

L'application de l'immuno-fluorescence au diagnostic de la Fasciolose hépatique *

Par J. FRAGA de AZEVEDO et Palmira COELHO ROMBERT

La fasciolose hépatique constitue l'une des plus anciennes parasitoses connues, car on peut supposer que Moïse en faisait déjà référence quand, en 1500 av. J.-C. environ, il divisa les animaux en non propres et propres, selon qu'ils présentaient ou ne présentaient pas de parasites macroscopiquement visibles.

A côté de cette particularité, un autre aspect, de nature historique aussi, rehausse l'importance de la maladie, car son agent causal, la *Fasciola hepatica*, fut le premier des Trématodes, pour lequel le rôle des Mollusques dans le cycle évolutif Trématodes a été décrit dans les études de Jean de Brie en 1379 ; c'est aussi pour cet Helminthe que, en 1779, Weinland signale que, dans sa transmission, intervient la *Limnea truncatula*.

Par conséquent, ce parasite est certainement connu depuis des milliers d'années et on peut supposer que, tout en se livrant à ses propres et naturelles conditions d'expansion, il ait acquis une large dispersion dans le monde entier, ce qui, en réalité, se vérifie.

Il s'agit d'un parasite attaquant essentiellement les herbivores, et ayant pour hôtes intermédiaires des Mollusques qu'on peut trouver partout sans que son cycle évolutif rencontre de fortes limitations en ce qui concerne les conditions climatiques du milieu ambiant. On comprend ainsi aisément les raisons pour lesquelles la maladie acquiert les proportions d'une zoonose cosmopolite pesant très fort sur l'économie générale.

En effet, on peut dire que la parasitose existe sous toutes latitudes, allant de la Sibérie, au Nord, à l'Afrique australe et à l'Argentine, au Sud, après avoir passé par les climats tempérés et chauds.

Les taux élevés d'infestation des animaux causent de grands dommages, car ils réduisent leur capacité de travail, la production du lait et de la laine, sans parler de la diminution de la production de la viande et de la prédisposition à d'autres maladies. C'est ainsi, par exemple, qu'on a évalué en Angleterre en 1945 à plus de 200.000 livres par an les dommages consécutifs à l'existence de cette maladie chez les animaux.

Chez nous et d'après un calcul approximatif que nous avons eu l'occasion d'effectuer l'an dernier, on peut évaluer à peu près à 80.000 kg les viscères d'animaux infestés retirés à la consommation en 1954, et de cette façon, on peut estimer la valeur de la perte annuelle résultant de ce parasitisme à 1.600.000 Esc. environ.

* Communication présentée le 2 avril 1964 à la Section de Sciences de l'Académie des Sciences de Lisbonne.

Si l'on ajoute à ce dommage les pertes se référant aux autres facteurs indiqués, la perte annuelle due à la distomatose hépatique dépasse 3.000.000 d'Esc.

Quoique largement connue, et en dépit de sa vaste distribution chez les animaux, la maladie est rarement diagnostiquée chez l'Homme, probablement parce que le terrain lui est ici un peu défavorable et que les probabilités d'infection sont plus réduites. En vérité l'Homme, pour être atteint, doit ingérer des plantes aquatiques contenant des métacercaires infestantes ou de l'eau où ces larves se sont par hasard libérées ; ce qui, en général ne se produit que chez les populations rurales ou chez les personnes qui font usage de ces plantes dans leur alimentation.

D'autre part, si l'on considère la vaste dispersion et la fréquence de la maladie chez les herbivores et la rareté de l'infection humaine, nous croyons pouvoir conclure que notre



FIG. 1. — Territoires sur lesquels on a identifié des cas humains de fasciolose hépatique

organisme doit être atteint plus souvent que le nombre des cas enregistrés ne le laisse pressentir. A l'appui de l'idée que l'organisme humain ne doit pas être très favorable à cette maladie, on peut invoquer l'éosinophilie intense que déclenche le parasite : la disproportion entre la quantité de vers qui pénètrent dans l'organisme et les foyers de nécrose à réaction éosinophile observés d'une part, le nombre de vers qui arrivent à l'état adulte (à l'inverse de ce qui se passe chez les animaux) et l'absence ou l'insignifiance des pontes (Bailenguer et coll., 1961), d'autre part.

Cependant, soit parce que le parasite présente une distribution et une incidence de plus en plus importantes en s'adaptant progressivement à l'Homme, soit parce que celui-ci consomme de plus en plus de plantes aquatiques, soit encore parce que la pratique du camping permet à l'Homme de vivre plus intimement avec la nature, ou bien même parce que les moyens de diagnostic ont subi des perfectionnements successifs, le fait est que, depuis quelques années, on constate un accroissement incessant et remarquable de cas humains enregistrés.

Ainsi, jusqu'en 1950, la littérature médicale mondiale a mentionné simplement 250 cas de distomatose humaine à *Fasciola hepatica* dont le premier fut décrit par Pallas en 1760. Mais depuis 1950, c'est par centaines, sinon par milliers, qu'il faut compter les cas connus de ce parasitisme.

