

INTÉRÊT ET LIMITES DU DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE DE L'AMIBIASE EN 2004

A. MERENS, C. RAPP, R. FABRE, J-D CAVALLO

Med Trop 2005 ; 65 : 167-175

RÉSUMÉ • L'amibiase ou amoebiose est due à une amibe hématophage et cytotoxique, *Entamoeba histolytica* qui doit être différenciée de *Entamoeba dispar*, espèce non pathogène, saprophyte du tube digestif, mais morphologiquement identique à *E. histolytica*. Dans le diagnostic de l'amibiase intestinale, l'examen parasitologique des selles par microscopie optique devrait désormais être systématiquement associé à une technique permettant de différencier ces deux espèces. La technique de référence par culture puis électrophorèse des isoenzymes n'est pas applicable en routine. La recherche d'antigènes spécifiques d'*E. histolytica* dans les selles, sensible et rapide, est la technique de choix. La PCR sur prélèvement de selles, très sensible et spécifique est peu adaptée aux conditions économiques des pays de haute endémicité. L'intérêt de la sérologie pour différencier les deux espèces est discuté. A l'opposé, dans l'amibiase tissulaire, le diagnostic de certitude repose toujours sur la sérologie. La recherche d'antigènes circulants Gal/GalNac sur sérum, positive dans 96 % des cas d'amibiase hépatique avant traitement, pourrait, dans le futur, permettre de porter le diagnostic chez les patients pris en charge précocement et n'ayant pas encore d'anticorps sériques détectables.

MOTS-CLÉS • Amibiase - *E. histolytica* - *E. dispar* - Coproantigènes - PCR.

UTILITY AND LIMITATIONS OF LABORATORY DIAGNOSIS OF AMEBIASIS

ABSTRACT • *Entamoeba histolytica* is an invasive and pathogenic protozoan parasite that causes amebiasis. It must be distinguished from *Entamoeba dispar*, a nonpathogenic commensal parasite of the human gut lumen that is morphologically identical to *Entamoeba histolytica*. Diagnosis of amoebic colitis currently requires combination of microscopic examination of stool specimens with another technique allowing positive identification of the two species. Stool culture followed by zymoderm analysis is considered as gold standard but is not applicable in routine practice. Detection of specific *Entamoeba histolytica* antigens in stools is a fast, sensitive technique that should be considered as the method of choice. Stool PCR is a highly sensitive and specific technique but high cost make it unsuitable for use in endemic areas where economic conditions are difficult. The utility of serologic tests in distinguishing *Entamoeba dispar* from *Entamoeba histolytica* is controversial. However serology is still considered as the method of choice for diagnosis of extraintestinal amebiasis. Circulating Gal/GalNac lectin antigens can be detected in the serum of 96% of patients with untreated amoebic liver abscess. In the future this method should allow early diagnosis and treatment of extraintestinal amoebiasis in patients who have not yet developed detectable serum antibodies

KEY WORDS • Amebiasis - *E. histolytica* - *E. dispar* - Antigen stool detection - PCR.

Avec environ 50 millions de cas d'amibiase invasive et 40 000 à 100 000 décès par an, l'amibiase ou amoebiose est la seconde cause de mortalité par infection parasitaire à travers le monde, après le paludisme (1,2). Près de 500 millions de personnes, soit 10 % de la population mondiale, sont porteuses de kystes du complexe *E. histolytica* / *E. dispar* (2-

5). La majorité sont en fait porteurs de kystes d'*E. dispar*, espèce non pathogène, morphologiquement identique à *E. histolytica* et ne pouvant en être différenciée lors de l'examen microscopique. En 1997, l'OMS a souligné la nécessité de distinguer *E. histolytica* d'*E. dispar* à l'aide de tests rapides et simples (6) afin de permettre, notamment dans les pays de haute endémicité, d'éviter les traitements inutiles, de diminuer les diagnostics par excès d'amibiase intestinale et de réorienter le clinicien vers d'autres causes de diarrhées qui pourraient être sous-estimées. La recherche d'antigènes parasitaires dans les selles et la PCR sont des techniques récentes susceptibles de remplir ces objectifs. Leur place dans la stratégie diagnostique de l'amibiase doit être discutée au regard des critères de faisabilité et de coût. Cette stratégie peut varier en fonction du lieu d'exercice : zone intertropicale ou pays industrialisés.

