

Diagnostic sérologique par Immuno- fluorescence sur coupes à la congélation d'infections à "Schistosoma mansoni", "S. haematobium" et "S. intercalatum"

Autor(en): **Coudert, J. / Garin, J.P. / Ambroise-Thomas, P.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **25 (1968)**

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-311531>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Diagnostic sérologique par Immuno-fluorescence sur coupes à la congélation d'infections à *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum*

(Résultats portant sur 1.019 examens)

Par J. COUDERT, J. P. GARIN, P. AMBROISE-THOMAS,
M. A. POTHIER et KIEN TRUONG THAI

Diverses techniques ont été proposées pour le diagnostic sérologique de la bilharziose. Pour celles d'entre elles qui présentent des qualités suffisantes de fidélité, il existe d'importants problèmes pratiques :

— L'entretien régulier et relativement intensif d'une souche de *Schistosoma mansoni*.

— Ou bien l'emploi d'un antigène soluble dont la préparation au laboratoire est longue, délicate, de coût élevé.

C'est en fonction de ces difficultés matérielles que nous avons été amené à imaginer une nouvelle réaction d'Immuno-fluorescence dont la valeur a été appréciée, sur plus de mille examens, par rapport aux données de la clinique, de divers examens biologiques, et des autres réactions sérologiques jusqu'ici pratiquées.

L'Immuno-fluorescence avait déjà été appliquée par plusieurs auteurs au diagnostic sérologique de la bilharziose. En fonction du type d'antigène utilisé, ces techniques comprennent des réactions sur miracidiums ou cercaires (E. H. SADUN et R. I. ANDERSON) ou des réactions sur broyats de Schistosome (CAMARGO et coll.).

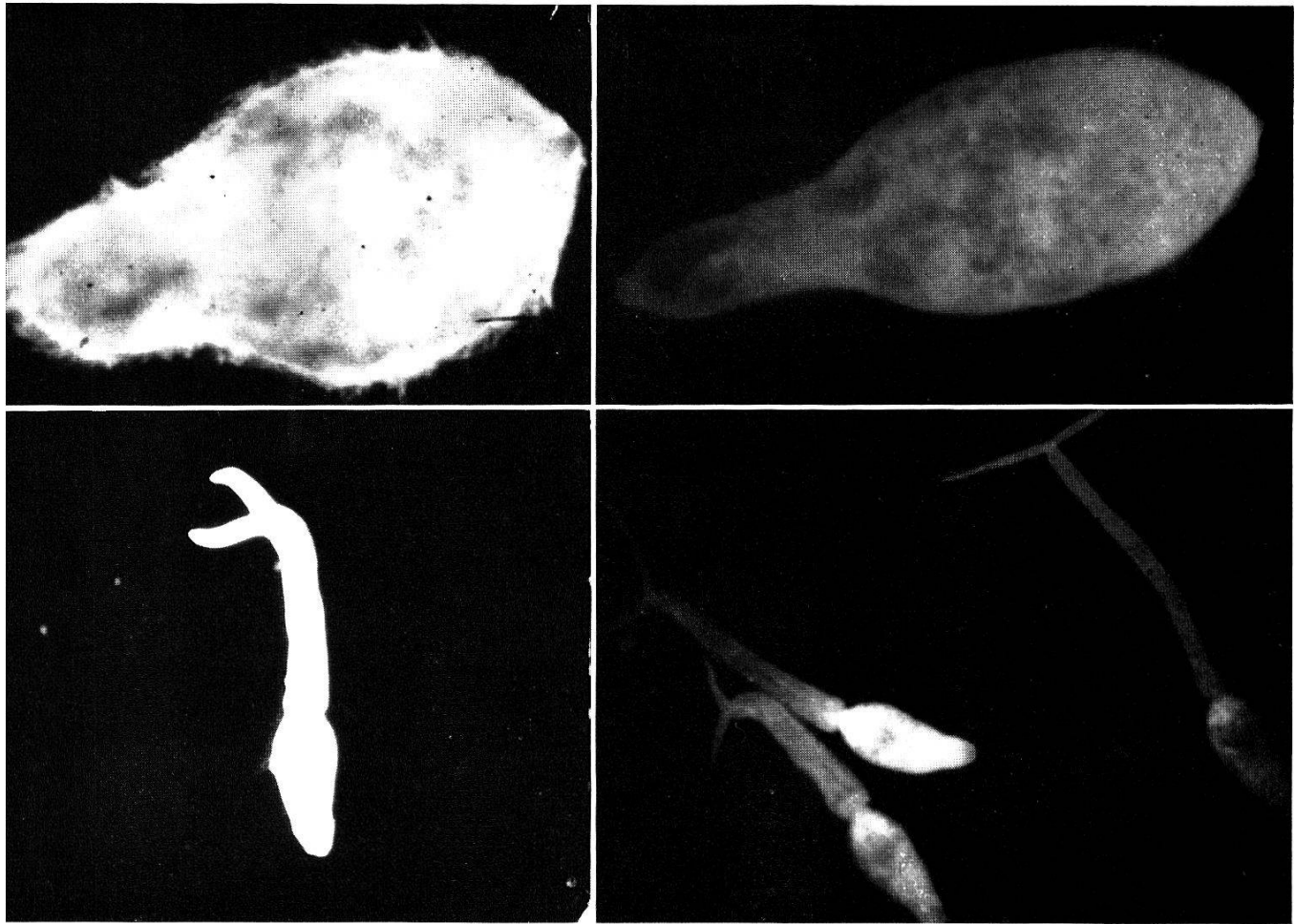
Si elles peuvent être extrêmement démonstratives, ces méthodes sont elles aussi, liées à d'importantes difficultés matérielles. En particulier, la méthode de Sadun et Anderson, de loin la plus utilisée, suppose l'emploi de grandes quantités de formes larvaires. Sa réalisation est relativement longue, ce qui limite le nombre des examens pouvant être pratiqués simultanément.

Il était donc intéressant de mettre au point une méthode, qui tout en conservant la sensibilité et la spécificité élevées de l'Immuno-fluorescence serait plus pratique et moins onéreuse.

C'est ce que nous avons essayé de réaliser dans la technique que nous proposons. Elle a été mise au point à partir de 1.019 sérums prélevés chez 797 malades atteints de bilharziose intestinale ou urinaire.

I. Matériel et méthode

a) — L'antigène est préparé à partir de souris infestées 45 jours auparavant par voie transectanée ou intra-péritonéale, à l'aide de 250 cercaires de *Schistosoma mansoni*. Après avoir sacrifié les animaux, les foies prélevés sont congelés à moins 20° C. Ils peuvent être conservés, sous cette forme, pendant plusieurs mois.



2

4

Fig. 1 et 2. Immuno-fluorescence sur miracidiums de *S. mansoni*. Réaction positive (Fig. 1, Fluorescence jaune verte spécifique) et réaction négative (Fig. 2, coloration rouge due au Bleu d'Evans). Gross. $\times 600$.

Fig. 3 et 4. Immuno-fluorescence sur cercaires de *S. mansoni*. Réactions positive (Fig. 3) et négative (Fig. 4). Gross. $\times 120$.

Au moment de l'utilisation, les foies sont décongelés et les lobes hépatiques séparés les uns des autres. Dans l'un d'eux est découpé un cylindre de 7 à 8 mm de haut, sur 5 à 6 mm de diamètre centré grossièrement sur une branche de la veine porte.

Ce fragment est monté sur le porte-objet d'un appareil de coupe à la congélation (Bright's Cryostat¹) de telle façon que les coupes partent du hile pour aller à l'extrémité distale du fragment. Des coupes de 5 μ d'épaisseur, sont fixées par simple apposition sur des lames de verre de moins d'un millimètre d'épaisseur. Une coupe par lame.

Les coupes adhèrent parfaitement aux lames ; elles n'ont jamais tendance à se décoller, même après les différents bains que suppose la réaction d'Immuno-fluorescence.

Les préparations sont placées au congélateur à moins 20° C et peuvent être conservées pendant 14 mois au moins, sans modification.

Elles sont alors directement utilisables pour la réaction d'Immuno-fluorescence.

¹ F. Masson Optique précision, Bruxelles, Belgique. Appareil acquis grâce à une subvention de l'I.N.S.E.R.M.

En raison de cette conservation, il est intéressant de préparer en une seule fois, un grand nombre de coupes. En pratique, nous effectuons des séries de 600 à 700 coupes. Elles permettent de préparer en une séance, le matériel antigénique nécessaire à plusieurs centaines de réactions.