En France seulement, on a signalé au nord de Lyon, en 1956-57, une épidémie qui a atteint 500 personnes ; 128 cas ont été enregistrés dans les Pyrénées-Atlantiques de 1957 à 1958, et 200, chiffre très élevé, dans le département du Lot-et-Garonne en 1958, alors que cinq cas seulement avaient été constatés dans ce pays jusqu'en 1956. D'autres foyers importants de distomatose humaine ont été observés (fig. 1) dans d'autres territoires, Cuba et l'Uruguay étant, outre la France, les pays les plus atteints.

Notre pays n'a pu résister à ce nouveau courant de la zoonose, laquelle mérite de plus en plus la désignation d'anthropozoonose ; en effet, depuis 1948 et 1949, où l'un de nous eut l'occasion de collaborer avec le Professeur Fernando Fonseca dans le diagnostic des deux premiers cas humains confirmés, respectivement originaires de Madère et de Santa Comba Dão, le nombre des cas connus s'élève à quelques dizaines sur le Continent, parmi lesquels 28 sont mentionnés sur des registres bibliographiques.

Il va sans dire que ce chiffre devra certainement être augmenté d'autres cas non enregistrés ou publiés dont nous-mêmes avons pu observer quelques-uns.

Des cas humains ont été décrits sur presque tout le territoire continental et à Madère, mais surtout au Minho (nord du pays), et on a raison de supposer que la maladie peut se manifester en n'importe quelle autre région, étant donné que la distomatose des animaux couvre tout le territoire, quoiqu'avec une incidence spéciale dans certains districts (fig. 2).

Cependant, comme il s'agit, malgré tout, d'une maladie qu'on peut considérer comme relativement rare, les médecins ne sont pas encore dûment familiarisés avec son cadre nosologique, et ce, également en raison du polymorphisme de sa symptomatologie ; on comprend qu'on soit arrivé ainsi aux diagnostics les plus différents. En effet, dans le deuxième groupe de malades du Professeur Fernando Fonseca se référant à 1955, à l'étude duquel l'un de nous a eu aussi l'opportunité de collaborer, les diagnostics suscités par la maladie ont été les plus divers ; parmi ceux-ci, il faut indiquer les suivants : paludisme, grippe, fièvre de Malte, cholécystite, fièvre typhoïde, angio-cholite, hépatite, néoplasie du foie, appendicite aiguë, colite, processus pleuropulmonaire, affection gastrique, etc.

Dans d'autres exégèses, en particulier celles qui concernent les épidémies en France, on signale des confusions analogues, quelques malades ayant même subi par erreur des appendicectomies.

Il faut dire encore que chez nous, quoique le parasite puisse être trouvé erratiquement en quelque point que ce soit de l'organisme, on n'a signalé que des cas à localisation hépatique.

Le diagnostic de distomatose hépatique est basé sur la recherche des œufs dans le suc duodénal ou dans les fèces, vers lesquelles ils sont acheminés à partir des canaux biliaires où loge habituellement le parasite. Cette recherche n'est réalisée cependant que lorsque les présomptions cliniques ou une éosinophilie élevée, atteignant 25 % et plus (l'un des signes les plus importants, évident surtout dans la phase d'invasion), nous font admettre l'hypothèse d'une telle affection. L'éosinophilie peut être absente, elle aussi, principalement dans la phase avancée de la maladie, ainsi que nous l'avons vérifié dans quelques-uns de nos cas.

Les données épidémiologiques constituent aussi un fil conducteur du diagnostic qu'il faut bien considérer, et ainsi nous avons noté que tous nos malades étaient grands consommateurs de cresson cru, la principale plante responsable de la transmission à l'Homme de

la douve hépatique, le caractère familial que la maladie prend maintes fois étant par conséquent compréhensible.

