

Premiers résultats à propos du diagnostic sérologique de la bilharziose par immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *Schistosoma mansoni*

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

L'application de l'immuno-fluorescence au diagnostic sérologique des bilharzioses humaines a donné lieu à un certain nombre de travaux. Pour la plupart d'entre eux, ces travaux dérivent de la méthode originale de Sadun et Anderson utilisant un antigène figuré qui est essentiellement constitué par des miracidiums ou des cercaires de *Schistosoma mansoni*.

Comme ces éléments présentent, en lumière ultra-violette, une auto-fluorescence assez nette, il est nécessaire de les soumettre à une contre-coloration par de la Rhodamine conjuguée à de l'albumine bovine. A l'issue de cette contre-coloration, les sites antigéniques sont teintés en rouge. Ils sont alors soumis successivement à l'action du sérum étudié, pris à différentes dilutions, puis à celle d'une solution d'antiglobulines fluorescentes.

Dans ces conditions, une réaction positive se traduit par une fluorescence jauneverdâtre des miracidiums ou des cercaires. Si, au contraire, la réaction est négative, seule subsiste la coloration rouge vermillon due à la Rhodamine.

Cette méthode permet l'emploi, comme antigène, de divers stades évolutifs des Schistosomes et peut être réalisée aussi bien avec des Schistosomules ou des vers adultes qu'avec des miracidiums ou des cercaires. Les œufs sont par contre difficilement utilisables étant donné la très grande auto-fluorescence de leur coque.

Par ailleurs, la technique de Sadun présente une spécificité satisfaisante (encore que certaines réactions croisées aient pu être observées avec d'autres verminoses) et surtout une sensibilité élevée. Elle peut donc être appliquée à des enquêtes épidémiologiques grâce à l'emploi de petits disques de papier filtre qui sont imprégnés des sangs humains à étudier et, après séchage, sont adressés par la poste au laboratoire d'analyse. Enfin, cette méthode donne des résultats extrêmement nets avec des images particulièrement démonstratives.

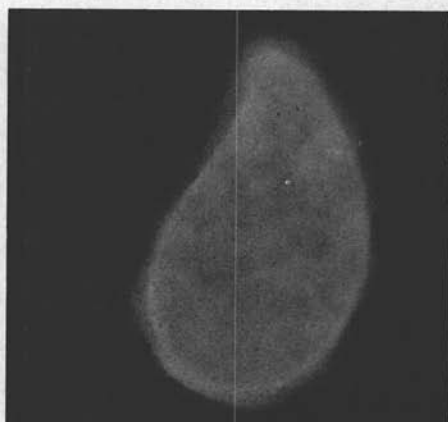
Nous-mêmes l'avons utilisée en modifiant cependant le procédé de contre-coloration que nous réalisons par le Bleu d'Evans, suivant une technique que nous avons déjà appliquée à d'autres parasitoses.

(1) Société française de Parasitologie. Réunion du 26 novembre 1966.

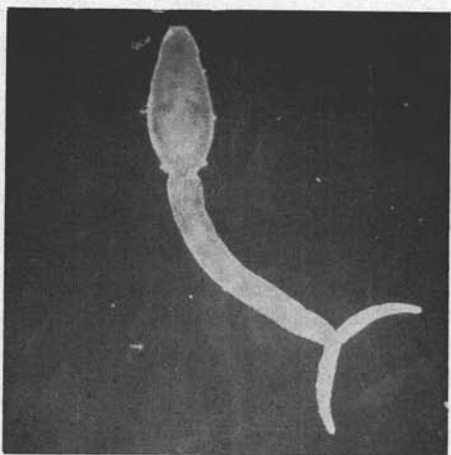
Nos résultats ont pleinement confirmé les conclusions des auteurs qui ont utilisé la méthode de Sadun et qui tous en soulignent l'élégance et la valeur diagnostique.



1



2



3



4

PHOTO 1. — *Immuno-fluorescence sur miracidium de Schistosoma mansoni. Réaction positive.* L'élément présente une vive fluorescence jaune-verte, surtout importante à la périphérie du corps parasitaire.

PHOTO 2. — *Immuno-fluorescence, réaction négative,* le miracidium garde la teinte rouge due à la contre-coloration.

PHOTO 3. — *Immuno-fluorescence sur cercaires. Réaction positive.*

PHOTO 4. — *Immuno-fluorescence sur cercaires. Réaction négative.* Noter l'importante auto-fluorescence sur l'œuf de *Schistosoma mansoni*.

