

12. LESOURD (M.). — *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1938, 16, 589.
13. MARILL (F. G.), ALCAY (L.) et MUSSO (J. C.). — *Bull. Soc. Hist. nat. A. F. N.*, 1942, 33, 110.
14. MARILL (F. G.), HOFMAN (M.) et BERTOZZI (G.). — *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1949, 27, 110.
15. MARILL (F. G.). — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1957, 50, 794.
16. MINICONI (P.). — *Thèse Médecine*, Alger, 1940.
17. PY (ED.) et RIPERT (CH.). — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1966, 59, 234-239.
18. RIPERT (CH.), MERED (B.) et PY (ED.). — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1965, 58, 221.
19. SENEVET (G.), SORREL (A.), RIPERT (CH.) et BOUKROUFA (R.). — *Algérie méd et chir.*, 1964, 1, 170.
20. SERGENT (E.). — *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1939, 17, 601.

DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE L'ÉCHINOCOCCOSE ALVÉOLAIRE PAR IMMUNO-FLUORESCENCE

Par J. COUDERT, P. AMBROISE-THOMAS, J. DESPEIGNES,
M. CADI-SOUSSI et T. KIEN TRUONG (*)

Affection rare, l'échinococcose alvéolaire a une symptomatologie suffisamment atypique pour que rien, cliniquement et radiologiquement, ne permette d'en affirmer l'existence. Les examens biologiques prennent de ce fait une importance toute particulière puisqu'ils sont les seuls à fournir des bases assez solides au diagnostic.

De très nombreuses réactions immunologiques ont été utilisées jusqu'ici : réaction de fixation du complément, hémagglutination, agglutination de particules sensibilisées (latex, bentonite) et précipitation en gélose. Toutes ces méthodes présentent une difficulté commune qui tient à la nature de l'antigène utilisé : l'antigène hydatique ne met en évidence que des réactions de groupe, non spécifiques, et quant à l'antigène alvéolaire, son extraction et sa purification sont délicates étant donné la rareté des éléments véritablement parasitaires au sein des kystes alvéolaires. Cet antigène alvéolaire qui se voudrait spécifique présente donc en fait de nombreuses fractions correspondant aux tissus de l'hôte et non au parasite (KAGAN, par des méthodes de diffusion en gélose, a pu montrer que sur 27 bandes de précipitation, 4 seulement pouvaient être indiscutablement rapportées au parasite).

L'immuno-fluorescence, permettant d'utiliser directement les éléments parasitaires sans qu'il soit nécessaire d'en extraire des

(*) Séance du 12 octobre 1966.

antigènes, il était intéressant de tenter l'application de cette technique au diagnostic sérologique de l'échinococcose alvéolaire. Compte tenu de la rareté de cette affection, il ne semble pas qu'une étude de ce genre ait été réalisée jusqu'ici. Nous avons pu, à Lyon, observer 6 malades atteints d'échinococcose alvéolaire et étudier 10 prélèvements effectués chez eux. Ceci nous a permis de mettre au point une réaction d'immuno-fluorescence et d'en préciser la sensibilité et la spécificité.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

1° *Antigènes.*

Il est constitué par des coupes à la congélation d'un fragment opératoire de kyste alvéolaire humain. Ce fragment est conservé, sans fixateur, au congélateur à -20° C. On réalise au cryostat (Bright's cryostat) des coupes de $5\ \mu$ d'épaisseur. Ces coupes peuvent se conserver, sur lames, au congélateur à -20° et sont directement prêtes à l'emploi.

2° *Conjugué fluorescent.*

Anti-globulines BD Merieux (diluées au 1/8) ou de l'Institut Pasteur de Paris (diluées au 1/50) conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine.

3° *Installation microscopique.*

Microscope Reichert « Zétopan » avec condensateur à fond clair. Filtre d'émission BG 12/3 mm. Filtres d'arrêt CG 9/1 mm. et OG 1/1 mm. 5.

4° *Contre colorant.*

Solution à 1/10.000 de Bleu d'Evans (*) dans l'eau distillée.

5° *Mode opératoire.*

- Fixation des coupes dans un bain d'acétone pendant 10 minutes.
- Action du sérum étudié pris à différentes dilutions, pendant 1/2 heure à 37° .
- Lavage dans deux bains successifs de tampon à pH 7,2 (5 minutes chaque fois).
- Action du conjugué fluorescent : 1/2 heure à 37° .
- Lavages comme précédemment.
- Contre coloration, pendant 10 minutes dans la solution de bleu d'Evans.

(*) Bleu d'Evans R. A. L.