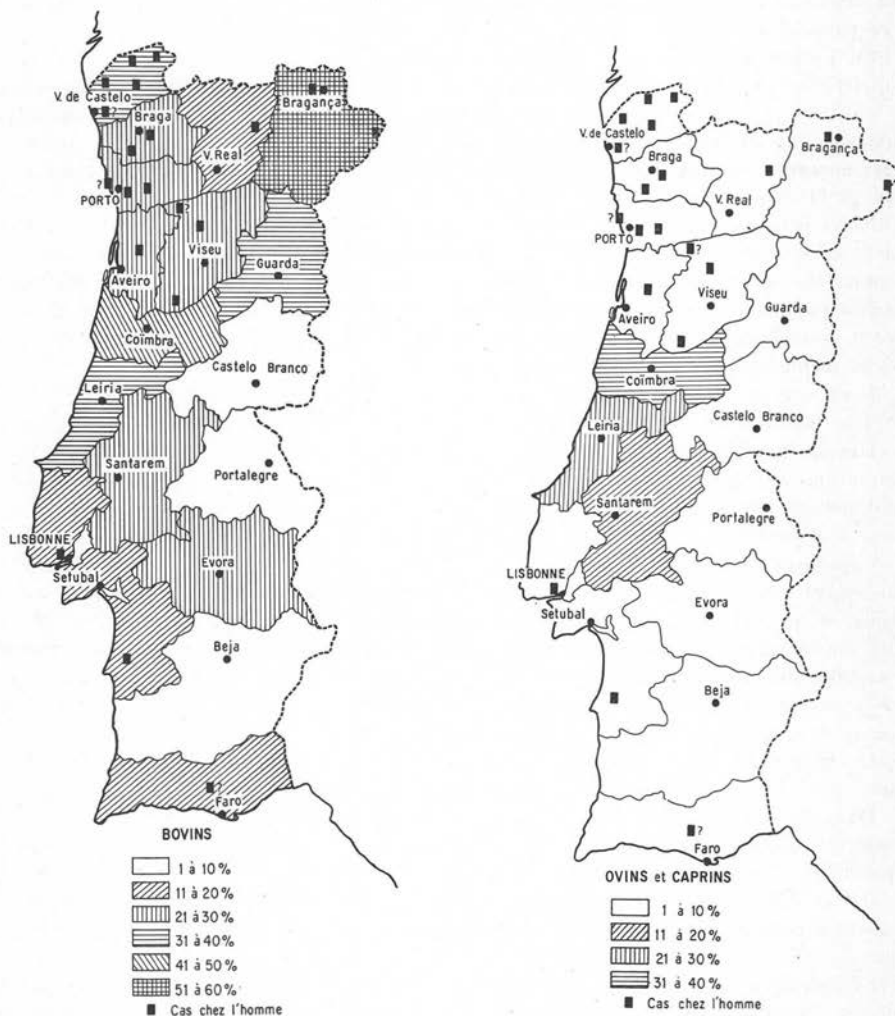


FIG. 2. — Prévalence de la distomatose chez les herbivores au Portugal (Silva Leitão, 1960) et référence des points où on a constaté des cas humains

Nous avons cependant eu l'occasion de suivre plusieurs patients chez lesquels une éosinophilie élevée et divers symptômes cliniques nous faisaient soupçonner des cas de distomatose, mais où les recherches des œufs du parasite dans le suc duodénal et dans les fèces se révélaient systématiquement négatives. Le traitement institué pour ce genre de parasitose a alors permis la guérison de beaucoup de malades, ce qui constitue un élément de plus en

faveur de ce diagnostic. Des résultats identiques ont été d'ailleurs indiqués par d'autres auteurs, en particulier par ceux qui décrivent l'épidémie de France, au nord de Lyon, où, parmi 45 malades dûment examinés, 22 seulement ont présenté des œufs dans les fèces.

Il faut mentionner aussi l'existence de plusieurs cas enregistrés dans la littérature médicale où la recherche des œufs dans les matières fécales a été constamment négative, la cholécystectomie révélant pourtant la présence de parasites.

Il se peut que la négativité de ces examens (l'éosinophilie et les symptômes cliniques postulant par ailleurs en faveur de la distomatose) soit la conséquence de divers facteurs : 1) localisation erratique du parasite ; 2) absence de pontes ; 3) impossibilité d'élimination des œufs par la bile en raison de l'obstruction fortuite du canal biliaire où la *Fasciola* est logée ; 4) petite quantité d'œufs pondus, lesquels peuvent par conséquent passer inaperçus dans les fèces ou le suc duodénal ; 5) phase initiale du développement du parasite, avant la ponte, car la période prépatente de l'infection dure de deux à quatre mois ; 6) localisation du Trématode, non dans les voies biliaires, mais dans le parenchyme hépatique, d'où l'impossibilité d'élimination des œufs vers l'extérieur ; 7) élimination intermittente des œufs, d'où la possibilité d'effectuer la recherche lors d'une phase d'inhibition de la ponte.

Les circonstances ci-dessus exposées justifient la nécessité de recourir à d'autres moyens de diagnostic que la recherche des œufs dans les selles, et dans ce but des intradermo-réactions (I.D.R.), ainsi que d'autres réactions sérologiques ont été effectuées, en particulier la réaction de fixation du complément (R.F.C.).

La réaction des précipitines a été utilisée dans quelques cas, la cuti-réaction également, laquelle s'est révélée, d'après Mazzoti (1942), inférieure à l'I.D.R.

Selon les données fournies par les différents auteurs, la R.F.C. s'est montrée positive dans la plupart des cas (Minning et Vogel : trois cas, 1950 ; Lavier et Stefanopoulo : cinq cas, 1944) et rarement négative (Mohr et coll. : un cas, 1951), la positivité persistant plus de six mois après la disparition du parasite d'après Minning et Vogel. Dans nos cas, la réaction a toujours été positive chez les sujets atteints ; c'est la raison pour laquelle nous la considérons comme très valable pour le diagnostic, d'autant plus qu'elle a été systématiquement négative chez quelques individus normaux.

L'I.D.R. s'est montrée positive dans les cinq cas de Lavier et Stefanopoulo et dans quatre cas de Mohr et coll. Pour nous, la réaction réalisée à l'aide d'un extrait total de *Fasciola hepatica* s'est révélée positive chez quelques individus normaux ; aussi, nous ne la considérons pas comme suffisamment spécifique ; d'autres auteurs sont arrivés d'ailleurs à la même conclusion : Biagi et coll. (1958) par exemple.

Parmi les différents extraits de douve que nous avons utilisés dans nos essais d'I.D.R., l'extrait total, l'extrait hydrocarboné et l'extrait lipidique, le premier nous a apporté des réactions plus nettes et nous le considérons par conséquent comme supérieur aux autres. Minning et Fuhrmann (1955) ont obtenu aussi de meilleurs résultats dans la R.F.C. à l'aide de l'extrait total qu'avec les autres extraits.