Pourtant, malgré ses importants avantages, cette technique nous semble présenter des inconvénients d'ordre pratique. Ce sont surtout :

— *la longueur de la réaction* qui doit être effectuée en tube car il est impossible de fixer les cercaires ou les miracidiums sur des lames microscopiques. Comme il est nécessaire de procéder à trois séries de lavages (après l'action du sérum étudié, le temps de fixation du conjugué fluorescent et la contre-coloration), la durée totale de la réaction est relativement longue et il est difficile d'étudier à la fois plus de quelques sérums ;

— *la nécessité d'une assez grande quantité d'antigène*. Il faut en effet prévoir, pour chacune des dilutions des sérums, de vingt à cinquante formes larvaires car les diverses manipulations supposent inévitablement la perte d'un certain nombre de ces éléments en cours de réaction. Pour un sérum testé à cinq dilutions, c'est donc de 100 à 250 cercaires qui sont nécessaires et l'utilisation en routine de cette technique suppose un élevage important.

Tout ceci nous a conduit à imaginer une méthode originale d'immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *Schistosoma mansoni* adultes. Cette réaction est de réalisation rapide et simple. Elle permet en outre une économie considérable de matériel antigénique. Après en avoir précisé les modalités techniques, nous envisageons les résultats obtenus au cours d'une série préliminaire de 150 examens sérologiques.

I. Matériel et méthodes

1° L'ANTIGÈNE. — Notre souche de *Schistosoma mansoni* est entretenue sur *Australorbis glabratus* et sur souris blanches inoculées par voie intrapéritonéale ou transcutanée (200 à 250 cercaires par animal) (2).

A partir du 45^e jour suivant l'inoculation, les souris sont sacrifiées et les foies sont prélevés. On réalise alors, à partir de ces foies, des coupes à la congélation de 5 microns d'épaisseur. Ces coupes se fixent instantanément sur des lames microscopiques — par simple apposition — et cette fixation est suffisamment solide pour résister aux différents temps de la réaction d'Immuno-fluorescence.

Il est nécessaire cependant de vérifier que chaque coupe présente au moins une section transversale de Schistosomes. Cette vérification peut être assez rapidement réalisée en prélevant sur un ensemble de coupes sériées quelques échantillons qui sont observés au microscope à un faible grossissement.

Enfin, ces coupes peuvent être parfaitement conservées, pendant plusieurs mois, au congélateur à -20°C ce qui permet de préparer en une fois le matériel nécessaire à un grand nombre de réactions.

2° CONJUGUÉ FLUORESCENT. — Anti-globulines conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine. Il s'agit de produits commerciaux préparés par les laboratoires BD-Mérieux (dilution utilisée : le 1/8) ou par l'Institut Pasteur (dilution au 1/20).

(2) Nous devons à l'amabilité des P^{rs} L. Brumpt, J. Biguet et R. Pautrizel et à leurs équipes, le matériel biologique et les conseils techniques qui nous ont permis de réaliser rapidement et dans des conditions satisfaisantes l'entretien au laboratoire de cette souche de *Schistosoma mansoni*.

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 1/1,5 mm. Objectif X 10.

4° **CONTRE-COLORANT.** — Solution à 1/10.000 de Bleu d'Evans dans du tampon à pH 7,2. Une solution-mère à 1/100 peut être conservée plusieurs semaines en flacon coloré.

5° **MODE OPÉRATOIRE :**

- fixation des coupes, pendant 10 minutes, dans un bain d'acétone,
- action des diverses dilutions des sérums considérés, pendant 1/2 heure à 37° et en atmosphère humide. Pour chaque sérum les dilutions étudiées sont 1/10, 1/20, 1/40... 1/2. 560.
- Lavage dans deux bains de tampon à pH 7,2 (5 minutes chaque fois),
- action du conjugué fluorescent, dans les mêmes conditions que pour les sérums étudiés (1/2 heure à 37°),
- lavages comme précédemment,
- contre-coloration, pendant 10 minutes, dans un bain de Bleu d'Evans à 1/10.000,
- lavages,
- montages d'une lamelle sur une goutte de glycérine tamponnée à pH 7,2 et examen en microscopie ultra-violette.

TÉMOINS. — Pour chaque série de réactions on utilise un sérum positif de référence et un sérum-témoin négatif, dilués chacun au 1/10.