- Travail du Service de biologie médicale (A.M., Médecin, Assistante des hôpitaux des armées; R.F., Médecin en chef, spécialiste des Hôpitaux des Armées; J.D.C., Médecin en chef, Professeur agrégé du Service de santé des armées) Hôpital d'instruction des armées Bégin, Saint Mandé et du Service de maladies infectieuses et tropicales (C.R., Médecin principal, spécialiste des hôpitaux des armées) Hôpital d'instruction des armées Bégin, 94163 - Saint Mandé Cedex.
- Correspondance : A. MERENS, Laboratoire de biologie, HIA Bégin, 69 avenue de Paris, 94160 Saint-Mandé •
- Courriel : Merens-a@wanadoo.fr • hiabegin-biologie@wordonline.fr •
- Article reçu le 6/12/2004, définitivement accepté le 12/04/2005.

E. HISTOLYTICA ET E. DISPAR : DEUX ESPÈCES DISTINCTES MAIS MORPHOLOGIQUEMENT IDENTIQUES.

Entamoeba histolytica

E. histolytica, initialement décrite en 1875 sous le nom de *Amoeba coli* par Lösch au cours d'un cas de dysenterie mortelle, a pris sa dénomination actuelle en 1903 (2,7). Cette amibe présente deux formes morphologiques correspondant à des caractères de virulence différents.

La forme *minuta*, qu'elle soit sous forme végétative (trophozoïte) ou kystique, ne provoque pas de pathologie. Les kystes sont transmis à l'homme par ingestion à partir d'un contact direct (mains sales) ou indirect (eau de boisson, crudités) : la contamination est typiquement liée au péril fécal. Le portage chronique de ces kystes intraluminaux définit « l'amibiase infestation » ou portage asymptomatique.

La forme responsable de « l'amibiase maladie » est la forme végétative hématophage *histolytica*, caractérisée par son potentiel invasif et cytotoxique (1, 7-11). Les facteurs de régulation complexes déterminant le passage de la forme *minuta* à la forme hématophage *histolytica* ne sont pas encore parfaitement connus. Ils sont liés au parasite lui-même, à l'interaction avec la flore bactérienne digestive ainsi qu'à l'immunité de l'hôte, acquise ou innée (3, 5).

Le terme d'amibiase intestinale regroupe trois tableaux cliniques : l'amibiase intestinale aiguë ou dysenterie amibienne, l'amoebome, et la colite chronique post-amibienne qui est une entité plus controversée. Les localisations extra-intestinales, qui peuvent engager le pronostic vital, sont essentiellement représentées par l'amibiase hépatique (90%), beaucoup plus rarement par des localisations pleuro-pulmonaires et exceptionnellement par des localisations cardiaques, cérébrales ou cutanées.

Entamoeba dispar

Dès 1925, Brumpt avançait l'hypothèse de l'existence d'une espèce distincte, morphologiquement identique à *E. histolytica* mais non pathogène. Il la nomma *E. dispar* (12). Dans les années 1970, l'étude des profils électrophorétiques des isoenzymes sécrétées par ces amibes a permis de définir 23 zymodèmes grâce à l'étude de 6 enzymes différentes. D'emblée, il avait été remarqué que certains zymodèmes, dits « non pathogènes », étaient toujours associés à un portage asymptomatique, alors que 9 autres (contenant une hexokinase et une phosphoglucomutase) étaient toujours associés à une amibiase clinique (13). Des études immunologiques ont

ensuite démontré que l'adhésine d'*E. histolytica*, la galactose lectine (Gal/GalNac), est très différente de celle d'*E. dispar* (14-16). Cette lectine est un hétéro-dimère de 260 kDa dont la sous-unité de 170 kDa, particulièrement immunogène, comporte, chez *E. histolytica*, 6 épitopes. Les souches non pathogènes n'expriment que 2 épitopes sur les 6 (16). Cette constatation a été largement utilisée par la suite pour la mise au point des tests immunologiques permettant de différencier les deux espèces. Enfin, les progrès en biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence des différences de séquence au niveau du gène de l'ARN ribosomal et d'autres gènes hautement conservés entre les souches pathogènes et les souches non pathogènes (17-19). Devant cette accumulation d'arguments, l'existence de deux espèces distinctes, *E. histolytica* et *E. dispar*, a été reconnue par le comité d'expertise de l'OMS sur l'amibiase, réuni à Mexico en 1997 (6, 20-21).