La seule précaution est de vérifier que toutes les coupes présentent au moins une section transversale de Schistosome adulte. Ce contrôle est rapidement effectué à partir de quelques échantillons, prélevés toutes les 15 ou 20 coupes, et sans coloration, à la loupe binoculaire ou au microscope à très faible grossissement (objectif $\times 10$).

b) *Mode opératoire*

- 1^o Fixer et délipider les lames, en les plongeant 5 minutes dans un bain d'acétone à la température ordinaire, et laisser sécher à l'air.
- 2^o Couvrir chaque coupe d'une ou deux gouttes d'une des dilutions des sérums étudiés (nous étudions nos sérums aux dilutions 1/10, 1/20, 1/40 ... 1/2560). Laisser réagir trente minutes à l'étuve à 37° C en atmosphère humide.
- 3^o Laver les préparations en les plongeant 5 minutes dans deux bains successifs de tampon pH 7,2 ².
- 4^o Sécher les lames devant un ventilateur et recouvrir les préparations d'une à deux gouttes de conjugué fluorescent anti-gamma-globuline humaine (anti-globuline fluorescente de l'Institut Pasteur dilué au 1/20 dans du tampon à pH 7,2).
Laisser réagir à nouveau 30 minutes à 37° C en atmosphère humide.
- 5^o Laver comme précédemment (2 bains successifs de tampon durant 5 minutes).
- 6^o Contre-colorer en plongeant les lames dans une solution de bleu d'Evans ³ dilué au 1/10.000 dans de l'eau distillée.
- 7^o Laver à nouveau dans deux bains différents, puis sécher les préparations devant un ventilateur et recouvrir chaque coupe d'une lamelle montée sur une goutte de glycérine tamponnée ⁴.
- 8^o Examiner au microscope en lumière ultra-violette.
Nous utilisons un appareil Reichert « Zetopan » avec un condensateur à fond clair, à sec, un objectif $\times 10$, et des oculaires $\times 8,5$.
Grâce à de petites œillères de caoutchouc, disposées sur les oculaires, il est possible de travailler dans une pièce normalement éclairée.
La source lumineuse est constituée par une lampe à brûleur à vapeur de mercure (Osram H B O 200) alimentée par un appareil stabilisateur de tension. Filtre d'émission BG 12/3 mm. Filtre d'arrêt G G 9/1 mm et O G 1/1,5 mm.

c) *Lecture des résultats*

La lecture de la réaction est rapide. Les sections d'helminthes se trouvent toujours au même niveau et sont très vite retrouvées d'une préparation à l'autre.

² Formule du tampon à pH 7,2 :

Chlorure de sodium (Na Cl)	8,5 g
Phosphate de sodium disodique (PO ₄ H Na ₂)	2,8 g
Phosphate de sodium monosodique (PO ₄ H ₂ Na)	0,3 g
Eau distillée ou eau permutée	1.000 ml

³ Bleu d'Evans R.A.L.

⁴ Glycérine tamponnée à pH 7,2 :

9 volumes de glycérine + 1 volume de solution tamponnée à pH 7,2.
Laboratoires OSI, 141, rue de Javel, Paris (XV^e) Bacto Fa Mounting Fluid (Difco).

La contre-coloration fournit des images particulièrement démonstratives. Elle permet d'éliminer les réactions douteuses d'interprétation difficile.

En cas de réaction positive, les Schistosomes présentent une vive fluorescence jaune-verte, alors que le tissu hépatique environnant est coloré en rouge par le bleu d'Evans.

En cas de réaction négative, les vers ont la même teinte rouge que le tissu hépatique.

Les sections de Schistosomes mâles et femelles présentent une fluorescence identique. Cela confirme le fait qu'il n'existe pas chez ces helminthes de différences antigéniques, suivant le sexe.

En plus, chez les Schistosomes femelles, les granules vitellins prennent une intense fluorescence jaune non spécifique. Cette auto-fluorescence, que la contre-coloration n'arrive pas à masquer, n'est jamais gênante pour l'interprétation des résultats.

Une auto-fluorescence identique est observée au niveau de la coque des œufs. Cette fluorescence non spécifique n'a évidemment aucune valeur diagnostique. Elle correspond parfaitement à ce qu'avaient noté Sadun et Anderson et à ce que nous avons pu nous-mêmes vérifier avec des œufs entiers de *S. mansoni*.

Par contre, les miracidiums présentent les mêmes colorations spécifiques que les vers adultes : jaune verte si la réaction est positive, rouge si elle est négative. Dans tous les cas, la lecture effectuée au niveau des miracidiums ou sur les coupes de vers adultes, a donné les mêmes résultats. Ceci semble indiquer que la constitution antigénique des miracidiums et des vers adultes est sinon identique, du moins extrêmement proche.

Enfin, il est possible de différer la lecture des résultats. Les préparations se conservent parfaitement pendant 3 ou 4 jours, soit à sec dans l'obscurité, soit montées avec de la glycérine tamponnée, en atmosphère humide.

II. Intérêt de cette technique

1^o Avantages matériels

Cette méthode d'Immuno-fluorescence présente d'importants avantages. Sa rapidité d'exécution permet l'étude de 20 à 30 sérums pris chacun à 5 dilutions, lors d'une même série d'examen.

Surtout, elle permet de réaliser une très importante économie de matériel parasitaire.

En effet, à partir d'un seul foie de souris parasitée, on peut réaliser 2.500 à 3.000 coupes, c'est-à-dire suffisamment de matériel pour étudier 500 à 600 sérums pris chacun à 5 dilutions.

Par rapport aux autres techniques sérologiques de valeur diagnostique comparable (test de Vogel-Minning, réaction de Fixation du Complément, Immuno-électrophorèse, Immuno-fluorescence sur miracidiums et cercaires) cette méthode est de loin la plus économique et la plus pratique sur une grande échelle.

Il faut, en effet, 20.000 vers adultes pour un gramme d'extrait

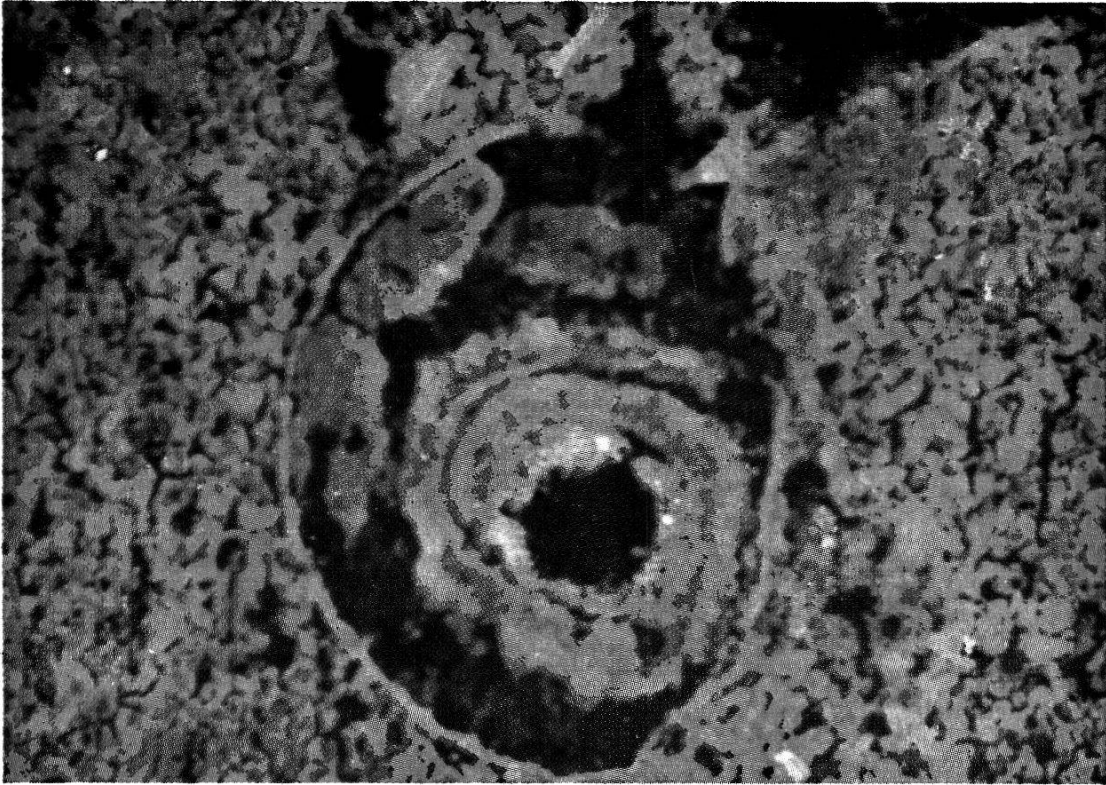


Fig. 6. Immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *S. mansoni* adultes. Réaction négative. Gross. $\times 80$.