II. Résultats et Commentaires

1° **LECTURE DES RÉSULTATS.** La lecture des résultats est particulièrement rapide car l'emploi de coupes sériées permet de retrouver aisément le niveau où, dans chaque préparation, se situent les coupes de Schistosomes. Les images obtenues sont aussi démonstratives que celles de la technique de Sadun. En effet, grâce à la contre-coloration, le tissu hépatique est coloré en rouge et, en cas de réaction positive, les Schistosomes présentent une vive fluorescence jaune-verte (photo 5).

Au contraire, si la réaction est négative, les vers présentent la même coloration rouge que les tissus parasités avoisinants (photo 6).

Dans plusieurs séries de préparations, nous avons pu observer des sections de couples de Schistosomes au niveau desquels nous avons pu vérifier que la fluorescence des mâles et celle des femelles étaient absolument identiques, ce qui confirme la notion d'un pouvoir antigénique équivalent chez les deux sexes.

En ce qui concerne les nombreux œufs présents dans toutes les préparations, leur coque présente une auto-fluorescence jaune si intense que le Bleu d'Evans ne parvient pas à la masquer et qu'elle demeure pratiquement inchangée, que la réaction soit positive ou non (photo 7).

Par contre, la coupe permet de lire la réaction au niveau des miracidiums contenus dans les œufs, et ceci dans d'excellentes conditions de spécificité : fluorescence jaune-verte en cas de réactions positives, coloration rouge si le sérum étudié est négatif. Dans tous les cas, des réponses identiques ont été obtenues, que la lecture porte sur les miracidiums ou sur les sections de vers adultes.

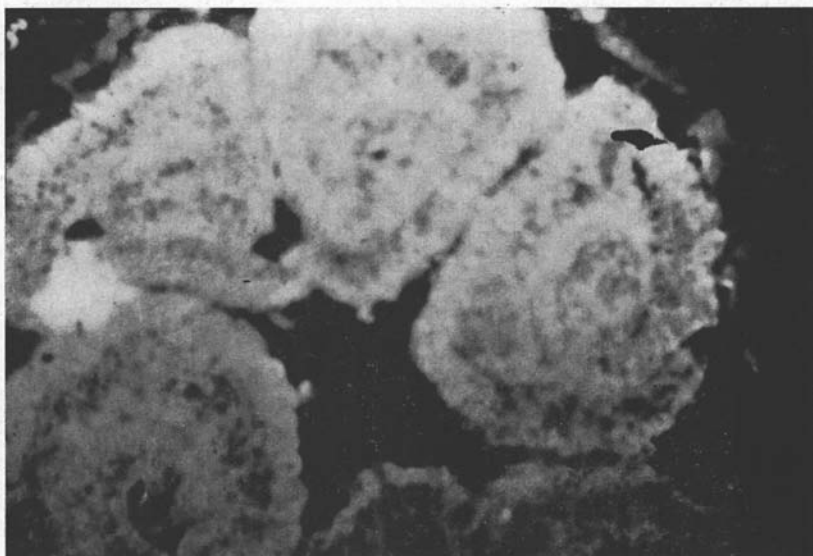


PHOTO 5. — *Immuno-fluorescence sur coupes de Schistosoma mansoni. Réaction positive.* Les sections transversales des vers présentent une fluorescence spécifique jaune-verte, tandis que, en périphérie, le tissu hépatique est coloré en rouge.

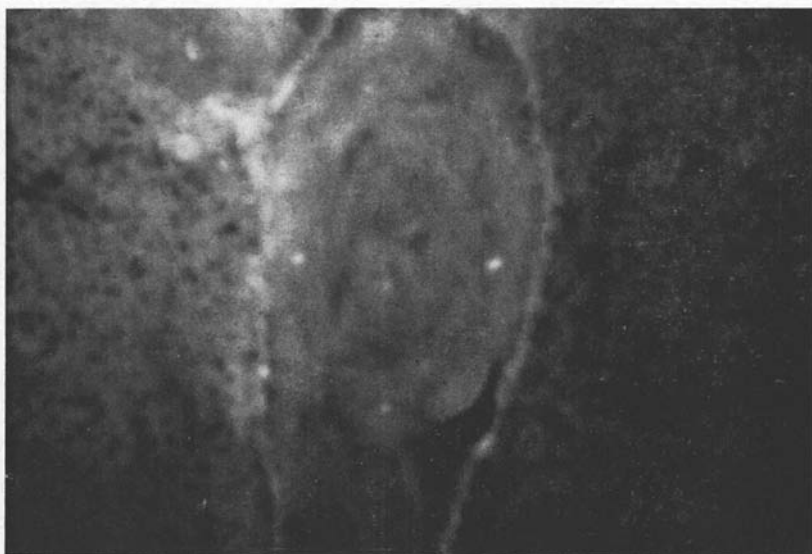


PHOTO 6. — *Immuno-fluorescence sur coupes de Schistosoma mansoni. Réaction négative.*