Prévalences respectives de *E. histolytica* et *E. dispar* (Tableau I)

Les études épidémiologiques utilisant des techniques permettant de différencier ces deux espèces (zymodèmes, recherche d'antigènes et PCR spécifiques), révèlent que la prévalence mondiale du portage d'*E. dispar* serait quatre à dix fois plus importante que celle du portage d'*E. histolytica* (1-3,22-30), avec quelques exceptions, comme en Egypte (22,23) ou dans certaines régions du Brésil (24).

TECHNIQUES DIAGNOSTIQUES

Diagnostic microscopique

L'observation d'amibes hématophages mobiles à l'état frais reste un examen incontournable dans le diagnostic de l'amibiase intestinale aiguë mais sa sensibilité varie en fonction de divers facteurs (30-33) :

- le délai entre l'exonération et l'examen microscopique : les formes végétatives d'amibes, très fragiles, résistent moins d'une heure au froid ou à la dessiccation. Elles s'immobilisent en 30 minutes puis se lysent. Classiquement, le prélèvement doit être réalisé au laboratoire ou à défaut, le biologiste devra être prévenu de la recherche spécifique d'amibes afin de traiter l'échantillon le plus rapidement possible. Si la selle ne peut être examinée rapidement, elle devra être conservée à 4°C, ce qui permettrait de prolonger la mobilité des trophozoïtes jusqu'à 4 heures (2) ;

- la recherche d'amibes à partir de glaires ou de mucus sur selles dysentériques améliore considérablement la sen-

Tableau I - Prévalences respectives du portage d'*E. dispar* et *E. histolytica* (1, 22-27).

Population : Sujets asymptomatiques	Effectif de l'étude	Prévalence du portage d' <i>E. dispar</i>	Prévalence du portage d' <i>E. histolytica</i>
Afrique du Sud	1381	9%	1%
Bengladesh	1872	12 %	5%
Brésil	564	9%	11%
Egypte	182	24%	21%
Grèce	322	8%	<1%
Philippines	1872	7%	1%

sibilité de l'examen ;

- l'émission de parasites pouvant être discontinue, les examens doivent être répétés en cas de négativité (30,35). L'examen de 3 échantillons de selles successifs, prélevés sur 4 à 5 jours améliore la sensibilité du diagnostic (34) ;



Figure 1 - Trophozoïte mobile d'*Entamoeba histolytica* à l'état frais.

- l'expérience de l'observateur est très importante.

Malgré toutes ces précautions, la sensibilité de l'examen direct à l'état frais varie selon les auteurs de 25 à 96 % (1,30,33). Sur des selles dysentériques, elle peut atteindre plus de 90% avec des observateurs entraînés (33). En zone endémique, deux études récentes au Bangladesh et aux Philippines ont montré une sensibilité de 60 % sur des selles diarrhéiques, par rapport à la culture (27, 32).

Le traitement du prélèvement au laboratoire s'effectue en trois temps :

- un examen à l'état frais, entre lame et lamelle, à la recherche de formes mobiles hématophages de *E. histolytica* : la mobilité du trophozoïte est un caractère important qui permet de différencier les formes végétatives des artéfacts (macrophages ayant phagocyté des hématies) et des autres amibes. Cette mobilité particulière, unidirectionnelle, s'effectue par émission de pseudopodes hyalins transparents. Le noyau est caractérisé par une membrane nucléaire fine tapissée de fins grains de chromatine, par un caryosome punctiforme et central (Fig. 1). La présence d'hématies dans le cytoplasme des amibes signe le caractère hématophage ;

- un examen après coloration : les colorations les plus utilisées sont le Lugol, l'Acide polyvinyle Trichrome et le Merthiolate Iode Formol (MIF) (5, 32). Elles permettent une meilleure étude morphologique du noyau et du cytoplasme des formes végétatives et des kystes ;

- deux techniques de concentration (par exemple méthode de Bailanger ou MIF concentration ou Ritchie modifiée) permettant de concentrer les formes kystiques, mais détruisant malheureusement les formes végétatives. Les kystes mesurent de 12 à 14 µm et contiennent un, deux ou quatre noyaux ronds : il est impossible de différencier les kystes d'*E. dispar* des kystes d'*E. histolytica*.