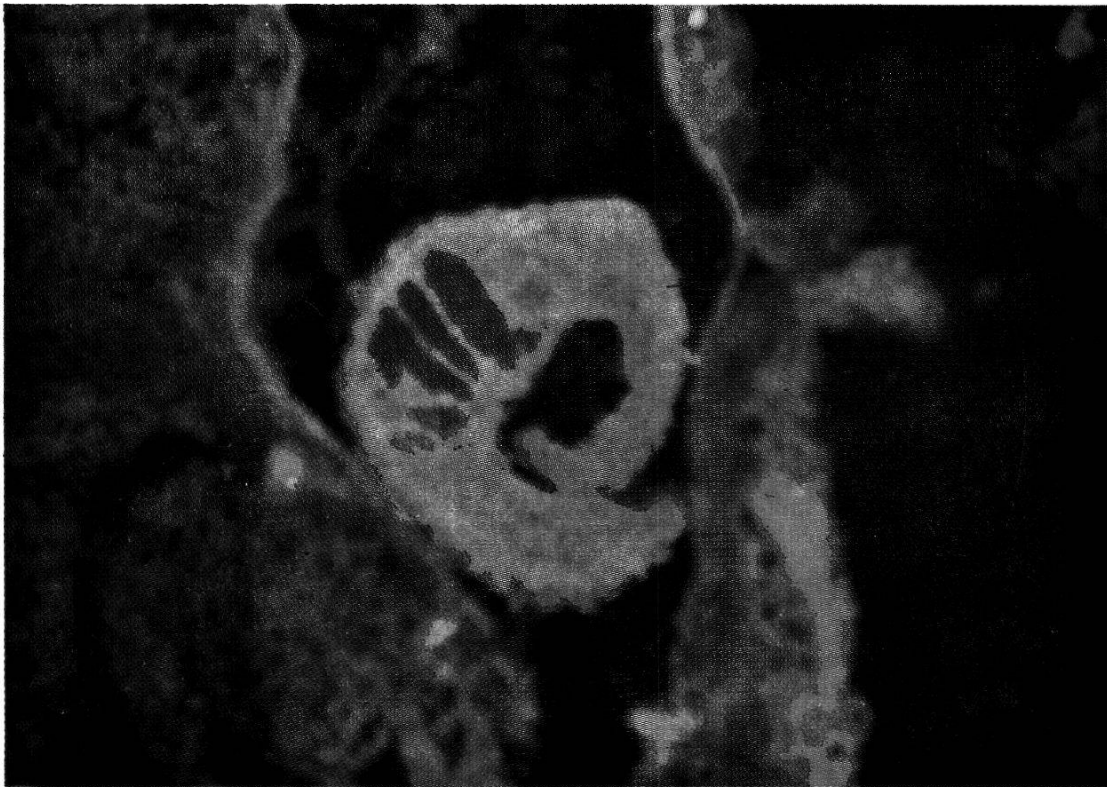
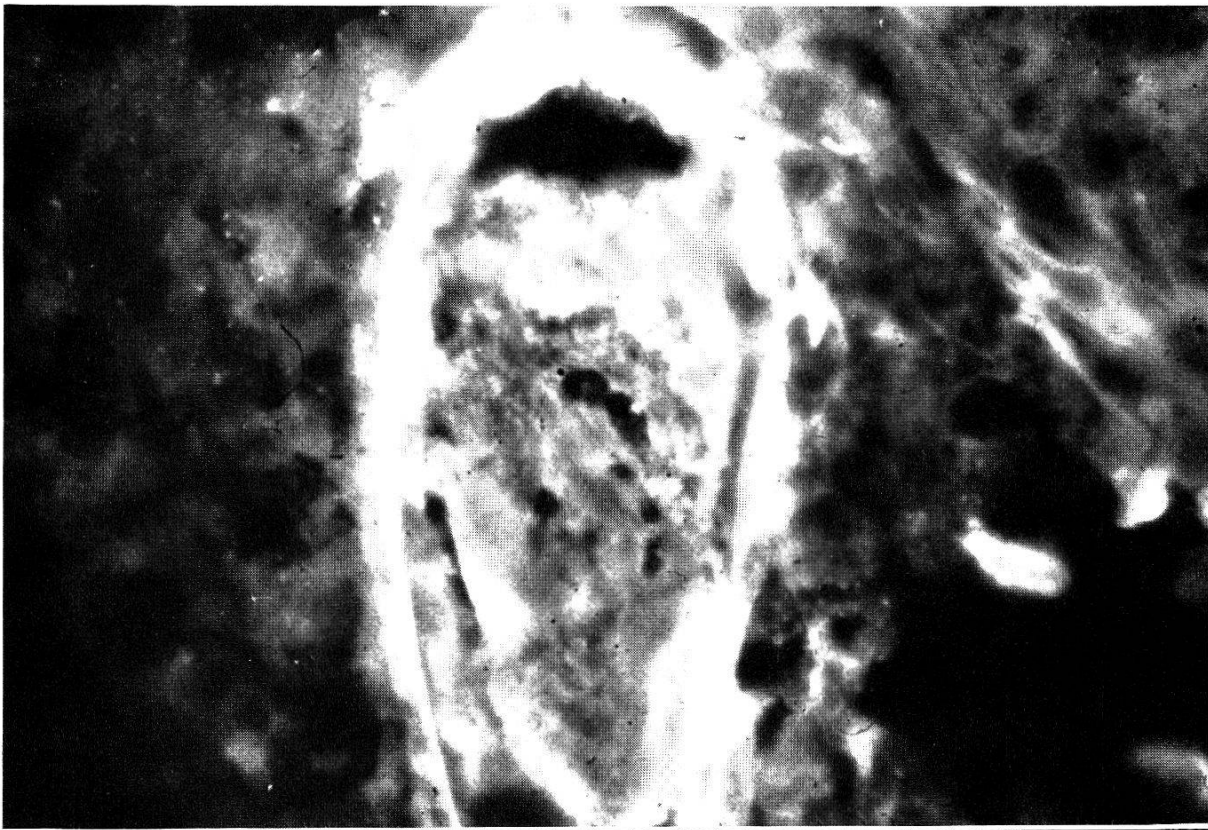


Fig. 5. Immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *S. mansoni* adultes. Réaction positive. Gross. $\times 80$.

7



8

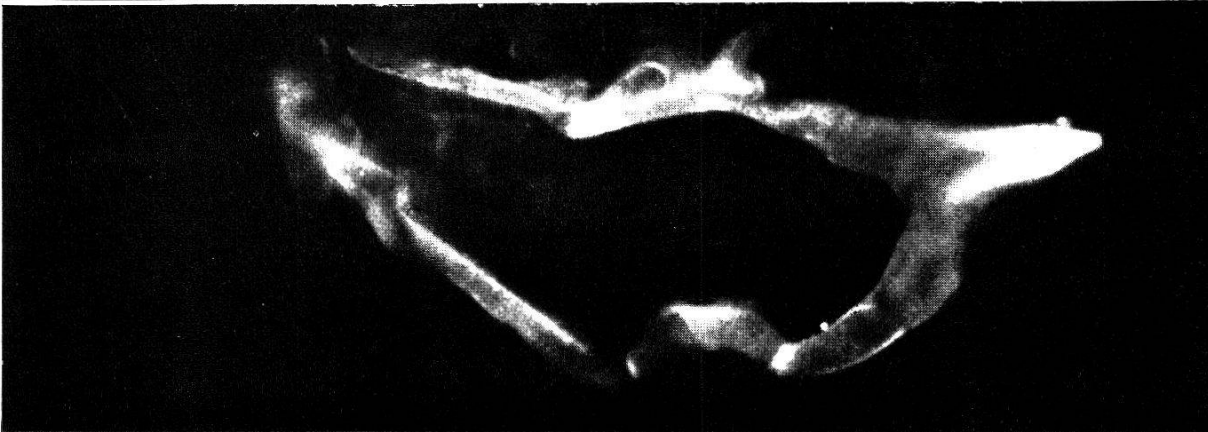


Fig. 7 et 8. Immuno-fluorescence sur coupes d'œufs de *S. mansoni*. Réactions positive (Fig. 7) et négative (Fig. 8). Noter l'importante auto-fluorescence de la coque. Gross. $\times 500$.

sec (réaction de Fixation du Complément et Immuno-électrophorèse), ou bien pouvoir disposer à tout moment de grande quantité de miracidiums et de cercaires (test de Vogel-Minning, Immuno-fluorescence selon Sadun et Anderson).

2° Contrôles

a) Spécificité

Nous avons pu contrôler la spécificité de cette méthode en étudiant au total 222 sérums de sujets non bilharziens. Il s'agit de :

— 204 sérums prélevés chez des malades présentant diverses parasitoses :

helminthiases à vers ronds	40
à vers plats	106
protozooses	53
mycoses	5

— et de 18 sérums prélevés au cours de différentes maladies infectieuses.