Enfin, en cas de réaction fortement positive, on observe une vive fluorescence jaune-verte de la zone péri-ovulaire du tissu ambiant. Elle correspond à une diffusion localisée des antigènes ovulaires ou, plus vraisemblablement, miracidiens.

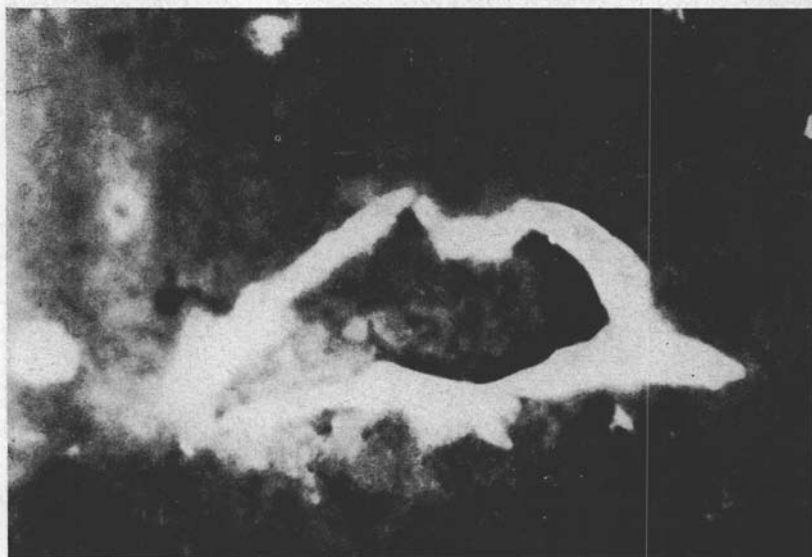


PHOTO 7. — *Immuno-fluorescence. Réaction négative.* Le miracidium présent dans l'œuf a la même teinte rouge que le reste de la préparation. Noter l'importante fluorescence, non spécifique, de la coque.

2° SPÉCIFICITÉ. La spécificité de notre technique a été vérifiée par l'analyse de 43 sérums de sujets atteints de diverses parasitoses :

- 22 Distomatoses
- 15 Kystes hydatiques
- 1 Echinococcose alvéolaire
- 1 Taeniasis (*T. saginata*)
- 1 Filariose à *Loa*
- 1 amibiase
- 1 Toxoplasmose
- 1 Candidose.

Tous ces sérums ont été trouvés *négatifs* dès la dilution initiale du 1/10°. Il semble donc que la réaction jouisse d'une grande spécificité qui est particulièrement intéressante en ce qui concerne la Distomatose avec laquelle de fréquentes réactions croisées sont observées par diverses techniques.

Cette méthode permet-elle une différenciation entre les bilharzioses à *Schistosoma mansoni* et les infections à *Schistosoma haematobium* ? Il se peut qu'il existe des

différences entre les titres observés dans l'un et l'autre cas, mais pour l'instant nous n'avons pu analyser nos cas cliniques et nous sommes encore dans l'ignorance.

3° SENSIBILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ. Nous avons disposé de 107 sérums de malades atteints de bilharzioses urinaires (47 cas), ou intestinales (60 cas), à différents stades évolutifs (3).

Outre l'immuno-fluorescence, un grand nombre de ces sérums ont été étudiés par diverses autres méthodes sérologiques : test de Vogel-Minning, fixation du complément et immuno-électrophorèse. Les documents dont nous disposons sont encore trop incomplets — et notre expérience trop limitée — pour que nous puissions établir sur des bases significatives une comparaison de ces différentes méthodes entre elles et la confrontation de leurs résultats avec les données de la clinique et des autres examens biologiques. Les seules données précises que nous puissions actuellement apporter concernent la valeur diagnostique de notre méthode d'immuno-fluorescence et son intérêt comme tests d'évolutivité. Nous avons, pour cela, indiqué dans le tableau suivant la répartition des titres obtenus dans le cas de bilharzioses évolutives ou, au contraire, d'affections anciennes.