La R.F.C. autant que l'I.D.R. ont donné, pour la plupart des auteurs, des résultats parfois divers (tableau I), car elles se montrèrent dans quelques cas positives chez des animaux non infectés et négatives chez des spécimens infectés ; certains auteurs ont trouvé par ailleurs des réactions positives chez des porteurs de *Dicrocoelium dendri-*

TABLEAU I

Auteur et date	Origine du sérum	Nombre	Réaction de précipitation %		Réaction de fixation du complément %		Cuti-réaction %		Intradermo-réaction %	
			Infectés	Non infectés	Infectés	Non infectés	Infectés	Non infectés	Infectés	Non infectés
Fairley y Williams, 1923	Moutons	20			70	0				
Hoffman et Ryvera, 1929	Moutons	?	92	74						
Sievers et Oyarsun, 1932	Moutons	61 39 20 15					100	0	100	0
Wagner, 1935	Agneaux	34 10 25 10 15			76	33	60	30	0	
Lavier et Stefanopoulo, 1944	Homme	5 10			100 ^(a)	0			100	0
Minning et Vogel, 1950	Homme	3			100 ^(a)					
Olivier Gonzalez et coll., 1950	Vaches	30 10					100	0		
Urquhart et coll., 1954	Lapins (expérimental)	20	100	0						
Biagi et coll., 1958	Homme	7 1.076 1.060	86	1,4-4 ^(b)					100	14-27 ^(b)
Coudert et Triozon, 1958	Homme	86							87 ^(c)	
Bailenger et coll., 1960	Homme	20 54			100					

(a) Ces résultats doivent être interprétés sous toutes réserves étant donné le nombre insuffisant de cas étudiés.

(b) Étude réalisée sur une population non discriminée.

(c) Les 4,6 % ont eu des réactions douteuses ; les 8 %, négatives.

ticum. Cependant, pour d'autres auteurs (Lavier et Stefanopoulo, 1944), les deux réactions indiquées se sont révélées suffisamment spécifiques dans les cas humains ; les divergences constatées dans les infections des animaux étaient attribuées à leur poly-parasitisme oscillant, ces infections pouvant guérir spontanément et conserver quand même leurs anticorps dans le sérum, ce qu'on a d'ailleurs constaté également chez l'homme.

On peut conclure, par conséquent, de ce qui précède, qu'on a besoin encore de nouvelles méthodes d'immuno-diagnostic à spécificité suffisante pour garantir à elles seules l'identification de la maladie.

A titre de contribution à la solution de ce problème, nous avons eu l'idée de recourir à la méthode de l'immuno-fluorescence, selon la technique décrite ci-après, car la réaction est pratiquée depuis déjà quelque temps avantageusement dans le diagnostic d'autres helminthiases, la bilharziose et la trichinose notamment.

Matériel et Méthodes

Nous avons effectué la réaction par la méthode indirecte et nous avons à cet effet utilisé des antisérums marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine obtenus de la Maison Difco, une solution tampon de phosphates de la même Maison et des sérums d'individus normaux, d'individus présumés atteints par *Fasciola hepatica* et de porteurs d'autres parasitoses (bilharziose et kyste hydatique).

Etant donné que les sérums des cas humains supposés parasités étaient peu nombreux, nous avons essayé aussi des sérums de moutons douvés et non douvés, ainsi que d'animaux atteints de kyste hydatique.

Nous avons utilisé comme antigène les miracidia du parasite obtenus à partir des œufs éliminés par la bile des moutons infectés. Dans la préparation de ces antigènes, nous avons suivi la technique décrite ci-après.

La bile a été recueillie, avec les conditions habituelles d'asepsie, dans des éprouvettes, à partir de la vésicule biliaire d'animaux récemment abattus et parasités. On laisse se former le sédiment pendant quelques minutes, puis on décante le liquide surnageant, remplacé ensuite par du sérum physiologique ; celui-ci est à son tour remplacé plusieurs fois jusqu'à ce que le sédiment soit exclusivement constitué par des œufs de *Fasciola* exempts d'impuretés.

Les produits de lavage des divers lots sont maintenus séparément dans des petits cristallisoirs de 7,5 cm de diamètre et de 3 cm de haut, remplis d'eau à un niveau de 2 cm ; ils sont conservés à diverses températures en vue d'apprécier la durée de formation des miracidia et le début de leur éclosion par l'observation quotidienne des œufs et la détermination des pourcentages d'éclosion.

On a constaté ainsi que l'éclosion s'effectuait plus précocement et plus rapidement à la température de 28°, car elle se manifestait entre le 12° et le 20° jour, qu'à la température de 18° où l'éclosion se manifestait approximativement vers la fin du premier mois et se prolongeait pendant huit à quinze jours.

A une température supérieure, le nombre des œufs dégénérés était plus grand, raison pour laquelle il est à conseiller de faire éclore les miracidia à la température ambiante.