Culture

Considérée comme la technique de référence, elle nécessite des cultures xéniques sur milieux spéciaux, de type milieu de Robinson ou milieu TYSGM-9 de Diamond ou des cultures axéniques (en l'absence de bactéries) sur milieu TYI-S-53 (36). Elle n'est pratiquée que dans de rares laboratoires spécialisés et nécessite 4 jours. Le rendement dépend de la quantité de parasites ensemencés mais sa sensibilité est supérieure à l'examen direct (37-38). Son principal avantage est de permettre à l'issue la réalisation d'électrophorèse des isoenzymes et donc de différencier les deux espèces du com-

plexe *E. dispar/E. histolytica*.

Anatomopathologie

La rectosigmoïdoscopie permet de visualiser une muqueuse colique inflammatoire, présentant des ulcérations en coup d'ongles voire en carte de géographie. Quand cela est possible, il est préférable de pratiquer une coloscopie, afin de visualiser le caecum et le colon ascendant qui sont des sièges classiques d'amibiase colique (39). Les amibes peuvent être observées sur des biopsies, prélevées en périphérie des lésions ou sur des spongiobiopsies. Il

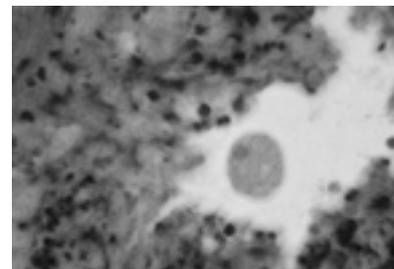


Figure 2 - Coupe anatomopathologique de biopsie colique, coloration PAS, objectif x40. Présence d'une forme végétative d'*E. histolytica*.

Il existe des lésions ulcérées avec un exsudat majeur, un afflux de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes. Les trophozoïtes peuvent être observés au niveau de l'exsudat, de la sous-muqueuse, de la musculuse, voire des vaisseaux sanguins. Ils sont repérés facilement au faible grossissement sur les coupes colorées par le PAS (Periodic Acid-Schiff) car leur cytoplasme, riche en glycogène, est coloré en rose vif (Fig. 2). La coloration HE (Hemalun Eosin) permet de visualiser la fine membrane nucléaire, le caryosome central, et les vacuoles cytoplasmiques. Les hématies éventuellement présentes dans le cytoplasme sont bien visibles sur les coupes colorées au Giemsa (40).

Mise en évidence d'antigènes parasitaires

• Au niveau d'un échantillon de selles

Des techniques immunoenzymatiques de type ELISA permettent de rechercher dans les selles des antigènes spécifiques de l'espèce *E. histolytica* (coproantigènes). Ce sont des techniques simples, rapides, standardisées, moins dépendantes de l'expérience du technicien que l'examen microscopique. Elles ont une sensibilité supérieure à celle de l'examen microscopique et permettent de différencier *E. histolytica* d'*E. dispar*. Cependant, elles ne permettent pas de définir le stade du parasite présent : kyste ou forme végétative. Le kit commercialisé le plus intéressant (41-43) est basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-adhésine d'*E. histolytica* (44). Cet anticorps est spécifique d'un des quatre épitopes de la galactose-lectine présents chez *E. histolytica* et absents chez *E. dispar*. En 1998, à partir de selles diarrhéiques de 98 patients du Bangladesh, et en prenant comme étalon la culture sur milieu de Robinson et l'étude des isoenzymes, Haque retrouvait une sensibilité de 85 % et une spécificité de 99 % pour la recherche de coproantigènes à l'aide du kit ELISA *Entamoebahistolytica* (laboratoires TechLab) (45). En 2000, lors d'une étude réalisée à partir de prélèvements de selles de 1164 enfants asymptomatiques au Bangladesh, la sensibilité du kit ELISA d'immuno-capture

