

L'IMMUNO-FLUORESCENCE DANS LE DIAGNOSTIC
SEROLOGIQUE DE L'HYDATIDOSE HUMAINE

F.LOMHEH*

Parmi les affections parasitaires observées en Iran l'hydatidose est certainement l'une de plus graves.

Ses aspects extrêmement variés ont soulevé différents problèmes diagnostiques. Les techniques radiologique ou scintigraphie apportent souvent les éléments de forte présomption mais c'est seulement sur le plan biologique qui repose le diagnostic de l'hydatidose.

Le diagnostic parasitologique, basé sur l'observation microscopique des structures parasitaires, exposant la ponction des kystes est rigoureusement proscrite, car elle entraînerait des risques de complication majeure (choc et/ou échinococcose secondaire) donc c'est sur les tests immunologiques que repose le diagnostic biologique de l'hydatidose.

A l'exception de l'immuno-fluorescence toutes les réactions sérologiques sont réalisées à partir d'antigène hydatique soluble. L'avantage fondamental de l'immuno-fluorescence est précisément l'emploi d'un antigène figuré, constitué par des coupes à la congélation de scolex d'échinococcus granulosus. La confection de ses coupes

n'exige que très peu de matériel parasitaire et surtout il n'est pas nécessaire d'extraire puis de purifier des antigènes solubles puisque c'est ici le parasite lui-même qui sert directement d'antigène.

Tout ceci nous a conduits à présenter cette technique qui "outre son élégance et ses qualités de sensibilité et de spécificité" comme disait AMBROISE-THOMAS, depuis dix ans a trouvé l'un de ses meilleurs champs d'application dans le séro-diagnostic d'hydatidose et qui est relativement mal connue en Iran.

Nous nous proposons de rappeler très brièvement le principe de cette réaction, les modalités techniques ensuite, la valeur diagnostique sera précisée à partir de 82 cas confirmés d'hydatidose humaine.

PRINCIPE DE LA REACTION

Le principe de cette technique repose sur les travaux de coons qui en 1934, a montré que les substances fluorescentes (les sels de fluoresceine) peuvent marquer les anticorps sans perdre les propriétés de se fixer sur les antigènes homologues.

Les sels de fluoresceine ainsi conjugués peuvent être observés en lumière ultra-violette.

Nous avons utilisé la technique dite «d'immuno-fluorescence indirecte» imaginée par WELLER et COONS en 1954.

Dans cette méthode, on met en contact l'antigène et le sérum étudié si le sérum contient des anticorps spécifiques de l'antigène utilisé, ces anticorps vont se fixer sur l'antigène.

Dans la deuxième temps de la réaction ces anticorps sont mis en évidence grâce à un conjugué fluorescent anti-immunoglobuline.

En définitive l'antigène apparaît fluorescent en lumière ultra-violette.

MATERIELS ET METHODES

Comme réactif antigénique nous avons utilisé des coupes à la

congélation de scolex d'échinococcus granulosus (antigène figuré).

Cette préparation antigénique a été appliquée à l'hydatidose par AMBROISE-THOMAS et KIEN-TRUONG.

Les scolex prélevés dans des kystes humains ou animaux sont lavés à deux reprises dans du liquide physiologique il est essentiel alors de n'ajouter aucun produit antiseptique ou fixateur. Ces scolex peuvent être conservés à -20°C .

Au moment de leur conditionnement les sables hydatiques sont décongelés et lavés encore à deux reprises dans du liquide physiologique.

Le culot de centrifugation est repris par une très petite quantité de liquide physiologique, ainsi nous avons une suspension parasitaire aussi riche que possible. Ces scolex sont à l'aide d'une pipette pasteur effilée, introduits dans un fragment de paroi abdominale de cobaye, qui est enroulé sur une fine tige, de manière à former un cylindre de un centimètre de diamètre environ.

A partir de ces cylindres, des coupes à la congélation de 5 d'épaisseur peuvent être facilement réalisées.

