n'a pratiquement pas modifié ce taux dans les 8 jours suivants (8 cas). Dans 2 cas seulement, la hausse a été importante, de plusieurs dilutions.

Par ailleurs, le titre en anticorps était le même 1 mois après le traitement (dans 11 cas) 2 mois après traitement (dans 6 cas) et trois mois après traitement (dans 2 cas).

Au bout de 6 mois, une baisse très importante des anticorps était notée chez un malade cliniquement guéri. En 1 an, 3 malades étaient pratiquement négativés. Enfin, nous avons revus 2 malades après 15 mois, 1 malade après 3 ans et 2 malades après 6 ans. Tous étaient sérologiquement négatifs. Donc, schématiquement le taux des anticorps resterait stationnaire pendant les trois premiers mois de la maladie, puis commencerait à baisser pour tendre vers zéro au bout d'un an. Dans ces conditions, d'autres critères de guérison, en particulier le retour à la normale des constantes biologiques (syndrome inflammatoire), paraissent plus intéressants.

— L'étude de la courbe des anticorps au décours de la maladie présente cependant un intérêt : toute irrégularité au mouvement de chute très progressif doit laisser présager des complications.

Un, deux et trois mois après leur traitement, 3 malades accusaient une très forte hausse de leurs anticorps. Chez le premier, la ponction de l'abcès hépatique ramenait toujours du pus et chez les deux autres, de gros épanchements pleuraux s'étaient constitués.

Au bout d'un an, un autre patient présentait toujours le même taux d'anticorps élevé (1/400). Son état général était mauvais et sa biologie toujours très inflammatoire.

Enfin, nous avons pu revoir un malade trois ans après sa maladie. Il revenait pour une visite de contrôle systématique. Ses constantes biologiques étaient normales. Seul son taux d'anticorps était franchement

positif à la dilution 1/100. Deux mois plus tard, il était hospitalisé pour abcès hépatique amibien confirmé.

II. Application épidémiologique — Examen de prélèvements de sang séché

Nous avons essayé de mettre au point la recherche (et même le dosage) d'anticorps antiamibiens dans des prélèvements de sang séché prélevé sur papier filtre, comme celle proposée pour la trypanosomiase (Wéry *et al.*, 1970). Puisque pour l'amibiase, ne peuvent être pris en considération que les taux de 1/100 et plus, nous avons, par des dosages de protéines déterminé que cette dilution était approximativement obtenue en éluant un confetti de 0,3 mm de diamètre dans 0,03 ml de tampon à Ph 7,2 (dilution 1/80). Cette manipulation peut être faite directement sur la lame d'antigène en déposant ce confetti au sommet de la goutte calibrée de tampon. Ce procédé permet un examen rapide (screening) d'un grand nombre d'individus.

Pour obtenir des dilutions plus importantes, il est nécessaire de recourir à l'élution en tube d'un confetti de 0,5 mm de diamètre dans 0,3 ml de tampon, ce qui correspond à une dilution de sérum de 1/200.

Pour ces deux examens successifs, il ne faut retenir que les réactions nettement positives.

Résultats

Pour évaluer la valeur de la méthode, nous avons fait systématiquement un prélèvement de sang sur papier filtre à 550 malades du Service de Médecine Interne des Cliniques Universitaires de Kinshasa.

Cela nous permettait d'abord, en cas de positivité, d'étudier la correspondance avec les anticorps sériques provenant d'un échantillon de sérum. Ensuite, cela nous a permis de voir si ces malades, souvent hospitalisés pour des raisons très diverses, présentaient des manifestations pouvant être rattachées à l'amibiase.

Sur 550 malades, 22 présentaient, au cours du screeming, une réaction sur petit confetti nettement positive. Sur ces 22 patients, 14 étaient positifs à la dilution en tube.

Les résultats sérologiques et cliniques sont rapportés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

	Nombre	Perdus de vue	Amibiase non confirmée	Amibiase intestinale	Amibiase hépatique
Résultats globaux	22	4	8	3	7
Réaction sur petit confetti positive (1/80)	8	2	5	1	—
Réaction sur dilution positive (1/200)	14	2	3	2	7

Commentaires

— La réaction faite avec de petits confettis doit surtout servir de screening. Bien sûr, 1 cas sur 8 seulement montrait une manifestation clinique d'amibiase, mais cette méthode très simple a permis de découvrir les 14 patients dont le sérum était positif à la dilution de 1/200.

— La dilution donne des résultats plus intéressants :

— tous les abcès hépatiques hospitalisés à ce moment ont été détectés;

— le pourcentage des confirmés est plus faible que dans l'étude précédente faite sur des sujets cliniquement suspects d'amibiase. Ici, environ 1/5 des patients sérologiquement positifs à des taux importants ne présentent pas de manifestations cliniques pouvant être rattachées à l'amibiase.