Les miracidia formés se concentrent, grâce à leur phototropisme positif, surtout à la surface de l'eau et tout particulièrement contre les parois du cristalliseur, d'où nous les avons retirés avec une pipette Pasteur à l'aide d'une loupe de 10 diamètres et déposés dans un tube à centrifuger au fur et à mesure de leur formation. Une fois rassemblés, nous y avons ajouté du formol jusqu'à concentration finale à 10 % et les avons ensuite conservés dans une glacière à 4°.

Nous avons constaté, pourtant, que les miracidia ainsi conservés révélaient, au bout d'une semaine, une fois soumis à la réaction, une fluorescence interne, non spécifique, laquelle altérerait l'interprétation des réactions. Nous avons alors décidé de les soumettre à l'action préalable de l'albumine bovine avec rodamine que nous avons ajoutée à l'eau contenant les miracidia à une concentration finale de 1/300 ; au bout d'une heure, une addition de formol était pratiquée à la concentration déjà indiquée.

La technique utilisant la rodamine s'est montrée plus efficace, car elle semble bloquer la coloration non spécifique constatée avec les miracidia maintenus dans le formol simple, qui leur conférerait en outre une nuance rougeâtre contrastant avec la couleur jaune verdâtre du fluorochrome utilisé. De plus, elle maintient leurs propriétés antigéniques pendant au moins quatre mois, à condition de les conserver dans la glacière à 4°.

La réaction est réalisée dans des tubes de centrifugeuse de 15 ml de la façon suivante : les miracidia sont lavés d'abord dans une solution tampon de phosphates à pH 7,2, par deux fois, tout en laissant se former le dépôt pendant 15 à 20 minutes chaque fois.

Les miracidia étaient alors soumis à l'action des sérums à tester et comparés à des témoins avec un sérum normal et un sérum dont la positivité était certaine. Les sérums étaient employés immédiatement à la dilution de 1/4 et agissaient pendant une demi-heure ; d'autres essais avec d'autres dilutions étaient alors réalisés quand les premiers résultats étaient positifs.

Lavés deux fois de suite à l'aide de la solution tampon, les miracidia étaient ensuite incubés à la température ambiante, pendant 15 minutes, avec de la globuline anti-humaine ou anti-mouton, selon l'origine du sérum initialement utilisé, marquée à l'aide du fluorochrome déjà mentionné et à la dilution la plus favorable, c'est-à-dire celle ne permettant la fluorescence que sous l'action des sérums des sujets parasités et non des sérums normaux. Cette dilution, dans la plupart des cas, était de 1/6.

Deux nouveaux lavages étaient ensuite effectués avec soin à l'aide de la solution tampon de phosphates, afin d'enlever tout colorant non fixé.

Une goutte de sédiment était alors placée sur lame, montée à l'aide d'une solution tampon de glycérol et couverte d'une lamelle pour l'examen au microscope à fluorescence Zeiss à rayons ultraviolets, utilisant comme filtres d'excitation les BG 12 (I et II) pour une excitation intense en bleu violet correspondant à une longueur d'onde de 5.500 et 8.000 Å et, comme filtres d'arrêt, e 50 et 41 ou OG₄ et GG₄.

Résultats

A l'occasion de l'observation des lames, nous avons constaté que les miracidia ne présentaient pas tous de la fluorescence dans les réactions considérées comme positives, et nous avons attribué cette différence de comportement aux différences dans les valeurs antigéniques qu'ils pouvaient présenter. En effet, il faut considérer que quelques miracidia peuvent dégénérer et présenter par conséquent une structure anormale, d'où la possibilité dans ces cas de l'absence de la réaction antigène-anticorps.

Avec les sérums normaux, nous avons parfois constaté de la fluorescence sur quelques miracidia ; mais, en effectuant la dilution des sérums, on constata que cela ne se produisait pas pour des dilutions au-delà de 1/4, à l'inverse de ce qui se passait avec les sérums positifs, c'est-à-dire des sérums d'individus ou d'animaux infectés où la réaction était enregistrée toujours pour des dilutions supérieures à celle-là, au moins à 1/8 et, dans quelques cas, même 1/64.

TABLEAU II

Origine du sérum	Caractéristiques	Mir. de <i>Fasc. hépatica</i>			Mir. de <i>Sch. mansoni</i>		
		Nombre de cas	Positifs		Nombre de cas	Positifs	
			Abs.	%		Abs.	%
Mouton	Distomatose (a).	53	39 (b)	73,6			
	Kyste hydatique.	10	1	10,0			
	Normal.	30	3	10,0			
Homme	Dismatose (a).	15	12	80,0	3	0	0
	Kyste hydatique.	3	0	0,0			
	Bilharziose vésicale.	8	1 (c)	12,5	8	8	100
	Normal.	100	0	0,0	5	0	0

(a) Diagnostic clinique avec éosinophilie, réactions sérologiques et I.R.D. positives, mais recherche d'œufs dans les fèces et le suc duodéal négative.

(b) 12 faiblement positifs.

(c) Faiblement positive.

Par conséquent, et à l'occasion de l'interprétation de la réaction, nous avons considéré comme positive la fluorescence des miracidia (fig. 3), en définissant le degré de

positivité par le nombre de ceux accusant la réaction et par la dilution du sérum à laquelle la réaction avait eu lieu.