Ces coupes sont par simple opposition, fixés sur des lames jusqu'au moment de leur emploi comme antigène figuré ces préparations peuvent être conservées à -20°C durant une période de plusieurs mois.

Une contre coloration par le Bleu d'Evans permet de marquer les fluorescence non spécifique des éléments parasitaires.

EXECUTION DE LA REACTION

La réaction d'immuno-fluorescence est pratiquée suivant les modalités habituelles de la technique indirecte.

1. Sortir les préparations du congélateur, les fixer et délipider dans un bain d'acétone pendant 10 minutes à la température ordinaire.
2. Faire réagir les sérums étudiés qui sont dilués au 1/10, 1/20, etc... on laisse réagir pendant 1/2 heure à 37°C en atmosphère humide.
3. Les lames sont lavées dans deux bains différents de tampon (5 minutes dans chaque bain) puis elles sont séchées devant un ventilateur.
4. On recouvre alors toutes les préparations d'une goutte de conjugué.

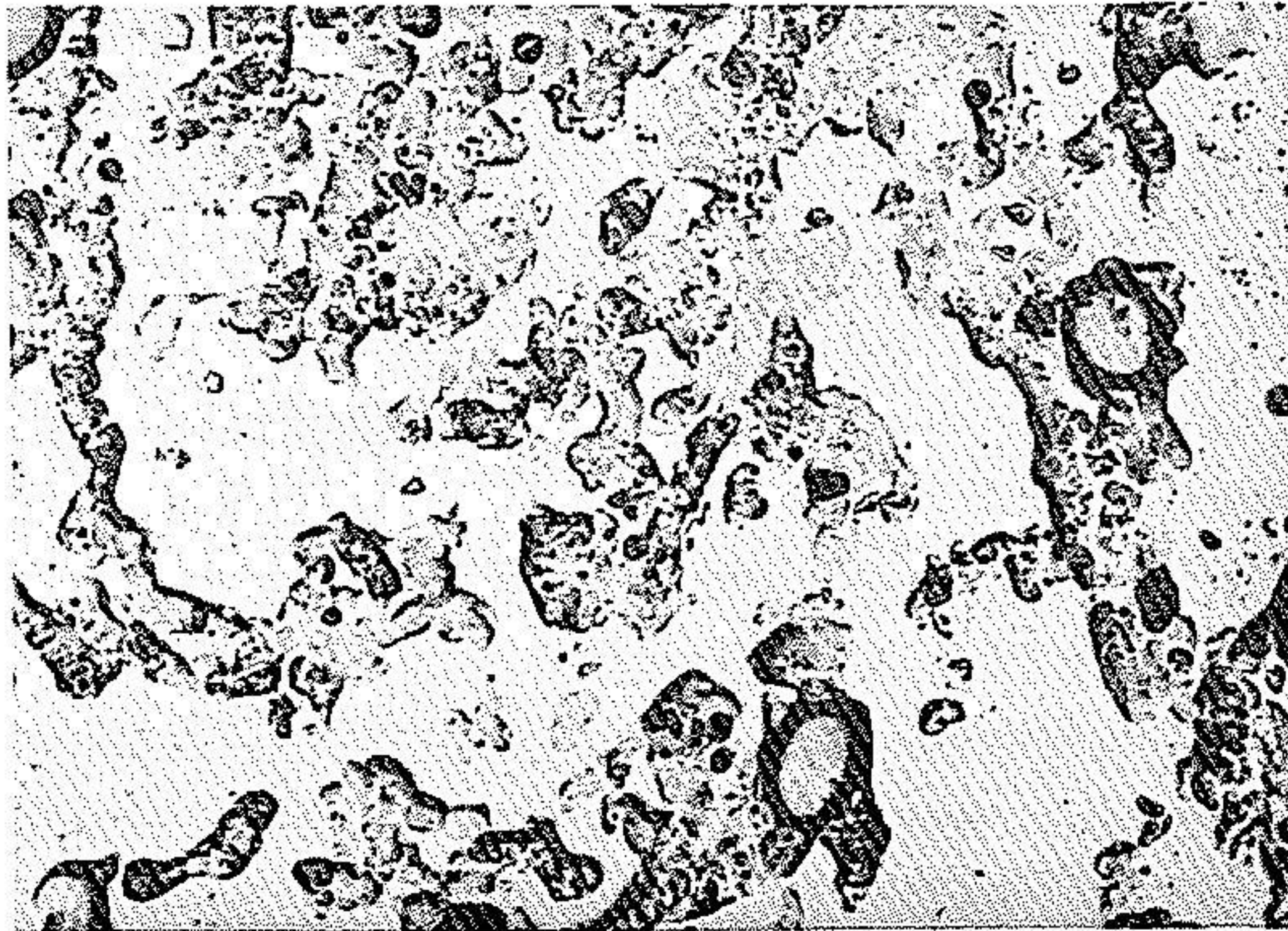
luorescent* dilués préalablement au 1/50 dans le tampon à PH 7,2. On laisse réagir pendant 30 minutes à 37°C en chambre humide.