Tous ces sérums étudiés par Immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *S. mansoni* ont été négatifs dès la dilution initiale de 1/10.

Cette spécificité est particulièrement remarquable en ce qui concerne des affections comme les Tréponématoses (17 sérums étudiés), la Trichinose (2 sérums étudiés), et surtout le kyste hydatique (36 sérums étudiés), et la Distomatose (62 sérums étudiés). A cet égard, l'Immuno-fluorescence semble donc plus spécifique que les autres techniques, sauf peut-être l'Immuno-électrophorèse qui bénéficie de possibilités analytiques particulièrement fines, mais qui en contre-partie n'offre pas l'avantage de permettre l'étude quantitative des sérums.

b) Reproductibilité

La reproductibilité de cette réaction d'Immuno-fluorescence a été systématiquement vérifiée. Nous n'avons jamais noté de variations qualitatives, ni de variations quantitatives portant sur plus d'un titre de dilution.

c) Sensibilité

En ce qui concerne les sérums de Bilharziens étudiés, 14 d'entre eux étaient encore positifs à la dilution de 1/2560.

Cette sensibilité est très supérieure à celle de la Réaction de Fixation du Complément, du test de Vogel-Minning ou de l'Immuno-électrophorèse, comme nous le vérifierons plus loin. Cette sensibilité élevée permet au test d'Immuno-fluorescence d'être réalisé en microméthode. Nous avons pu pratiquer plusieurs réactions sur du sang prélevé dans des tubes capillaires après piqûres au doigt. Cette technique offre donc les mêmes possibilités que la méthode de Sadun et Anderson, pour les enquêtes épidémiologiques. De minimes échantillons sanguins pourront être prélevés en zone endémique, soit dans des tubes capillaires, soit sur des disques de papier filtre, et expédiés au laboratoire spécialisé.

III. Résultats obtenus dans l'étude de 797 sérums de Bilharziens

Cette réaction d'Immuno-fluorescence a permis d'analyser 797 sérums de malades atteints de Bilharziose à *S. mansoni*, à *S. haematobium* ou à *S. intercalatum*.

Ces sérums ont été prélevés chez des malades examinés et traités à Lyon, ou nous ont été adressés par différents laboratoires⁵.

Nous analyserons les résultats obtenus, en fonction des types de Schistosomes, des diverses catégories étiologiques, de l'ancienneté de l'infestation, et des données cliniques, puis nous essaierons de dégager la valeur diagnostique de cette méthode d'Immuno-fluorescence.

A. Résultats en fonction de l'espèce parasitaire

Il était intéressant de voir si cette technique permettait de différencier sur les seuls résultats sérologiques, les différentes espèces de Schistosomes.

Comme le traitement modifie sensiblement le niveau des anticorps, nous avons fait porter cette étude, uniquement sur des malades non traités, c'est-à-dire 255 observations. Elles nous ont donné les résultats résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU 1

Espèce I. F.	<i>S. mansoni</i> 67 cas	<i>S. mansoni</i> + <i>S. haematobium</i> 8 cas	<i>S. haematobium</i> 173 cas	<i>S. intercalatum</i> 7 cas
Négatif	2	0	6	0
1/10	4	0	19	1
1/20	13	1	30	3
1/40	16	1	41	1
1/80	6	3	37	1
1/160	9	0	29	1
1/320	2	2	9	0
1/640	6	1	1	0
1/1280	7	0	1	0
1/2560	2	0	0	0
Taux Moyens	1/319	1/197	1/85	1/50

⁵ Nous remercions le professeur Ag. J. Lapière et le docteur R. Houin de Paris, les professeurs J. Biguet et A. Capron de Lille, et Mademoiselle le docteur S. Delons de Rabat, pour l'amabilité avec laquelle ils ont bien voulu nous adresser l'essentiel des sérums étudiés au cours de ce travail.

Il existe donc une très importante différence quantitative entre les résultats obtenus, pour chacun des types de Schistosomes :

S. mansoni donne un taux plus de 2 fois supérieur à celui qui est obtenu avec des sérums anti-*S. haematobium*.

Il faut cependant remarquer que cette différence ne porte que sur les taux moyens, alors que la dispersion des résultats enregistrés, ne permet pas de conclure pour chacun d'entre eux.

Cette différence est sans doute à rapporter au moins en partie, à une question de spécificité antigénique. Notre antigène est en effet constitué par des coupes de *S. mansoni*, et il est normal que les sérums homologues soient ceux qui réagissent de la façon la plus intense.

B. Résultats obtenus par rapport aux diverses catégories étiologiques

Pour chaque espèce de Schistosome, nous avons pu analyser nos résultats en fonction de l'âge, du sexe, ou du lieu de contamination des malades examinés.

Cette comparaison a évidemment porté sur des sujets non traités. Elle ne montre pas de différence significative, en fonction de l'âge ou du sexe des malades.

Par contre, en fonction du lieu de contamination nous avons pu vérifier qu'en ce qui concerne *S. haematobium*, l'infestation s'accompagne d'un taux d'anticorps plus élevé en Afrique Noire (et plus particulièrement dans la Vallée du Niari et dans le bassin du Congo) qu'au Maroc.

Il est vraisemblable que les différences qui peuvent être enregistrées en la matière correspondent, au moins en grande partie, à des facteurs ethniques et aux coutumes locales qui modifient profondément les risques de contamination. Pour *S. mansoni*, notre échantillonnage de malade ne nous permet pas encore de conclure formellement.

C. Par rapport à l'ancienneté de l'infestation

Pour apprécier l'évolution sérologique spontanée de malades non traités, et ayant quitté les zones d'endémie bilharzienne depuis un temps plus ou moins long, nous avons effectué 33 examens sérologiques. Ils concernent tous des porteurs de *S. haematobium* (nos résultats sont encore trop fragmentaires pour les autres types de parasites).

On assiste donc à une diminution régulière du taux des anticorps fluorescents en fonction de l'ancienneté de l'infestation.

TABLEAU 2

Temps écoulé depuis l'arrivée en France	0-6 mois	6 mois à 1 an	1 an et plus
Taux moyens	1/174 (11 cas)	1/110 (10 cas)	1/47 (12 cas)

Cette diminution est particulièrement nette après 1 an, et il est difficile à l'heure actuelle d'en préciser la cause. La disparition des vers paraît devoir être exclue, puisque Emile Brumpt a évalué à plus de 15 ans leur longévité dans l'organisme humain. Il est possible que la fabrication des anticorps antivermineux se stabilise, notamment à cause de la sclérose qui envahit progressivement les lésions bilharziennes et finit par isoler plus ou moins complètement les œufs qui ne provoquent plus que des réactions immunologiques très minimes.

D. Résultats obtenus par rapport aux données de la Clinique et des examens para-cliniques

1^o Bilharziose urinaire

a) Données cliniques : hématurie

Le seul élément clinique que nous ayons pu préciser chez les porteurs de *S. haematobium*, est l'existence d'une hématurie. Sur 173 cas de Bilharziose urinaire étudiés avant traitement, 138 malades présentaient une hématurie au moment où la sérologie a été pratiquée.

Ces hématuries s'accompagnent d'une élévation du taux des anticorps fluorescents, puisque à ce moment, le taux moyen est de 1/165 au lieu de 1/85 pour l'ensemble des Bilharzioses urinaires non traitées.

b) Examens parasitologiques des urines

Chez les 293 malades éliminant dans leurs urines des œufs de *S. haematobium*, la réaction d'Immuno-fluorescence a été positive en moyenne à 1/230, ce qui traduit aussi une forte augmentation par rapport au taux observé pour l'ensemble des Bilharzioses urinaires.

Dans le cadre des examens biologiques, nous aurions évidemment voulu faire figurer le taux de l'éosinophilie sanguine. Malheureusement, la quasi-totalité de nos malades était poly-parasitée et présentait souvent d'autres helminthiases (filariose à Loa-loa en

particulier), susceptibles à elles seules de provoquer une éosinophilie. Dans ces conditions, il nous a été impossible de comparer les variations de la formule sanguine, à l'évolution sérologique.

c) Cystoscopie

Il nous a été impossible d'avoir dans chaque cas des précisions sur le type et le stade des lésions observées. Nous n'apportons donc qu'une estimation globale, portant simplement sur l'existence ou l'absence de lésions visibles à la cystoscopie.

Cet examen a été pratiqué chez 37 malades, qui tous, présentaient des lésions cystoscopiques. Le taux moyen en anticorps fluorescents a été de 1/155, soit environ, 2 fois le taux moyen général.