C'est ainsi qu'une réaction est fortement positive lorsque plus de 50 % de miracidia présentent de la fluorescence et que celle-ci se maintient pour des dilutions supérieures à 1/8 ; elle est faiblement positive si l'on constate une quantité de miracidia inférieure à 50 % dont la fluorescence, d'ailleurs, ne résiste pas à des dilutions supérieures à 1/8. Nous attribuons, par conséquent, une valeur diagnostique à toutes les réactions réalisées dans ces conditions.

La négativité des réactions dans les cas de distomatose est due, à notre avis, soit à la non formation d'anticorps, pour des raisons individuelles qui nous échappent et possibles d'ailleurs dans toutes les infections, soit au fait que l'individu ou l'animal

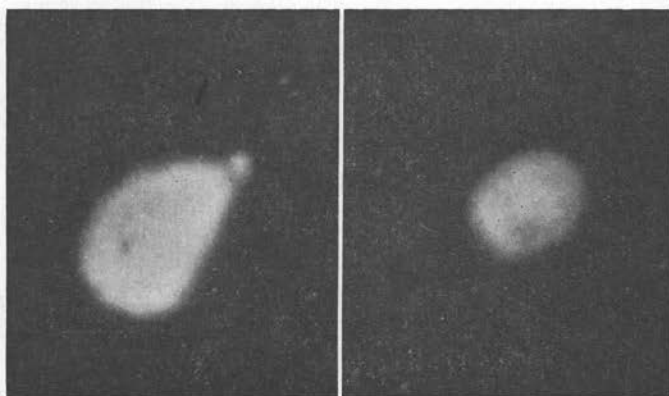


FIG. 3. — Miracidia de *Fasciola hepatica* avec fluorescence (à gauche) et sans fluorescence (à droite)

parasité présentait un tel état de déficience organique que la formation des anticorps n'était pas possible.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II, sur lequel on peut voir que sur les moutons infectés on a obtenu un pourcentage de positivité de l'ordre de 75 %, et que les réactions positives sur des animaux sans fasciolase ont été rares.

La fausse positivité constatée avec quelques-uns des sérums de moutons peut être expliquée soit parce que les animaux étaient porteurs de l'infection sans que celle-ci ait été diagnostiquée, soit parce qu'ils étaient infectés par d'autres vers apparentés, tels que, en particulier, le *Dicrocoelium dendriticum*, très fréquent chez nous.

Dans les cas humains, la réaction s'est révélée plus spécifique que chez les moutons, étant donné qu'elle ne s'est montrée faiblement positive que dans un cas de bilharziose, ce qu'on peut attribuer au degré de parenté des agents étiologiques. Toutefois, comme la bilharziose est une affection limitée à certaines aires du globe, la réaction conserve sa valeur pour la plupart des territoires. D'ailleurs, le nombre de sérums

d'individus porteurs d'autres parasites testés est trop faible pour qu'on puisse en tirer des conclusions définitives.

D'autre part, la réaction a été négative dans 95 % des cas pour des sérums d'individus normaux, et positive dans cinq cas à la dilution de 1/4 du sérum. Pourtant, l'augmentation de la dilution a entraîné la disparition de la positivité. Tous les cas s'étaient négativés à la dilution de 1/8, ce qui donne à la réaction une grande valeur spécifique.

La réaction effectuée sur onze sérums obtenus en France, par l'aimable entremise de Mlle Jacqueline Bénex, de l'Institut Pasteur de Paris, et appartenant à des individus à diagnostic de fasciolase en raison de leurs signes cliniques, R.F.C. positive et séro-agglutination par latex positive, nous a donné des résultats positifs dans 72,7 % des cas et négatifs dans 27,3 %, ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur les moutons. Ces réactions ont maintenu leur positivité avec des dilutions supérieures à 1/8, quelques-unes même jusqu'à 1/64.

Dans un de nos cas, observé postérieurement, la positivité s'est maintenue jusqu'à une dilution de 1/100.

Nous pratiquons aussi la réaction croisée, en utilisant des miracidia de *Schistosoma mansoni*, que nous maintenons en culture au laboratoire, en présence de sérums de sujets atteints de fasciolase, la réaction étant dans ce cas toujours négative.

Conclusions

Etant donné les premiers résultats obtenus, nous croyons que l'immuno-fluorescence appliquée au diagnostic de la fasciolase hépatique constitue un test intéressant aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. La méthode soulève encore bien des inconnues qu'il faudra élucider, en particulier l'influence des miracidia sur les résultats de la réaction, suivant l'espèce d'animal parasité d'où ils proviennent, d'autre part en ce qui concerne la meilleure façon d'interpréter le test d'après le nombre des miracidia présentant de la fluorescence et la dilution du sérum. En outre, il est nécessaire de réaliser un plus grand nombre de réactions avec des sérums correspondant à d'autres parasitoses afin de préciser leur spécificité ; enfin, il faudrait pouvoir comparer la valeur de cette réaction à celle d'autres tests sérologiques pour juger de leur signification dans l'orientation de la thérapeutique.

Voilà, par conséquent, une ligne de recherches à orientation intéressante, d'ailleurs en voie de réalisation dans notre laboratoire, et que nous nous permettons de recommander à tous ceux qui s'intéressent à ce genre de travaux.