Il ne s'agit là que de premiers résultats, très rudimentaires mais cette technique paraît utile pour détecter les anticorps antiamibiens sur une grande échelle.

Conclusion

Actuellement, ce sont surtout les réactions d'hémagglutination et de diffusion en gélose et plus accessoirement d'agglutination de particules de latex sensibilisées, qui semblent être les plus utilisées.

L'immunofluorescence nous paraît pourtant une technique simple, relativement rapide et suffisamment sensible. L'interprétation de ses résultats quantitatifs permet de guider avec plus de sûreté, d'abord le diagnostic de la maladie, puis l'étude de son évolution. Enfin, sa réalisation possible sur des échantillons de sang séché peut la rendre applicable à des études épidémiologiques. Ces résultats confirment dans l'ensemble ceux obtenus par d'autres chercheurs (Neal *et al.*, 1968; Capron *et al.*, 1970 et 1972; Niel *et al.*, 1972; Agarwal *et al.*, 1971).

Summary — **The fluorescent antibody test in the serological diagnosis of amoebiasis. Possible epidemiological application.**

Further results of fluorescent antibody test are reported for the diagnosis of intestinal and hepatic amoebiasis in Kinshasa. 98 per cent of positive reactions are obtained with sera of patients suffering of hepatic localization, while 78 per cent of acute intestinal amoebiasis were found positive. Two important features especially helpfull for the physician are emphasized : the initial very rapid increase of the titer of antibodies and the high titer discovered in a patient suspected of tissue amoebiasis.

The indirect immunofluorescent technique performed on dried blood samples is thought to be valuable for seroepidemiological studies.

Samenvatting — **Immunofluorescentie in de serologische diagnostiek van amoebiasis. De mogelijkheden tot epidemiologische toepassing.**

In deze studie worden de resultaten gegeven die werden bekomen door immunofluorescentie in de serologische diagnostiek van darm- en voornamelijk leveramoebiasis.

In geval van leveramoebiasis is de reactie regelmatiger positief (in 98 ten honderd der gevallen tegen 78 ten honderd der akute darmamoebiases). Twee belangrijke criteria kunnen behulpzaam zijn bij de diagnose : hetzij een hoge titer aan antilichamen, hetzij een plotse verhoging van deze titer bij het beginstadium van de ziekte.

Toepassing van de immunofluorescentie techniek op gedroogde bloedafnamen zou seroepidemiologische studies van amoebiasis mogelijk maken.

S. Wéry-Paskoff : Service de Microbiologie, Université Nationale du Zaïre, Campus de Kinshasa, B. P. 193, Kinshasa XI, République du Zaïre.
R. Renoirte : Service de Médecine Interne des Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa XI, République du Zaïre.
M. Wéry : Unité de Parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers à l'Université Nationale du Zaïre, B. P. 747, Kinshasa XI, République du Zaïre.

Reçu pour publication le 3 octobre 1973.

REFERENCES

Agarwal, S. C., Mahajan, R. C., Datta, D. V. et Chhuttani, P. N. (1971) : Fluorescent antibody test in serodiagnosis of amoebiasis — Indian J. Med. Res. **59**, 1214-1219.

Capron, A., Niel, G. et Bouvry, M. (1970) : Intérêt de l'immunologie dans le diagnostic. et la localisation de l'amibiase. Médecine d'Afrique Noire, **17**, 457.

Capron, A., Vernes, A., Niel, G. et Bouvry, M. (1972) : Le diagnostic immunologique de l'amibiase. Médecine et Chirurgie digestives, **1**, 7-13.

Neal, R. A., Robinson, G. L., Lewis, W. P. et Kessel, J. F. (1968) : Comparison of clinical observations on patients infected with *Entamoeba histolytica* with serological titres of their sera and virulence of their amoebae to rats. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **62**, 69-75.

Niel, G., Gentilini, M., Charmot, G. et Couture, J. (1972) : Le test au latex appliqué au diagnostic sérologique de l'amibiase. Valeur comparée à celle de l'immunofluorescence et de l'immunoélectrophorèse. Bull. Soc. Path. exot. **65**, 382-390.

Wéry, M., Wéry-Paskoff, S. et Van wettere, P. (1970) : The diagnosis of human African Trypanosomiasis (T. gambiense) by the use of the fluorescent antibody test. 1. Standardisation of an easy technique to be used in mass surveys. Ann. Soc. belge Méd. trop. **50**, 613-634.

Wéry-Paskoff, S., Renoirte, R., Wéry, M. et Bennike, T. (1971) : Diagnostic sérologique de l'amibiase hépatique par immunofluorescence. Ann. Soc. belge Méd. trop., **51**, 221-228.