Ce taux observé chez les porteurs de lésions cystoscopiques est donc pratiquement identique au taux moyen des sujets présentant des hématuries.

d) Urographie intra-veineuse (U.I.V.)

L'existence de lésions visibles radiologiquement, traduit non seulement, l'ancienneté de l'infestation, mais surtout l'intensité et la fréquence des recontaminations.

L'Immuno-fluorescence rend assez bien compte de ceci, les titres moyens étant de 1/49, chez les malades ayant une U.I.V. normale, et de 1/77 chez ceux qui présentaient des lésions radiologiques de l'arbre urinaire. Pourtant la différence est moins grande que lorsque hématurie ou œufs sont présents.

2° Bilharziose intestinale à *S. mansoni*

Pour ce type de malades, nous n'avons pas pu retrouver de façon certaine, des éléments cliniques qui puissent être rattachés à la seule Bilharziose intestinale.

a) Examens parasitologiques des selles

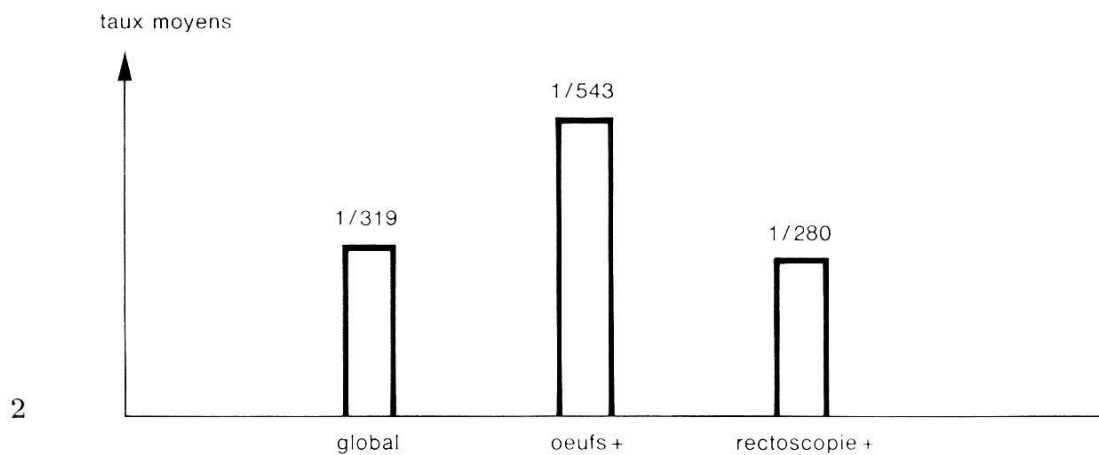
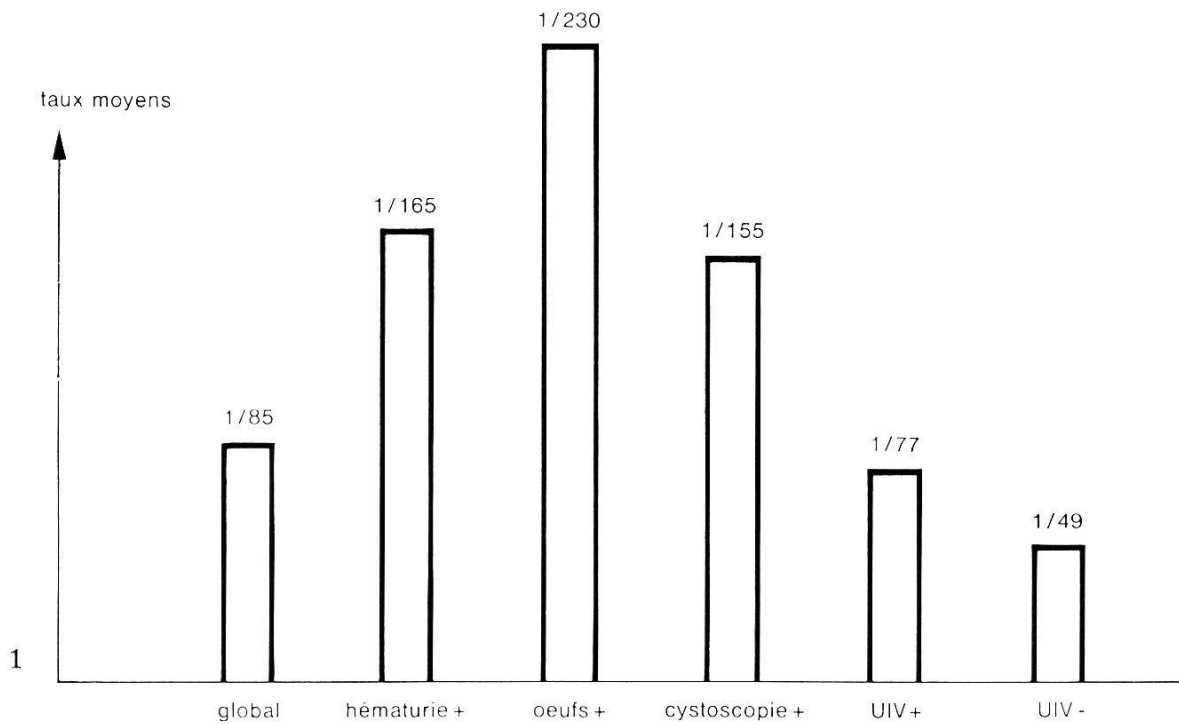
Dans 51 cas, des œufs de *S. mansoni* ont été retrouvés à l'examen coprologique. Au même moment, le taux moyen des anticorps fluorescents, était de 1/543, ce qui est très supérieur au taux moyen global observé pour les Bilharzioses intestinales (1/319). Comme pour les Bilharzioses à *S. haematobium*, l'élimination d'œufs est le signe le plus indiscutable d'évolutivité. Elle s'accompagne donc d'une élévation du titre des anticorps.

b) Rectoscopie

Pour 11 malades présentant des lésions rectoscopiques bilharziennes, le taux moyen est de 1/280, ce qui est sensiblement comparable, et même légèrement inférieur au taux moyen général. Il est vrai cependant que ce taux global a été calculé à partir de malades qui, dans la très grande majorité des cas, n'ont pas subi de rectoscopie, mais présentaient peut-être des lésions, si bien qu'il est difficile de conclure de façon formelle.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans les 2 histogrammes suivants :

TABLEAU 3



Comparaison des résultats de l'Immuno-fluorescence aux données de la clinique et des examens para-cliniques

1 : Bilharzioses urinaires

2 : Bilharzioses intestinales

TABLEAU 4

S. mansoni

I.F.	V.M.	Négatif	+	++	+++	Total
Négatif		1				1
1/10		1				1
1/20			1			1
1/40				2		2
1/80			3		1	4
1/160		1	1	1		3
Total		3	5	3	1	12

TABLEAU 5

S. haematobium

I.F.	V.M.	Négatif	+	++	+++	++++	Total
Négatif		1					1
1/10		1		1			2
1/20				4			4
1/40							0
1/80			2	4			6
1/160			1	5		1	7
1/320				1			1
1/640					1		1
Total		2	3	15	1	1	22

TABLEAU 6

S. intercalatum

I.F.	V.M.	Négatif	+	++	+++	Total
Négatif						0
1/10		1				1
1/20		2	1			3
1/40						0
1/80		1				1
1/160					1	1
Total		4	1	0	1	6

Il apparaît donc un parallélisme entre l'évolutivité de la maladie signée par les découvertes parasitologiques, cystoscopiques, radiologiques et le taux élevé d'anticorps fluorescents.

E. Comparaison de l'Immuno-fluorescence (I.F.) au test de Vogel-Minning (V.M.), à la réaction de Fixation du Complément (F.C.) et à l'Immuno-électrophorèse (I.E.)

Bien qu'il soit toujours difficile de comparer entre elles les techniques sérologiques, nous avons pu apprécier la valeur de notre méthode, par rapport à celles des trois réactions les plus utilisées jusqu'ici : test de Vogel-Minning, réaction de Fixation du Complément, et Immuno-électrophorèse⁶ à partir de 224 sérums bilharziens.

1° Comparaison de l'Immuno-fluorescence et du test de Vogel-Minning

La comparaison de ces réactions sur le plan quantitatif est évidemment impossible puisque le test de Vogel-Minning n'est pas réalisé avec des sérums dilués.

Nous n'avons donc pu apprécier l'intensité des résultats que par un nombre variable de croix. Les résultats sont consignés dans les tableaux 4, 5, 6.

Sur le plan qualitatif, les deux réactions concordent dans 84 % des cas de Bilharzioses à *S. mansoni*, dans 95,5 % des Bilharzioses urinaires, et dans 33 % des Bilharzioses à *S. intercalatum*.