5. Les lames sont lavées comme au 3^e.
6. On plonge les préparations dans une solution de Bleu d'Evans (contre coloration) pendant 10 minutes. Cette solution est à 1/10,000 dans les tampons à PH 7,2.
7. Nouveaux lavages comme 3^e et 5^e.
8. Sécher les lames devant un ventilateur. Recouvrir d'une lamelle montée sur une goutte de glycérine tamponnée à PH 7,2.

LECTURE DE LA REACTION

La lecture des résultats est faite avec un microscope en lumière ultraviolette.

En cas de réaction positive une vive fluorescence jaune-verte des scolex traduit une réaction positive, au contraire, une réaction négative ne retient que le contre colorant, (coloration rouge) la même teinte que la muscle strié qui, sur chaque préparation entoure les sections de scolex.



Immuno-Fluorescence sur coupes de scolex
d *Echinococcus granulos* - réaction positive

RESULTATS

Nous avons effectué la réaction d'immuno-fluorescence indirecte pour les 82 malades dont l'existence d'un kyste-hydatique a été ultérieurement confirmée après intervention chirurgicale.

Pourcentages de réaction d'immuno-fluorescence positives ou négatives sont portés dans le tableau 1.

Pour l'ensemble de ses observations l'immuno-fluorescent indirecte était positive dans plus de 94% de cas (tableau 1).

Réaction d'immuno-fluorescence	Positive	Négative	Total
Nombre de cas observés	80	5	85
Pourcentage	%94	%5	

Tableau 1. Pourcentage de réactions d'immuno-fluorescence positives ou négatives dans les cas de kystes hydatiques.

Les résultats obtenus en tenant compte de localisation parasites sont portés dans le tableau 2.

Dans l'interprétation des résultats, il faut tenir compte de la localisation de kyste, en effet les hydatidoses péritonéales hépatosplénique, hépato-plumoniaires s'accompagnent dans 99% des cas d'une réaction d'immuno-fluorescents positive et les titres d'anticorps fluorescent atteignent généralement un taux assez élevé.

Localisa- tion des Hystes Hydatiques	Nombre de sérum minés	Titre d'anticorps fluorescent										% de résul- tats positifs
		Neg	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/1280	
Foie	38	0	4	4	6	9	5	8	1	1	1	100%
Foie+rate	3	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	100%
Rate	4	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	100%
Foie+pou- mons	5	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	100%
Poumons	22	4	7	3	3	1	3	1	0	0	0	81%
Foie+Rénal	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	100%
Coeur	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100%
Os	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
Péritoine (E-Secondaire	8	0	0	0	0	4	2	1	1	0	0	100%
Cerveau	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100%
Thyroïde	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100%

Tableau 2. Valeur diagnostique de la réaction d'immuno-fluorescence sur coupes de scolex d'Echinococcus granulosus en tenant compte de localisations parasitaires.