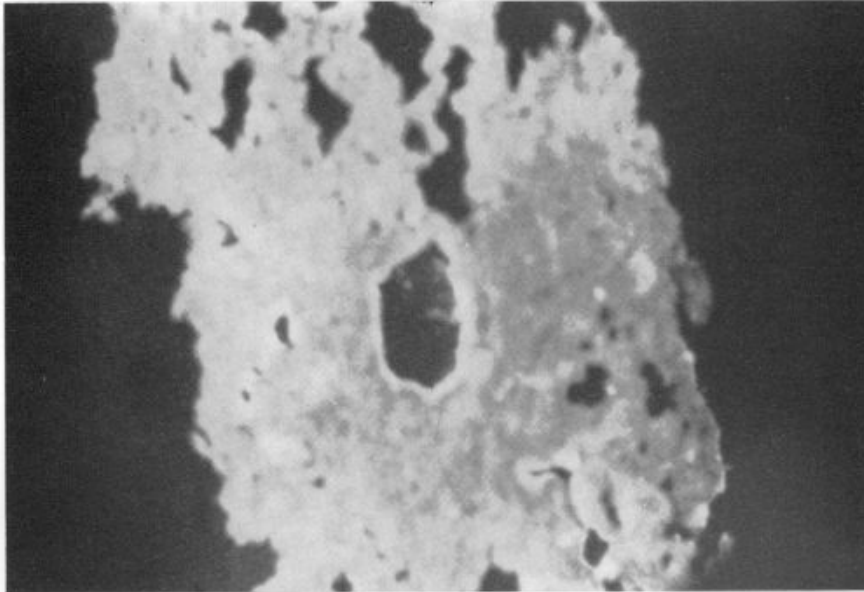


Fig. 1. — Echinococcose alvéolaire. Immunofluorescence avec contre-coloration. Réaction positive. Le tissu hépatique est coloré en rouge, alors que les membranes bordant les cavités kystiques présentent une fluorescence spécifique jaune-vert (apparaissant ici en plus clair) (Gr. : 10).

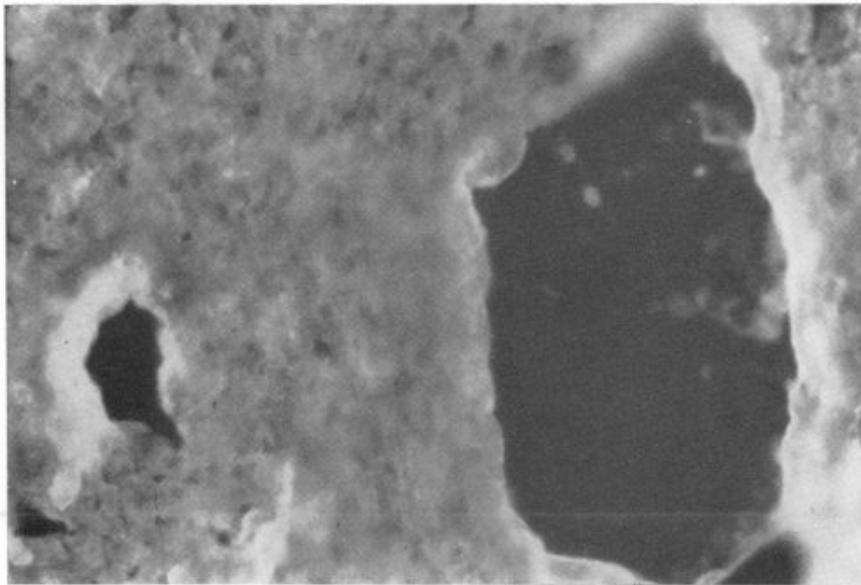


Fig. 2. — Même coupe que pour la figure 1, mais prise à un plus fort grossissement (Gr. : 40).

— Lavages.

— Montage sous lamelle dans une goutte de glycérine tamponné à pH 7,2 et examen des préparations au microscope à lumière ultraviolette.

6° *Témoins.*

Pour chaque série de réactions nous avons étudié 2 témoins négatifs au moins, 1 témoin-conjugué (préparation soumise uniquement à l'action du conjugué et du contre-colorant) et plusieurs témoins positifs et négatifs sans contre-coloration. En outre, au début de notre étude, nous avons pratiqué plusieurs réactions sur des coupes de foies humains normaux dont nous voulions comparer l'autofluorescence à celle des tissus parasités par *E. multilocularis*.

II. — RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

1° *Lecture de la réaction.*

Effectuée suivant les modalités habituelles (technique indirecte), la réaction est assez difficile à lire compte tenu de l'importante auto-fluorescence des tissus hépatiques. Ceci nous a conduits à recourir à la contre-coloration par le bleu d'Evans, que nous avons déjà utilisée pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose.