de deuxième génération (Kit *E. histolytica* II, laboratoires TechLab) avoisinait les 100 % (46). Ces excellents résultats n'ont pas été confirmés dans une étude en zone de faible endémie : au Canada, en 2003, la sensibilité de ce kit ainsi que sa VPN semblaient plus faibles (0,68 vs 0,84 pour la microscopie), mais la méthodologie des deux études étaient différentes (47). Au Canada, les expériences ont été réalisées à partir de selles moulées, dont certaines avaient été préalablement formolées : une répartition inégale de l'antigène au sein de l'échantillon de selles pourrait expliquer cette sensibilité plus faible (47). Cependant, la majorité des auteurs s'accordent sur les très bonnes sensibilité et spécificité de cette recherche d'antigènes spécifiques pratiquée sur selles diarrhéiques fraîchement émises (1,3).

• *Sur sérum*

Avec le kit *E. histolytica* II, la présence d'antigènes circulants est retrouvée chez 96 % des patients atteints d'abcès amibiens hépatiques avant traitement, et chez 56 % des patients ayant déjà bénéficié de métronidazole (46). Le test se négative en une semaine chez 82 % des patients traités par métronidazole.

• *Sur pus de drainage*

La sensibilité de ce même kit évaluée sur 42 échantillons de pus de patients atteints d'abcès hépatique amibien est de 97,6 % (48).

En France, le seul kit de recherche d'antigènes actuellement commercialisé est le kit *E. histolytica* II, fabriqué par

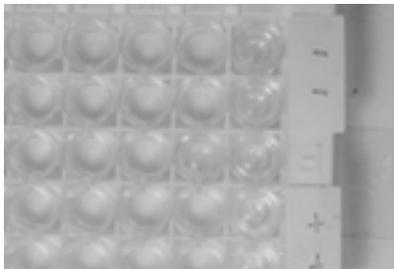


Figure 3 - Recherche d'antigènes spécifiques Gal/GalNac dans les selles par test ELISA sur plaque (Laboratoire Techlab, distribué par laboratoire Fumouze).

les laboratoires TechLab et distribué par les laboratoires Fumouze (Fig. 3). Son utilisation n'est actuellement validée que pour la recherche de coproantigènes. Il doit être utilisé sur selles fraîches, conservées 48 h maximum à 4°C, ou congelées à -20°C.

La conservation dans du formol 10 %, du SAF (acétate de sodium, acide acétique, formol) ou PVA (alcool polyvinylique) doit être évitée.

Mise en évidence du génome du parasite par amplification génique

La PCR est réalisable sur échantillon de selles congelées ou éventuellement réfrigérées. La sensibilité de la PCR décroît au-delà d'une conservation de plus de 4 jours à + 4°C (47). La fixation des selles par le formol, le MIF ou le SAF gêne l'extraction de l'ADN (49,50). Cette interférence avec les fixateurs est proportionnelle à leur concentration et au temps d'exposition. Un délai de 7 jours entre une fixation et la réalisation de la PCR ne semble pas altérer les performances de la PCR, mais

une fixation prolongée doit être évitée (50). La cible d'amplification la plus utilisée en PCR est un fragment d'ADN circulaire extrachromosomique codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal. En fonction des amorces choisies, on amplifie soit un produit de 870 pb (42) soit un amplicon plus petit, de 135 pb (47). Cette deuxième technique semble plus sensible (50). La PCR nichée (45) permet d'augmenter la sensibilité, mais allonge la durée de l'examen. Blessmann rapporte une technique de PCR en temps réel permettant d'amplifier un fragment de 310 pb de l'ADN ribosomal (51) et de différencier facilement *E. histolytica* d'*E. dispar*. La détection est effectuée grâce à deux sondes fluorescentes, dont l'émission de fluorescence est analysée au fur et à mesure des cycles d'amplification, au sein du thermocycleur. On s'affranchit donc de l'étape de transfert et migration sur gel, parfois longue et délicate. La PCR en temps réel permet d'assurer une excellente sensibilité avec un seuil de détection de l'ordre d'1 parasite par gramme de selles et une excellente spécificité, tout en simplifiant la technique et en accélérant le rendu des résultats. Trente échantillons peuvent être testés en une heure (51). En utilisant comme référence la culture, la PCR apparaît plus sensible que la recherche d'antigènes par méthode ELISA (92 % vs 80%). Par rapport à la culture, la concordance entre la PCR et l'ELISA est estimée, selon les études à 85 -93%. Pour certains auteurs, la PCR en temps réel serait même plus sensible que la culture (50,51).