Les discordances correspondent dans tous les cas à des erreurs par défaut du test de Vogel-Minning. L'Immuno-fluorescence n'a jamais été négative, alors que le test de Vogel-Minning révélait la présence d'anticorps.

Le tableau suivant reprend globalement l'ensemble de ces résultats.

A partir de ces 40 résultats l'Immuno-fluorescence paraît donc avoir une valeur diagnostique et une sensibilité supérieures à celles du test de Vogel-Minning puisqu'elle ne donne que deux réactions négatives (5 %), alors que la réaction de Vogel-Minning est négative dans 7 cas (17 %) chez des Bilharziens confirmés.

⁶ Les tests de Vogel-Minning ont été réalisés par le laboratoire de Parasitologie du Professeur L. Ch. Brumpt, les réactions de Fixation du Complément par le laboratoire de Parasitologie du Professeur J. Coudert et les réactions d'Immuno-fluorescence par le laboratoire du Professeur J. Biguet.

TABLEAU 7

		<i>S. mansoni</i> (12 cas)	<i>S. haematobium</i> (22 cas)	<i>S. intercalatum</i> (6 cas)	Totaux (40 cas)
I.F.	+	9	20	2	} 33 (82,5%) de résultats concordants
V.M.	+				
I.F.	—	1	1	0	
V.M.	—				
I.F.	+	2	1	4	} 7 (17,5%) de discordants (I.F. + V.M. —)
V.M.	—				
I.F.	—	0	0	0	
V.M.	+				

2° Comparaison Immuno-fluorescence et réaction de Fixation du Complément

Pour 95 malades, une réaction d'Immuno-fluorescence et une réaction de Fixation du Complément ont été effectuées parallèlement. Les résultats obtenus ont été groupés dans les tableaux suivants :

TABLEAU 8

S. mansoni

I. F.	F. C.	Négatif	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Total
Négatif		1									1
1/10											0
1/20			1			2	1				4
1/40				2	1	1					4
1/80		2				1		2			5
1/160				1	2		3	1		1	8
1/320					1		1				2
1/640							1				1
1/1280				1							1
1/2560				1			1	3			5
Total		3	1	5	4	4	7	6	0	1	31

TABLEAU 9

S. haematobium

F. C. I. F.	Négatif	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Total
Négatif	5							5
1/10	1	1	2	1				5
1/20	1	2	5		3		2	13
1/40		1		5	2	1	4	13
1/80	1		1	3	3	2		10
1/160	1	1		2	2	1	2	9
1/320						1		1
1/640								0
1/1280							1	1
Total	9	5	8	11	10	5	9	57

Pour chaque type de Bilharziose, les taux moyens obtenus par chacune de ces méthodes sont :

TABLEAU 10

	<i>S. mansoni</i> (31 cas)	<i>S. haematobium</i> (57 cas)	<i>S. intercalatum</i> (7 cas)	Résultats globaux (95 cas)
I.F.	1/557	1/81	1/50	1/245
F.C.	1/31	1/18	0	1/22

Ce qui correspond dans l'ensemble à une sensibilité de l'Immuno-fluorescence, 10 fois supérieure à celle de la Fixation du Complément, avec toutefois pour la première de ces deux méthodes, une dilution initiale significative de 1/10.

Du point de vue de la valeur diagnostique, l'Immuno-fluorescence confirme également sa supériorité sur la réaction de Fixation du Complément.

En effet, pour ces 90 cas de Bilharzioses confirmées elle n'a été en aucun cas négative, quand la réaction de Fixation du Complément était positive.

Au contraire, l'inverse s'est produit dans 9 % des cas, si bien qu'en définitive, l'Immuno-fluorescence est en moyenne positive

chez 93,3 % des malades, tandis que la réaction de Fixation du Complément ne l'est que chez 84 % des sujets examinés.

En fait, cette différence apparaîtrait sans doute plus nettement s'il avait été possible de mettre systématiquement en œuvre ces deux méthodes sur des sérums de Bilharziens pris au hasard, alors que nos conditions de travail nous ont amené le plus souvent à ne tester en Immuno-fluorescence que des sérums déjà trouvés positifs en réaction de Fixation du Complément.

3° Comparaison Immuno-fluorescence et Immuno-électrophorèse

89 sérums ont été étudiés par ces deux techniques.

Pour l'Immuno-électrophorèse, les critères de positivité ont été la présence de l'arc spécifique (arc 4) et également le nombre total d'arcs observés.

Cette dernière notion permet d'apprécier avec une certaine approximation, l'intensité de la réaction, bien que l'Immuno-électrophorèse ne soit pas une méthode quantitative puisqu'elle ne permet pas l'analyse des sérums à différentes dilutions, et qu'au contraire il est même nécessaire de concentrer au $\frac{1}{3}$ les sérums.

Les résultats ont été les suivants :

TABLEAU 11

S. mansoni

I. E. I. F.	Négatif	1 arc	2 arcs	3 arcs	4 arcs	5 arcs	Total
Négatif							0
1/10							0
1/20							0
1/40							0
1/80		2					2
1/160			1		1	1	3
1/320				1			1
1/640							0
1/1280							0
1/2560					1		1
Total	0	2	1	1	2	1	7

TABLEAU 12
S. haematobium

I. E. I. F.	Négatif	1 arc	2 arcs	3 arcs	4 arcs	5 arcs	6 arcs	Total
Négatif	1							1
1/10								0
1/20	1				1			2
1/40			2	1				3
1/80			5	3				8
1/160		1	15	6	5	1	1	29
1/320			9	5	2			16
1/640			5	2	3	3		13
1/1280			2	2				4
1/2560			1	2				3
Total	2	1	39	21	11	4	1	79

TABLEAU 13
S. intercalatum

I. E. I. F.	Négatif	1 arc	2 arcs	Total
Négatif				0
1/10				0
1/20	1			1
1/40			1	1
1/80			1	1
Total	1	0	2	3

Sur le plan quantitatif, bien que la comparaison ne soit pas possible, on voit qu'il existe tout de même un certain parallélisme entre les données de l'Immuno-fluorescence et l'intensité de l'Immuno-électrophorèse, telle que le nombre d'arcs permet de l'apprécier.

Du point de vue de la valeur diagnostique, l'Immuno-fluorescence paraît légèrement supérieure à l'Immuno-électrophorèse qui

donne 2,3 % de résultats faussement négatifs, alors que l'Immuno-fluorescence n'a été négative que dans un cas (1,5%). Mais il nous faut, là encore, souligner que notre comparaison ne porte pas sur le tout-venant des sérums bilharziens, mais sur un lot relativement privilégié, puisque la presque totalité des 89 sérums considérés nous ont été adressés par le Prof. A. Capron après qu'ils aient été trouvés positifs par l'Immuno-électrophorèse.

4° Comparaison des 4 réactions : Immuno-fluorescence, test de Vogel-Minning, réaction de Fixation du Complément, et Immuno-électrophorèse

Pour 7 sérums, ces 4 réactions ont été pratiquées parallèlement.

Ce qui confirme la valeur de la réaction d'Immuno-fluorescence qui est constamment positive, alors que les autres réactions donnent des résultats faussement négatifs : dans trois cas pour le test de Vogel-Minning, dans deux cas pour l'Immuno-électrophorèse, et que la réaction de Fixation du Complément est, avec les antigènes utilisés, constamment négative.

TABLEAU 14

		I. F.	V. M.	F. C.	I. E.
<i>S. mansoni</i>	sérum n° 449	1/80	±	—	1 arc
	sérum n° 517	1/80	—	—	1 arc
<i>S. haematobium</i>	sérum n° 461	1/20	++	—	—
	sérum n° 460	1/80	++	—	3 arcs
	sérum n° 462	1/160	++++	—	1 arc
<i>S. intercalatum</i>	sérum n° 291	1/20	—	—	— 1 arc après trait.
	sérum n° 293	1/80	—	—	2 arcs

IV. Valeur diagnostique de la réaction d'Immuno-fluorescence

En ce qui concerne la valeur diagnostique de la réaction d'Immuno-fluorescence, il n'y a pas d'erreurs par excès. En effet, aucune réaction faussement positive n'a été enregistrée pour d'autres affections parasitaires et pour 200 sérums normaux.

En ce qui concerne les erreurs par défaut, nous avons enregistré :

— pour *S. mansoni* : 2 cas négatifs sur 67 examens avant traitement (2,9 %) ;

— pour les Bilharzioses mixtes non traitées à *S. mansoni* et à *S. haematobium*, tous les examens (8) ont été positifs ;

— pour *S. haematobium*, six résultats négatifs sur 173 réactions pratiquées (3,5 %) ;

— pour *S. intercalatum*, les 7 examens effectués ont été positifs.