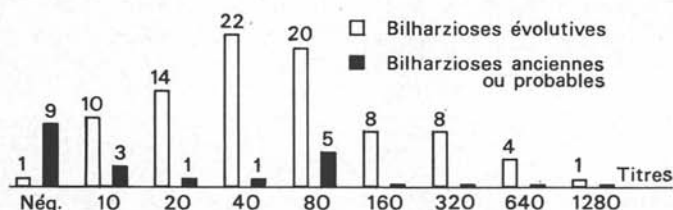


TABLEAU I. — Diagnostic sérologique de la bilharziose par immuno-fluorescence. Sensibilité et valeur diagnostique.

SUR LE PLAN DIAGNOSTIQUE, il est intéressant de noter que, sur 88 cas de bilharzioses évolutives, l'immuno-fluorescence n'a été négative qu'une seule fois chez un malade non encore traité et présentant des œufs de *Schistosoma haematobium* dans ses urines.

Ceci semble donc bien augurer de la valeur diagnostique de la méthode, surtout, si on tient compte du pourcentage important de bilharzioses urinaires qui, avant traitement, donnent des résultats négatifs avec d'autres techniques sérologiques.

Pour l'ensemble des bilharzioses évolutives, le taux moyen observé est de 120 contre 25 dans le cas d'affections anciennement traitées et guéries. L'immuno-fluorescence semble donc permettre d'apprécier, au moins dans certaines limites, l'évolutivité de l'affection. Enfin, la reproductibilité de la technique a été systématiquement recherchée au cours de plusieurs séries d'examen portant sur des sérums conservés à — 20° C. Elle semble satisfaisante puisque, dans la très grande majorité des cas, des

(3) Nous remercions les Pr^s Biguet et Capron de Lille, Lapière, Golvan, M^{lle} le Pr Ho Thi Sang et le D^r Houin de Paris, qui nous ont adressé des sérums positifs qu'ils avaient déjà analysés par d'autres techniques sérologiques.

taux identiques ont été trouvés lors d'examens successifs d'un même sérum. Lorsque des variations ont été constatées, elles n'excédaient jamais un tube de dilution.

Conclusions

Dans l'état actuel de notre expérience, la technique d'immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *Schistosoma mansoni* semble donc offrir d'intéressantes possibilités pour le diagnostic sérologique de bilharzioses. Douée d'une sensibilité assez élevée, cette réaction bénéficie d'une grande spécificité, que traduit l'absence de réactions croisées avec la Distomatose.

Surtout cette méthode nous paraît présenter d'importants avantages matériels. Elle utilise en effet un antigène facilement préparé, qui permet une économie considérable de matériel parasitaire et dont la standardisation et la conservation sont aisément réalisées.

La réaction proprement dite est assez rapide et donne des résultats particulièrement nets.

Enfin, chaque examen ne nécessitant qu'une très petite quantité de sérum, on peut envisager l'application de cette méthode à de vastes enquêtes épidémiologiques au cours desquelles les prélèvements seraient effectués, après piqûre au doigt, dans des tubes capillaires siliconés ou, suivant la technique de Sadun, sur des disques de papier filtre.

Résumé

Pour le diagnostic sérologique des bilharzioses, les auteurs proposent une nouvelle technique d'immuno-fluorescence sur coupes à la congélation de *Schistosoma mansoni*. Au cours de 150 examens sérologiques, cette méthode a montré une grande spécificité (aucune réaction croisée n'a été observée, en particulier avec la Distomatose), ainsi qu'une sensibilité élevée. De réalisation rapide, cette nouvelle réaction n'exige pour chaque examen qu'une quantité très minime de sérum. L'antigène est constitué par des coupes de foie de souris parasitées par *Schistosoma mansoni*. Facilement préparées, ces coupes peuvent être conservées plusieurs mois au congélateur à -20° C et, à partir d'un foie parasité, il est possible d'étudier plusieurs centaines de sérums pris chacun à plusieurs dilutions. Cette méthode permet donc une économie considérable de matériel parasitaire.

Bibliographie

1. AMBROISE-THOMAS (P.), GARIN (J.-P.) et RIGAUD (A.), 1966. — Amélioration de la technique d'immuno-fluorescence par l'emploi de contre-colorants. Applications aux Toxoplasmes. *La Presse Médicale*, 74 : 2215-2216.
2. ANDERSON (R. I.), SADUN (E. H.) et WILLIAMS (J. S.), 1961. — A technic for the use of a minute amounts of dried bloods in the fluorescent antibody test for schistosomiasis. *Exp. Parasit.*, 11 : 111-116.