Cependant, il n'existe pas de kit standardisé et commercialisé. La PCR n'est pas disponible dans tous les laboratoires, a fortiori dans les pays en développement. En dehors des problèmes de la conservation des selles et de l'extraction, la présence possible d'inhibiteurs dans les selles peut gêner la phase d'amplification avec un risque de faux négatifs, ce qui nécessite l'utilisation systématique d'un contrôle d'amplification interne. Par ailleurs, le risque de faux positifs par contamination doit être maîtrisé par un respect strict des bonnes pratiques de PCR.

Diagnostic indirect

La sérologie repose sur la mise en évidence dans le sérum d'IgG spécifiques d'*E. histolytica*. La nomenclature des actes médicaux recommande un dépistage à l'aide de deux techniques parmi les suivantes (agglutination de particules de latex, hémagglutination indirecte, méthode immunoenzymatique ou immunofluorescence indirecte). En cas de résultat positif, un test de confirmation de type co-électrophorèse ou immunoelectrophorèse est recommandé. Ces méthodes de confirmation, très spécifiques, ne fournissent qu'un résultat qualitatif. Du fait de l'absence de trousse commercialisées et de leur longueur, elles ne sont pratiquées que dans des laboratoires spécialisés.

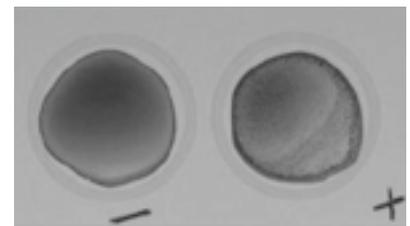


Figure 4 - Test sérologique rapide de détection d'anticorps circulants dans l'amibiase hépatique par agglutination de particules de latex (Bichro-latex®, Fumouze).

Les méthodes de dépistage, disponibles sous forme de kits commercialisés, sont considérées comme très sensibles dans les améoboses invasives (1,3,52-56). L'intérêt du test d'agglutination de particules de latex sensibilisées par l'antigène total *E. histolytica* dans le diagnostic d'urgence des amébiases hépatiques doit être souligné (Fig. 4). Il s'agit d'un test semi-quantitatif de dépistage, simple et très rapide (5 minutes), pouvant être disponible dans tous les laboratoires en France. Il présente, dans les localisations extra-intestinales de l'amébiase, une bonne sensibilité (90 %) et une bonne spécificité (95%). Sa valeur prédictive positive est de l'ordre de 85%, alors que sa valeur prédictive négative est proche de 100 % (56).

Alors que le portage de kystes d'*E. dispar* n'entraîne pas d'apparition d'anticorps sériques (1,2), le portage asymptomatique d'*E. histolytica* serait responsable d'une séroconversion dans 25 à 45 % des cas, avec des titres modérés. De plus, 70 % des amébiases coliques s'accompagneraient de taux significatifs d'anticorps circulants (5,39). En 1997, à défaut d'autres techniques disponibles en routine à l'époque, l'OMS préconisait d'utiliser la sérologie pour différencier *E. dispar* de *E. histolytica* :

- chez un sujet asymptomatique porteurs de kystes : lorsque *E. histolytica* ne peut être formellement identifiée, sa présence doit être suspectée si des anticorps sériques spécifiques sont retrouvés ;

- chez un sujet symptomatique : la présence d'anticorps sériques à titre élevé est fortement corrélée à l'amébiase invasive (6).