Résumé

La distomatose à *Fasciola hepatica* est une parasitose cosmopolite, essentiellement des herbivores, chez lesquels elle donne lieu à des manifestations graves qui se traduisent par un dommage économique considérable. Récemment, tout particulièrement, on a décrit de nombreux cas humains partout dans le monde et au Portugal aussi, sur le continent, à Madère et dans quelques provinces d'outre-mer.

Bien que le diagnostic ait pour base la recherche des œufs du parasite dans le suc duodénal et dans les fèces, on constate souvent, dans des cas où la maladie semble prouvée cliniquement, la négativité de ces examens, d'où le recours à différents tests sérologiques qui sont aussi parfois sujets à caution.

Afin de contribuer au perfectionnement de ces méthodes de diagnostic, les auteurs ont eu l'idée de recourir à des essais sur l'immuno-fluorescence, utilisant, comme antigène, des miracidia du parasite, faciles à obtenir au laboratoire, en partant de la bile d'animaux infectés.

Les essais ont porté sur des sérums humains normaux, des sérums de porteurs d'autres parasitoses et ceux d'individus probablement parasités par *Fasciola hepatica*, ou bien encore sur des sérums de moutons normaux et de moutons atteints de kyste hydatique et de distomatose.

Etant donné les résultats obtenus, la réaction présente de l'intérêt pour le diagnostic de la fasciolose hépatique, soit par sa spécificité, soit parce qu'elle s'est révélée positive dans 74 à 80 % des cas d'infection.

(Travail du Centre d'Etudes de Médecine Tropicale de l'Instituto de Alta Cultura et de la Division des Affaires Scientifiques de la N.A.T.O.)

Bibliographie

- ALMEIDA (A. G.) e TAVARES (A. H.), 1960. — Hemobilia, fístula bílio-pleural, fasciolíase hepática. (Nota clínica). *Port. Méd.*, 44 : 330-343.
- ALVES DE CRUZ (A.). — Combate às Parasitoses do Gado no II Plano de Fomento. *A Agricultura e o II Plano de Fomento*, 158-182.
- , 1955. — Les maladies parasitaires du bétail au Portugal. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 43 ; 1-2 : 269-279.
- , 1962. — La fasciolase bovine et ovine au Portugal. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 58 : 323-335.
- BAILINGER (J.), CAILLAU (M.) et PAUTRIZEL (R.), 1960. — La distomatose. I. Etat actuel de son épidémiologie dans le Sud-Ouest de la France. *Rev. d'Hyg. et Méd. Soc.*, 8, 7 : 603-617.
- BIAGI (F. F.), TAY (J.) y PORTILLA (J.), 1958. — Valor de una Intradermo-reaccion y una reaccion de precipitacion en el diagnóstico de la fasciolosis humana. *Rev. Latino-amer de Microb.*, 1 : 69-78.
- BRUMPT (E.), 1949. — *Précis de Parasitologie*, Masson et C^{ie}, Paris.
- CARVAO GOMES (F.) e SILVA XAVIER (A.), 1956. — A propósito de un novo caso de fasciolíase hepática humana. Ensaio sobre a tecnica de fixação do complemento para diagnóstico serológico. *Ann. Inst. Med. Trop.*, 13 : 901-910.
- COUDERT (J.) et TRIOZON (F.), 1958. — Recherche sur l'épidémiologie de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica*. A propos d'une épidémie récente. *Revue d'Hyg. et Méd. Soc.*, 6, 8 : 840-864.
- CRUZ FERREIRA (F. S. DA) e FREIRE DE OLIVEIRA (C.), 1960. — A propósito de um novo caso de fasciolíase. *An. Inst. Med. Trop.*, 17 : 51-81.