3. BUCK (A. A.), SADUN (E. H.), ANDERSON (R. I.) et SHAFFA (E.), 1964. — Comparative studies of some immunologic screening tests for schistosomiasis in Ethiopia. *Am. J. Hyg.*, 80 : 75-85.
4. CAMARGO (M. E.), HOSHINO (S.) et CAETANO DA SILVA (L.), 1965. — A slide fluorescent antibodies technique with adult worm antigen for the serological diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Rev. Instit. Med. Trop. São Paulo*, 7 : 327-331.
5. COOKSON (L. O. C.), 1964. — Some modifications of the fluorescent antibody test in human bilharziasis. *Bull. Org. Mond. Santé*, 31 : 799-813.
6. —, CLARKE (V.) et PIRIE (E.), 1963. — Some investigations with the fluorescent antibody technique. I. Schistosomiasis. *Central African J. Med.*, 9 : 429-434.
7. FOSTER (R.), 1965. — Skin antigen tests and the fluorescent antibody technique in the diagnosis of schistosomiasis. *C. Afr. Med.*, 42 : 117-121.
8. GANE (N. F. C.), HUNT (A. L. C.) et BOOTH (R. L.), 1964. — Some aspects of the fluorescent antibody test for bilharziasis. *Central African J. Med.*, 10 : 407-410.
9. JAIMES (S.) et LICHTENBERG (F. V.), 1965. — Host response to eggs of *Schistosoma mansoni*. IV. Fluorescent antibody titers in mice infested with normal cercariae, gamma irradiated cercariae and with purified eggs. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 14 : 727-735.
10. KAGAN (I. G.), SULZER (A. J.) et CARVER (K.), 1965. — An evaluation of the fluorescent antibody test for the diagnosis of schistosomiasis. *Amer. J. Epidemiol.*, 81 : 63-73.
11. MAGALHARS (A.), KRUPP (I. M.) et MALEK (E. A.), 1965. — Localisation an antigen and presence of antibodies in tissues of mice infected with *Schistosoma mansoni* as indicated by fluorescent antibody technics. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 14 : 84-99.
12. PELLEGRINO (J.), 1963. — Diagnostico serologico da esquistossomose mansonica. I. Estudo comparativo entre las reacoes de fluoculacao, de immunofluorescencia e de fixacao do complemento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5 : 147-153.
13. — et BIOCCA (E.), 1963. — Diagnostico serologico da esquistossome mansonica. II. Reacao de immunofluorescencia con cercarias de *Schistosoma bovis* e *Cercaria caratini-guensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5 : 257-260.
14. RIVERA DE SALA, MENENDEZ-CORRADA et RODRIGUEZ-MOLINA, 1962. — Detection of circumoval precipitins by fluorescent-antibody technic. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111 : 212-215.
15. SADUN (E. H.), WILLIAMS (J. S.) et ANDERSON (R. I.), 1960. — Fluorescent antibody technic for sero-diagnosis of schistosomiasis in human. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.)*, 105 : 289-291.
16. —, ANDERSON (R. I.) et WILLIAMS (J. S.), 1961. — Fluorescent antibody test for the laboratory diagnosis of Schistosomiasis in human using dried blood smears on filter paper. *Exp. Parasit.*, 117-120.
17. — et BIOCCA (E.), 1962. — Intradermal and fluorescent antibody test on human exposed to *Schistosoma bovis* cercariae from Sardinia. *Bull. Org. Mond. Santé*, 27 : 810-814.
18. —, WILLIAMS (J. S.) et ANDERSON (R. I.), 1962. — The nature of fluorescent antibody reaction in infections and artificial immunization with *Schistosoma mansoni*. *Bull. Org. Mond. Santé*, 27 : 151-159.

19. —, ANDERSON (R. I.), DE WITT (W. B.) et JACHOWSKI (L. A.), 1963. — Serologic reactions to *Schistosoma mansoni*. II. Quantitative studies in human patients treated with Stibophen. *Am. J. Hyg.*, 77 : 146-149.
20. SATO (S.), IMAMURA (S.) et YONEYAMA (K.), 1964. — Fluorescent antibody studies of *Schistosoma japonicum* infections. *Gunna J. Med. Sci.* 13 : 199-205.

*(Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Exotique
de la Faculté de Médecine de Lyon)*