Dans l'ensemble, nous n'avons donc observé que 8 réactions négatives sur 255 sérums de Bilharziens certains, analysés avant traitement, ce qui représente un taux de positivité de 96,8 %.

Ce résultat est supérieur à ceux obtenus avec les autres méthodes sérologiques : le test de Vogel-Minning étant positif dans 70 à 80 % des cas, la réaction de Fixation du Complément dans 91,9 % (Professeur R. Pautrizel), l'Immuno-électrophorèse dans 60 à 80 %, l'Immuno-fluorescence selon Sadun et Anderson dans 92 %, et suivant la réaction de Camargo et coll. sur broyats de Schistosomes, dans 95,6 % des cas (sur 68 examens pratiqués).

Par rapport au stade évolutif de l'affection, nos résultats semblent indiquer que l'Immuno-fluorescence donne des indications tout à fait parallèles à celles de la Clinique et des divers examens para-cliniques, radiologiques et biologiques.

V. Intérêt de cette réaction comme moyen de contrôle de l'efficacité thérapeutique

Nous avons pu suivre l'évolution sérologique de 69 malades soumis à un traitement par le Nitrothiamidazole (32.644-Ba ou Ambilhar).

Il s'agissait de deux cas d'infestation mixtes associant *S. mansoni* et *S. haematobium*, de 53 cas de Bilharzioses urinaires et de 14 Bilharzioses à *S. mansoni*.

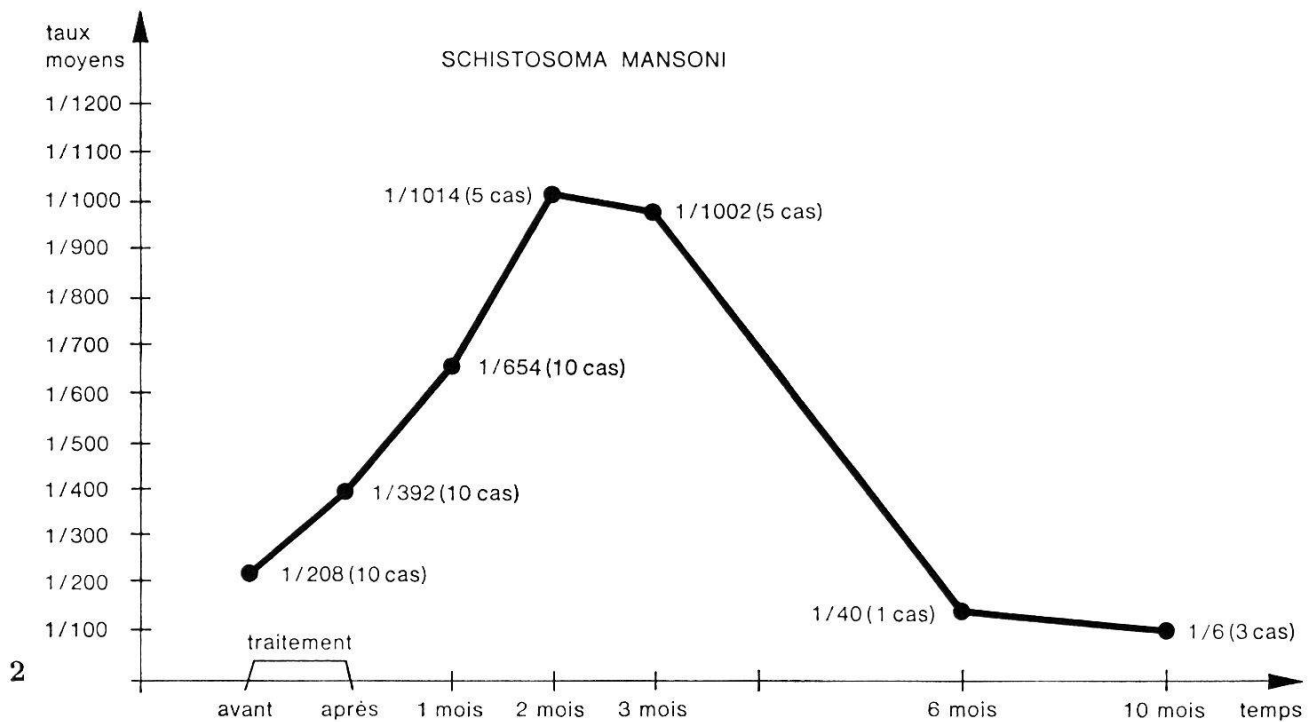
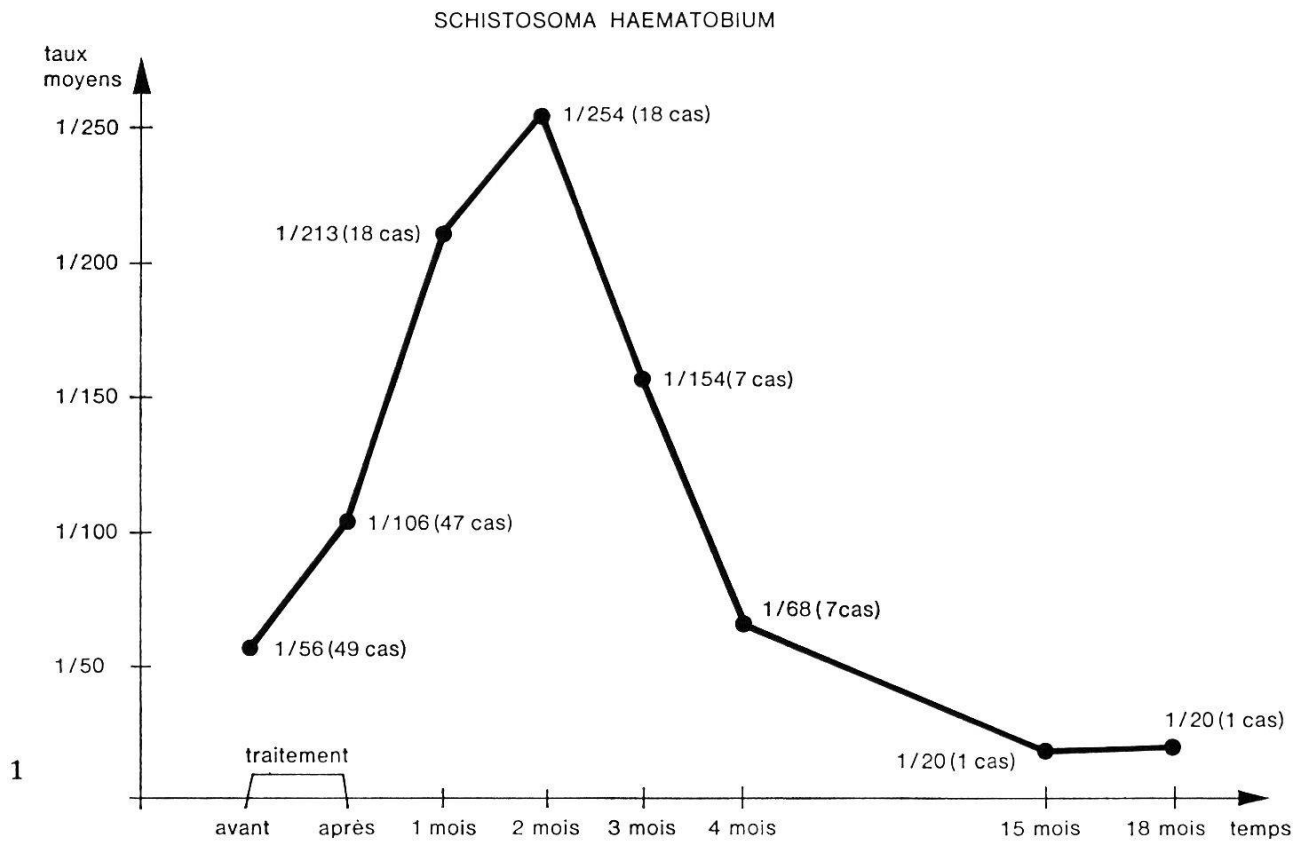


TABLEAU 15

Evolution du taux des anticorps fluorescents chez des Bilharziens traités

1 : Bilharzioses à *S. haematobium*

2 : Bilharzioses à *S. mansoni*

Pour ces malades, 3 à 6 examens sérologiques ont été effectués à des dates variables, et bien que le même nombre d'examens n'ait pu être effectué à chacun des intervalles de temps considéré, ces résultats permettent une première appréciation de l'évolution sérologique des malades traités.