- FAIRLEY (N. H.) and WILLIAMS (F. E.), 1923. — Observations on the complement fixation reaction in liver fluke (*Fasciola hepatica* L.) infection. *Jour. Path. and Bact.*, 26 : 19-26.
- FONSECA (F.) e FRAGA DE AZEVEDO (J.), 1948. — Un cas humain de fasciolase hépatique. *Ann. Par. Hum. et Comp.*, 23 : 18-22.
- , — e GAMA (M. M. DA), 1955. — Fasciolase hepática. Etiopatogenia e diagnóstico laboratorial. *O Médico*, 3 : 467-473.
- , —, —, 1965. — Nouveaux cas humains de fasciolase hépatique au Portugal. *Ann. Par. Hum. et Comp.*, 31 : 14-22.
- FONSECA (F.), GAMA (M. M.) e FRAGA DE AZEVEDO (J.), 1955. — Eosinofilia e fasciolase hepática. *O Médico*, 3 : 447-452.
- GAMA (M. M.), 1955. — Fasciolase hepática humana (Notas sobre um caso clínico). *J. Soc. Ciênc. Med.*, Lisboa, 119 : 394-397.
- HOFFMAN (N. A.) and RIVERA (T.), 1929. — The precipitin test in *Fasciola hepatica* infection. *Porto Rico Rev. Pub. Health and Trop. Med.*, 4 : 589-598. In Biagi, F. F. and als, *loc. cit.*
- KENDALL (S. B.), 1954. — Fascioliasis in Pakistan. *Ann. Trop. Med. Paras.*, 48, 3 : 307-313.
- , 1960. — Epidemiology and control of fascioliasis. *Acta Vet. Ac. Ss. Hung.*, 10, 1 : 1-12.
- and PARFITT (J. W.), 1959. — Studies on the Susceptibility of some Species of *Lymnaea* to Infection with *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *Ann. Trop. Med. Par.*, 53, 2 : 219-227.
- LAVIER (G.) et STEFANOPOULO (G.), 1944. — L'intradermo-réaction et la réaction de fixation du complément dans la distomatose humaine à *Fasciola hepatica*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 37 : 302-308.
- LEITAO (J. S.), 1961. — Fasciolase e Dicrocefase em Portugal. *Anais da Escola Superior de Medicina Veterinária, Lisboa*, 2, 2 : 17-39.
- MACEDO (G. F.), 1961. — Importância actual da fasciolase. *Bol. Serv. Saúde Pública, Lisboa*, 8, 4 : 503-510.
- MAIA, CELESTINO DA COSTA, 1951. — A propósito de cinco casos humanos de fasciolase hepática. *J. do Med.*, Lisboa, 18 : 49-66.
- MANDOUL (R.), SIGALAS (R.) et MOURGUES (R.), 1958. — Une épidémie massive de distomatose hépatique aux confins du Lot et du Lot-et-Garonne. *Journ. Méd.*, Bordeaux, 135, 7 : 665-662.
- MAZZOTTI (L.), 1942. — La cuti-reacción y la intraderma-réacción aplicada en un caso humano de *Fasciola hepatica*. *Rev. Inst. Sal. y Enf. Trop.*, México, D. F. 3 : 52-55.
- , 1948. — Aplicacion de la intradermo-reacción en casos humanos de infección por *Fasciola hepatica*. *Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop.*, México, 9 : 257-261.
- MINNING (W.) und FUHRMANN (G.), 1955. — Protein, Kohlehydrat - und Lipoid - Fraktionen von *Fasciola hepatica* als KBR - Antigene. *Zeit. f. Tropenmed. und Paras.*, 6 : 92-99.
- , and VOGEL (H.), 1950. — Immunobiologische und epidemiologische Untersuchungen bei 3 Fällen von menschlicher Fasciolose. *Ztschr. f. Tropenmed. u. Parasit.*, 1 : 532-553.
- MOHR (W.), BERKA (W.), KNUTTGEN (H.) und OHR (A.), 1952. — Das Klinische Bild der Distomatosis hepatica (*F. hepatica*) und ihre Therapie. *Med. Mona. tsschr.*, Oct., n° 10 : 676-681, 1951 ; in *Trop. Dis. Bull.*, 49, 2 : 159.

- MONTEIRO (M.), CASTRO, VASCONCELOS (H.), MACEDO (G.) e VAZ (J. M.), 1960. — Fasciolíase hepática humana. Registo de 9 casos no Norte do País. *O Médico*, 15 : 386-392.
- OLIVER-GONZALEZ (J.), RIVERA ANAYA (J. D.) e MARTINEZ DE JESÚS (J.), 1950. — Reacciones intra dérmicas en el ganado vacuno ante el antígeno obtenido de *Fasciola hepatica*. *Puerto Rico J. Pub. Health Trop. Med.*, 26, 2 : 125-128.
- OLLERENSHAW (C. B.), 1959. — The Ecology of the Liver Fluke (*Fasciola hepatica*). *The Vet. Rec.*, 71, n° 45 : 957-965.
- OLLERENSHAW (C. B.), 1958. — Climate and Liver Fluke, *Agriculture*, 65 : 231-235.
- OLLERENSHAW (C. B.) and ROWLANDS (W. T.), 1959. — A Method of Forecasting the Incidence of Fascioliasis in Anglesey. *The Vet. Rec.*, 71, n° 29 : 591-598.
- PAUTRIZEL (R.), BAILINGER (J.) et CAILLOU (M.), 1960. — La distomatose. II. Diagnostic sérologique. *Revue d'Hyg. et Méd. Soc.*, 8, 7 : 618-631.
- PAZ PEREIRA (A.), 1960. — Um novo caso de fasciolíase. *An. Inst. Med. Trop.*, 17 : 437-439.
- SERRAO (D.) e MOREIRA (A. M.), 1960. — Mais um caso de fasciolíase hepática humana no Norte de Portugal. *Bol. Ord. Med.*, IX, 867.
- SIEVERS (H. K.) et OYARZUN (R.), 1932. — Diagnostic de la distomatose hépatique par la réaction allergique. *C.R. Soc. Biol.*, 110 : 630-632.
- TAYLOR (E. L.), 1944. — The trend of British Veterinary Parasitology *Endeavour*, 3 : 150-155.
- URQUHART (G. M.), MULIGAN (W.) and JENNINGS (F. W.), 1954. — Artificial Immunity to *Fasciola hepatica* in Rabbits. I) Some Studies with Protein Antigens of *F. hepatica*. *J. Infect. Dis.*, 94 : 126-133.
- WAGNER (O.), 1935. — Hautallergie und Komplementsbildungsreaktion bei Trematodeninfektionen. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 84 : 225-237.
-