Grâce à cette contre-coloration, le tissu parasité est teinté en rouge vermillon tandis que seuls les éléments parasitaires (membrane anhiste et membrane germinative) présentent une vive fluorescence jaune-vert. Cet aspect correspond à une réaction positive alors que si le sérum étudié est négatif, la préparation est uniformément rouge. Dans ces conditions il est donc possible de limiter la lecture aux zones strictement parasitaires, sans que l'auto-fluorescence des tissus environnants viennent diminuer la netteté des résultats.

2° *Sensibilité et reproductibilité.*

Nous avons disposé de 10 sérums provenant de 6 malades atteints d'échinococcose alvéolaire confirmée (examen anatomo-pathologique). Tous ces sérums ont été testés en immuno-fluorescence et en fixation du complément. Pour l'immuno-fluorescence, nous avons adopté le 1/10 comme dilution initiale, puis des taux successifs de 1/20, 1/40, etc., en poursuivant la réaction jusqu'à sa négativation totale. Nos résultats sont les suivants (tableau I).

En fonction de leurs titres en anticorps fluorescents, la répartition de ces 10 sérums est la suivante (tableau II).

Tous les taux observés pour ces cas confirmés d'échinococcose alvéolaire, sont donc égaux ou supérieurs à 1/40 et même, dans 9 cas

sur 10, à 1/80. La réaction d'immuno-fluorescence paraît par conséquent posséder une sensibilité satisfaisante.

La fidélité de la technique a été systématiquement recherchée au cours de toutes les séries d'examen. Elle semble également satisfaisante puisque les taux successifs notés pour un même sérum n'ont jamais varié de plus d'un tube de dilution, le taux minimum observé ayant été, dans tous les cas, de 1/40.

TABLEAU I

*Étude de 10 sérums d'échinococcose alvéolaire.
Résultats obtenus en immuno-fluorescence et en fixation du complément.*

Sérums de malades atteints d'échinococcose alvéolaire	Titre des réactions	
	Fixation du complément	Immuno-fluorescence
E 1 MICH...	1/4 (antigène hydatique) 1/2 (antigène alvéolaire)	1/40
E 2 MOUG...	1/4 (antigène hydatique)	1/80
E 3 MOUG...	1/4 (antigène hydatique)	1/80
E 4 POR...	1/4 (antigène hydatique)	1/60
E 5 AGN...	1/32 (antigène hydatique)	1/160
E 6 AGN...	1/64 (antigène hydatique)	1/320
E 7 AGN...		1/320
E 8 BIG... (*)	1/8 (antigène hydatique)	1/80
E 9 GAR...		1/160
E 10 GAR...	1/256 (antigène hydatique)	1/320

(*) Nous devons ce sérum à l'amabilité du Professeur CORTET, clinique médicale du C. H. U. de Dijon.

TABLEAU II

Répartition de 10 sérums d'échinococcose alvéolaire en fonction de leurs titres en anticorps fluorescents.

Titres en anticorps fluorescents	Nombre de sérums
1/40	1
1/80	3
1/160	3
1/320	3

3° *Spécificité.*

La spécificité de la réaction a été appréciée par l'étude de sérums de sujets atteints de kyste hydatique (7 cas), de distomatose (5 cas), de bilharziose urinaire (5 cas), de *Taeniasis* à *T. saginata* (1 cas) et de syphilis (2 cas) (tableau III).

TABLEAU III

*Titres en anticorps fluorescents
(antigène : coupes de kystes alvéolaires)
de sujets atteints de diverses helminthiases ou de syphilis.*

Kyste hydatique	Distomatose	Bilharziose	<i>Taeniasis</i>	Syphilis
K 7 BA... 1/10	D 7 CA... 1/10	B 2 Jo... Neg.	TS 1 H... Neg.	S 1 Neg.
K 10 GA... Neg.	D 8 FA... Neg.	B 6 BE... Neg.		S 2 Neg.
K 12 BEN... Neg.	D 9 Jo... Neg.	B 7 Mo... 1/10		
K 15 GA... 1/10	D 10 CA... Neg.	B 9 Bo... Neg.		
K 17 CHA... Neg.	D 24 JA... Neg.	B 14 B... Neg.		
K 47 BOU... 1/10				
K 49 CHE... 1/10				

Les réactions croisées correspondent donc à des taux atteignant au maximum 1/10 et il semble que la technique présente des garanties suffisantes de spécificité. Nous avons, en particulier, retenu les taux minimales observés dans les cas de kyste hydatique. Deux de nos malades présentaient pourtant une échinococcose secondaire avec des localisations multiples et les réactions de fixation du complément (antigène hydatique) étaient fortement positives.

Dans l'état actuel de notre expérience, la réaction paraît donc présenter une valeur diagnostique certaine, un taux de dilution supérieur ou égal à 1/40 semblant spécifique de l'échinococcose alvéolaire.