Pour les deux cas de Bilharzioses mixtes, les taux moyens sont de 1/200 avant traitement et de 1/960 un mois après la fin du traitement (6 prélèvements au total).

Pour les autres types de Bilharzioses, l'évolution est résumée dans les graphiques suivants où nous avons indiqué les taux moyens obtenus ainsi que le nombre d'examens à partir desquels ils ont été calculés.

Dans tous les cas le traitement entraîne une forte élévation du taux des anticorps qui atteignent un niveau maximum entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois. Passé ce délai, la sérologie diminue d'intensité, et n'est qu'à peine positive au delà du 6^{ème} mois.

L'ensemble de ces résultats est assez superposable à ce que d'autres auteurs ont pu observer par la technique d'Immuno-électrophorèse (J. Biguet et A. Capron à Lille ; A. Dodin à Tananarive).

Il semble que l'augmentation transitoire du taux des anticorps corresponde à la lyse des parasites, ce qui entraîne une libération importante d'antigènes bilharziens et secondairement une forte réponse immunologique.

Les anticorps mis en évidence durant cette période par Immuno-électrophorèse ou par Immuno-fluorescence paraissent correspondre, selon A. Dodin, à un certain degré d'immunité puisque les sujets vivant en zone d'endémie sont réfractaires aux réinfestations entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois qui suivent le traitement.

Sur le plan pratique, l'étude sérologique permet donc d'apprécier facilement l'activité d'une thérapeutique qui se traduit précisément par une augmentation du taux des anticorps.

La guérison ne pourra être considérée comme acquise que si, avec un recul suffisant, on assiste à une très importante diminution du taux des anticorps par rapport au taux obtenu avant la mise en œuvre du traitement.

Dans l'état actuel de notre expérience, cette diminution est en moyenne de 25 à 1 pour les Bilharzioses à *S. mansoni* où la sérologie est positive à 1/6 dix mois après.

Pour les Bilharzioses urinaires, il est plus difficile de conclure, puisque chez des malades apparemment guéris, la sérologie est positive à 1/20, 15 mois après le traitement, au lieu de 1/56 avant celui-ci. Cette diminution est assez comparable à celle qui se produit spontanément dans les Bilharzioses anciennes où à deux ans

de distance, nous avons noté, chez un même groupe de malades, une réaction qui passait de 1/174 à 1/47.

Conclusions

Pour le diagnostic biologique de la Bilharziose, les réactions sérologiques, bien que n'apportant qu'une preuve indirecte, ont une valeur aussi grande que la recherche des œufs dans les selles ou dans les urines. Ces examens parasitologiques risquent en effet d'être négatifs chez des bilharziens certains, du fait de la ponte discontinue des vers, ou de la sclérose qui chez l'individu parasité, gêne l'élimination des œufs. Jusqu'ici la sérologie bilharzienne se heurtait à des grosses difficultés pratiques, liées essentiellement au problème de la préparation de l'antigène.

La réaction d'Immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *S. mansoni* présente d'importants avantages pratiques du fait de sa facilité et de sa rapidité d'exécution, et surtout de l'économie considérable de matériel parasitaire. Améliorée par la contre-coloration par le bleu d'Evans, cette technique donne des résultats facilement interprétables.

Comme nous avons pu le vérifier à partir de 1.019 examens correspondant à 797 malades atteints de Bilharziose, cette méthode est sensible et spécifique.

Sa valeur diagnostique paraît élevée puisqu'elle est positive, dans plus de 96% des cas, ce qui la place au rang des meilleures réactions sérologiques.

La confrontation de ces résultats avec les données de la clinique ou des divers examens para-cliniques et biologiques établit sa valeur diagnostique, de même que son intérêt comme moyen d'appréciation de l'efficacité d'un traitement, ou même comme test de guérison.

Enfin, cette méthode, par sa rapidité d'exécution et son économie d'antigène, rend possible son application à de vastes enquêtes épidémiologiques.

Bibliographie

- POTHIER, M. A. (1967). Le séro-diagnostic de la bilharziose par une nouvelle technique d'immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *Schistosoma mansoni*. Résultats de 773 examens. — Paris: Thèse Médecine
Thérapeutique nouvelle de la Bilharziose et de l'Amibiase. (1966). Symposium de Lisbonne, juin 1965. 314 pp. ill. — Bâle: Verlag für Recht und Gesellschaft AG = Acta Tropica Suppl. 9

Zusammenfassung

Für die Diagnose von Bilharziose haben die serologischen Reaktionen, obwohl sie nur einen indirekten Beweis liefern, einen ebenso großen Wert wie das Suchen nach Eiern im Stuhl oder im Urin. Die parasitologischen Untersuchungen können nämlich auch bei sicheren Fällen von Bilharziose negativ sein. Dies ist bedingt durch das diskontinuierliche Eierlegen des Parasiten oder durch eine Sklerose beim parasitierten Individuum, welche die Ausscheidung von Eiern behindert. Bis jetzt standen den serologischen Untersuchungen der Bilharziose große praktische Schwierigkeiten im Wege, vor allem da die Herstellung des Antigens ein schwer lösbares Problem war.

Die Immuno-Fluoreszenz-Reaktion auf Kryostatschnitten von *S. mansoni* bietet erhebliche praktische Vorteile, indem sie sehr leicht und rasch durchgeführt werden kann und vor allem auch eine beträchtliche Einsparung von Parasitenmaterial mit sich bringt. Durch eine Gegenfärbung mit Evans-Blau kann diese Technik noch verbessert werden, so daß man Resultate erhält, die leicht zu interpretieren sind.

Mit 1019 Untersuchungen von 797 an Bilharziose Erkrankten konnte bestätigt werden, daß diese Methode empfindlich und spezifisch ist. Ihr diagnostischer Wert scheint hoch zu sein, waren doch die Resultate in etwas mehr als 96% positiv, was diese Methode in den Rang der besten serologischen Reaktionen stellt.

Der Vergleich dieser Resultate mit den klinischen Befunden und mit verschiedenen para-klinischen und biologischen Untersuchungen bestätigt nicht nur den diagnostischen Wert dieser Methode, sondern es zeigte sich auch, daß sie sich als Kontrollmittel einer Therapie und selbst als Testuntersuchung einer erfolgten Heilung eignet.

Endlich erlaubt dieser Test, der rasch ausgeführt werden kann und wenig Antigen verbraucht, weitangelegte epidemiologische Untersuchungen.

Summary

Serologic reactions, though only giving an indirect proof, are as valuable in the diagnosis of schistosomiasis, as the more direct examination of stool and urine for parasite eggs. The latter examinations indeed often turn out to be negative in proven bilharzia patients; be it on account of arrest of ovulation, or the supervening tissue fibrosis hindering shedding of the eggs in the parasitized individual.

Until now, serological examinations for schistosomiasis were connected with enormous practical difficulties, all mainly connected with the problem of antigen-preparation.

The immuno-fluorescence reaction in *S. mansoni* frozen sections represents an important advantage because of its facility and rapidity of examination, and above all, because of the small amount of parasitic material required.

Improved even further by the conter-coloration-procedure with Evans blue, this technique offers results which can readily be interpreted.

We have shown this method to be specific and sensitive on the basis of 1019 examinations, corresponding to 797 bilharzia patients.

Its diagnostic value appears high, the results being positive in 96% of cases, placing it among the best serologic reactions.

A comparison of these results with those obtained from the clinic or various other para-clinical and biological investigations establish its diagnostic value as a mean for treatment control and as an effective test for recovery or cure.

Finally, the rapidity of this method and relatively minute amount of antigen required, renders its application possible for vast epidemiological surveys.

Die 4. Tagung der Deutschen Tropenmedizinischen Gesellschaft findet in Gemeinschaft mit der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin vom 21. bis 23. April 1969 in Salzburg und Bad Reichenhall statt.

Programm: Trypanosomiasis; Onchocerkose; Arboviren; Freie veterinärmedizinische Themen; Freie Vorträge; Round-table-Gespräch über Schutzimpfung und Infektionsprophylaxe in den Tropen.

Anmeldungen und Anfragen an Prof. Dr. Werner Mohr, Chefarzt der Klinik des Bernhard-Nocht-Instituts für Schiffs- und Tropenkrankheiten, 2 Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Straße 74, oder Prof. Dr. Heinz Flamm, Vorstand des Hygiene-Institutes der Universität Wien, A 1095 Wien, Kinderspitalgasse 15.

Erratum

Acta Tropica, 1968, n° 2, dans l'article de J. Coudert, J. P. Garin, P. Ambroise-Thomas, M. A. Pothier et Kien Truong Thai, note infra-paginale de la page 121 lire « les réactions d'Immuno-*électrophorèse* par le Professeur J. Biguet » au lieu d'Immuno-*fluorescence*.