Par contre comme toutes les autres réactions sérologiques (CAPRON 1967, AMBROISE-THOMAS 1975) l'échinococcose osseuse, de même hydatidose pulmonaire isolées donne fréquemment une réponse négative ou bien n'entraîne qu'une très faible réponse sérologique.

Efin, pour contrôler de spécificité nous avons effectué 50 réactions d'immuno-fluorescence sur coupes de scolex en utilisant les sérums normaux (sujet sains), rien n'était positif (tableau 3).

Tableau 3. Contrôle de spécificité sur les sérums normaux.

Nature des sérums	Nombre	Résultats de la réaction	
		Positif	Négatif
Sérums normaux	50	—	50
Echinococcus granulosus	85	80	5

CONCLUSION

Parmi les techniques séro-immunologique la réaction d'immuno fluorescence (qui a déjà acquis un rôle essentiel dans les domaines variés de la parasitologie) sur coupe de scolex est l'une des plus fideles, positif dans plus de 94% des cas d'échinococcose ce qui est bien comparable aux meilleures autres techniques sérologiques (BENEX 1970, MALJAN 1973) et ce qui établit sa valeur diagnostique.

SUMMARY

Serologic diagnostic of hydatid cyst by
immuno-fluorescence technique

Of the serological methods for the diagnosis of hydatid cyst

immuno-fluorescent technique using frozen section of the scolex as antigen has given encouraging results.

In the present study examination of 85 sera corresponding to hydatidose patients by this méthode, has shown that 94% of the cases can be detected with this high sensitivity technique. And this method can be considered as one of the best serological methods for the diagnostic of Echinococcosis.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMBROISE-THOMAS,P.
Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence.
Thèse doctorat de sciences naturelles, Lyon 1969, 331-421.
2. AMBROISE-THOMAS,P. et KIEN-TRUONG,T.
L'immuno fluorescence dans le diagnostic sérologique et le post-opératoire des 1'hydatidose humaine
CML, 1970, Vol. 49, n° 36, 2955-2962.
3. AMBROISE-THOMAS,P.
Hydatidose Echinococcose alvéolaire.
Encyclopédie médico-chirurgicale, Maladies infectieuses et parasitaires 8107 A 10, 1972, 4 : 1-14.
4. AMBROISE-THOMAS,P.
Le séro-diagnostic par immuno-fluorescence de 1'Amibiase, de kyste-hydatique et des Bilharzioses succès, Echecs, incertitudes.
Extrait du Maroc-médical 1975, n° 588, 131-134.
5. AMBROISE-THOMAS,P.
Diagnostic et contrôle post-thérapeutique des parasitoses digestive par la recherche des anticorps fluorescents.
Médecine et Hygiène, 1975, n° 1161, P. 4.
6. BENEX,J.
Valeur pratique en parasitologie du diagnostic sérologique par immuno-fluorescence. Comparaison avec les autres réactions sérologiques.
Feuillets de biologie, 1970, vol. XI n° 52, 51-52.

7. CAPRON, A. BIGUET, J. TRAN VAN KY, P.
Le diagnostic immunologique des parasitoses humaines.
Lille, Med. 1967, 12, 43-52.
8. COONS, A.H.
The beginning of immunofluorescence.
J. Immunol. (U.S.A) 1961, 499-503.
9. COUDRET, J. AMBROISE-THOMAS, P. KIEN-TRUONG, T. et POTHIER, M.A.
Le diagnostic sérologique de kyste-hydatique par immunofluorescence sur coupes de scolex.
Cah. Med. Lyonnais 1969, 45, 1111-1118.
10. LOMHEH, F.
Valeur diagnostique de l'immuno-fluorescence dans l'hydatidose humaine.
Thèse M.S.P.H. de pathobiologie.
11. MALAJAN, N.C., GANGOLY, N.L., CHITKARA, N.L., and AGARWAL, S.C.
Comparative evaluation of indirect haemagglutination intradermal and complement fixation test in diagnosis of hydatid diseases.
Indian J. Med. 1973, 335-337.