III. — CONCLUSIONS

Bien que nos résultats soient encore trop limités pour autoriser des conclusions définitives, il semble que l'immuno-fluorescence offre d'intéressantes possibilités diagnostiques pour l'échinococcose alvéolaire. Cette technique permet l'emploi d'un antigène spécifique représenté par des coupes à la congélation de tissus parasités et, grâce à une contre-coloration, l'appréciation des résultats uniquement au niveau des éléments parasites.

Les coupes utilisées comme « antigènes » sont de préparation relativement facile et de conservation aisée ce qui assure à la réaction une commodité d'emploi indiscutable, compte tenu surtout des difficultés d'extraction et de purification des antigènes nécessités par les autres techniques sérologiques.

La sensibilité paraît assez élevée, les titres obtenus pour 10 sérums d'échinococcose alvéolaire étant supérieurs à 1/40 et atteignant 1/320 dans 3 cas.

Enfin la spécificité semble satisfaisante puisque des taux maxima de 1/10 ont été observés avec des sérums de kyste hydatique, de distomatose et de bilharziose.

RÉSUMÉ

Pour le diagnostic sérologique de l'échinococcose alvéolaire, les auteurs proposent une technique originale d'immuno-fluorescence réalisée sur coupes à la congélation de foie parasité. Il s'agit d'une réaction indirecte complétée par une contre-coloration par le bleu d'Evans; 10 sérums de sujets atteints d'échinococcose alvéolaire ont été analysés et ont tous été trouvés positifs à des titres de dilution supérieurs ou égaux à 1/40. La spécificité de la méthode semble très satisfaisante et a été vérifiée avec des sérums de syphilitiques ou de sujets présentant diverses helminthiases (kyste hydatique, distomatose, bilharziose).

SUMMARY

Serologic diagnostic of alveolar echinococcosis
by means of immunofluorescence.

Alveolar echinococcosis caused by *Echinococcus multilocularis* larva (fox echinococcus) is a rare and severe disease; a focus exists in Jura. The biological diagnostic can be made by means of serologic reactions, using as antigens frozen sections of the parasited tissue, and as antibody, the sensitized patients serum.

(Travail réalisé avec l'aide de l'I. N. S. E. R. N.).
Chaire de Parasitologie et de Pathologie exotique,
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMBROISE-THOMAS (P.), GARIN (J. P.) et RIGAUD (Mlle A.). — Amélioration de la technique d'immuno-fluorescence par l'emploi de contre-colorants. Application à la toxoplasmose. *La Presse Médicale* (à paraître).

2. COUDERT (J.), DESPEIGNES (J.), AMBROISE-THOMAS (P.) et BATTISTI (Mlle M. R.). — A propos de 3 cas d'échinococcose alvéolaire (données épidémiologiques et cliniques). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1965, **58**, 890-895.
3. KAGAN (I. G.), NORMAN (L.) et ALLAIN (D. S.). — Studies on echinococcosis : serology of crude and fractionned antigens prepared from *echinococcus granulosus* and *echinococcus multilocularis*. *Am. J. Trop. Med. et Hyg.*, 1960, **9**, 248-261.
4. KAGAN (I. G.) et NORMAN (L.). — Antigenic analysis of echinococcus antigens by agar diffusions techniques. *Am. J. Trop. Med. et Hyg.*, 1961, **10**, 727-734.
5. KAGAN (I. G.), OSIMANI (J.), VARELA (J. C.) et ALLAIN (D. S.). — Evaluation of intradermal and serologic test for the diagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. et Hyg.*, 1966, **15**, 172-179.
6. Immunodiagnosis of helminthic infections. *The American Journal of Hygiene*. Monographic series n° 22, juillet 1963.

DISCUSSION. — Intervention de M. VARGUES (Tours). — Il est nécessaire d'attirer l'attention des sérologistes sur une erreur systématique qui se trouve reproduite dans tous les traités et dans toutes les publications. L'activité immunologique d'un sérum est indiqué par le taux de « dilution-limite », c'est-à-dire la plus faible concentration en sérum donnant encore une lecture positive. Or, dans toutes les réactions, cette dilution-limite est indiquée *par rapport au volume final* du test ; cependant les sérologistes font une exception en ce qui concerne la réaction de fixation du complément où la dilution-limite est donnée *par rapport au volume de dilution sérique utilisée*. Or, le plus souvent à 1 volume de dilution sérique on ajoute 10 volumes de solutions (antigène et complément). On doit donc multiplier la dilution-limite donnée pour la fixation du complément par le facteur 1/10 pour obtenir le titre en dilution-limite par rapport au volume final.