Avec l'arrivée des kits de recherche de coproantigènes, cette indication est appelée à diminuer. L'interprétation de la sérologie de l'amébiase est en effet parfois difficile, en raison de la persistance prolongée des anticorps sériques détectables (plusieurs années) : les cicatrices sérologiques sont donc fréquentes en pays de haute endémicité, où la séroprévalence peut atteindre 25 à 50 %, mais aussi chez les migrants et les grands voyageurs.

LES STRATÉGIES DIAGNOSTIQUES

Découverte de kystes chez un sujet asymptomatique

La découverte de kystes du complexe *E. histolytica* / *E. dispar* en microscopie optique chez un sujet asymptomatique impose de différencier *E. dispar* et *E. histolytica*. Dans cette indication, du fait de son plus faible coût, de sa rapidité et de sa simplicité, la recherche de coproantigènes

par ELISA trouve une place de choix, notamment en zone endémique. En dépit de ses excellentes performances, la PCR reste réservée aux centres spécialisés. Le portage d'*E. dispar* ne nécessite aucun traitement (6), ni restriction d'aptitude pour le personnel de l'alimentation. Le portage de kystes d'*E. histolytica* justifie un traitement par améobocides de contact, afin d'éviter le passage à une forme invasive et de prévenir la contamination de l'entourage par transmission féco-orale (3).

Amébiase intestinale aiguë

Une amébiase intestinale aiguë doit être évoquée chez tout sujet présentant un syndrome dysentérique non fébrile associant diarrhées glairo-sanglantes, faux besoins, épreintes, ténesmes (39, 58) ou devant un tableau plus frustré de diarrhées modérées, d'installation progressive. L'anamnèse retrouve le plus souvent la notion de séjour en zone d'endémie. Plusieurs situations peuvent être envisagées.

- Il existe, au sein de selles fraîchement émises ou de mucus recueilli par écouvillonnage rectal, des formes mobiles hématophages d'*E. histolytica* : leur présence permet d'affirmer le diagnostic d'amébiase intestinale aiguë.

- La microscopie retrouve seulement des kystes ou des formes végétatives non hématophages : il est alors nécessaire, selon les recommandations de l'OMS, de différencier *E. histolytica* de *E. dispar*. Parmi les quatre techniques disponibles (coproantigènes, PCR, culture/zymodèmes, sérologie), la recherche de coproantigènes par ELISA semble la technique la plus simple, la plus rapide et la moins coûteuse. La PCR et la culture restent réservées aux centres spécialisés. Malgré sa faible valeur prédictive positive en zone d'hyperendémicité, la sérologie reste un complément diagnostique utile dans les pays où les kits ELISA de recherche de coproantigènes ne sont pas encore très répandus. En revanche, dans les pays industrialisés, la recherche d'antigènes dans les selles doit être privilégiée.

Si la recherche d'antigène est positive, les parasites observés appartiennent à l'espèce *E. histolytica* : le patient doit être considéré comme atteint d'une amébiase intestinale et traité. Si cette recherche d'antigènes dans les selles est négative, il convient de réaliser une rectosigmoïdoscopie. Une autre cause de colite doit être recherchée (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile*, colite inflammatoire plus rarement schistosomiase ou balantidiose). Un algorithme décisionnel, basé sur les performances des différentes méthodes diagnostiques (Tableau II) et leur praticabilité, peut ainsi être proposé (Fig. 5).

Tableau II - Performances des examens biologiques dans l'amébiase intestinale aiguë, comparés à la culture et étude des iso-enzymes comme technique de référence.

Techniques	Sensibilité	Spécificité
Examen microscopique des selles	25 à 96 %*	10-90%*
Recherche de l'antigène Gal/GalNac dans les selles par kit ELISA de 2ème génération	80 à 95 %	>90%
PCR sur selles ou mucus	90 à 99%	>90%
Sérologie	70 % (phase aiguë) 90 % (convalescence)	>85%

* Variabilité expliquée par la qualité du prélèvement, la rapidité de la prise en charge au laboratoire, l'expérience de l'observateur, la notion de traitement préalable, le nombre d'échantillons de selles fournis au laboratoire.

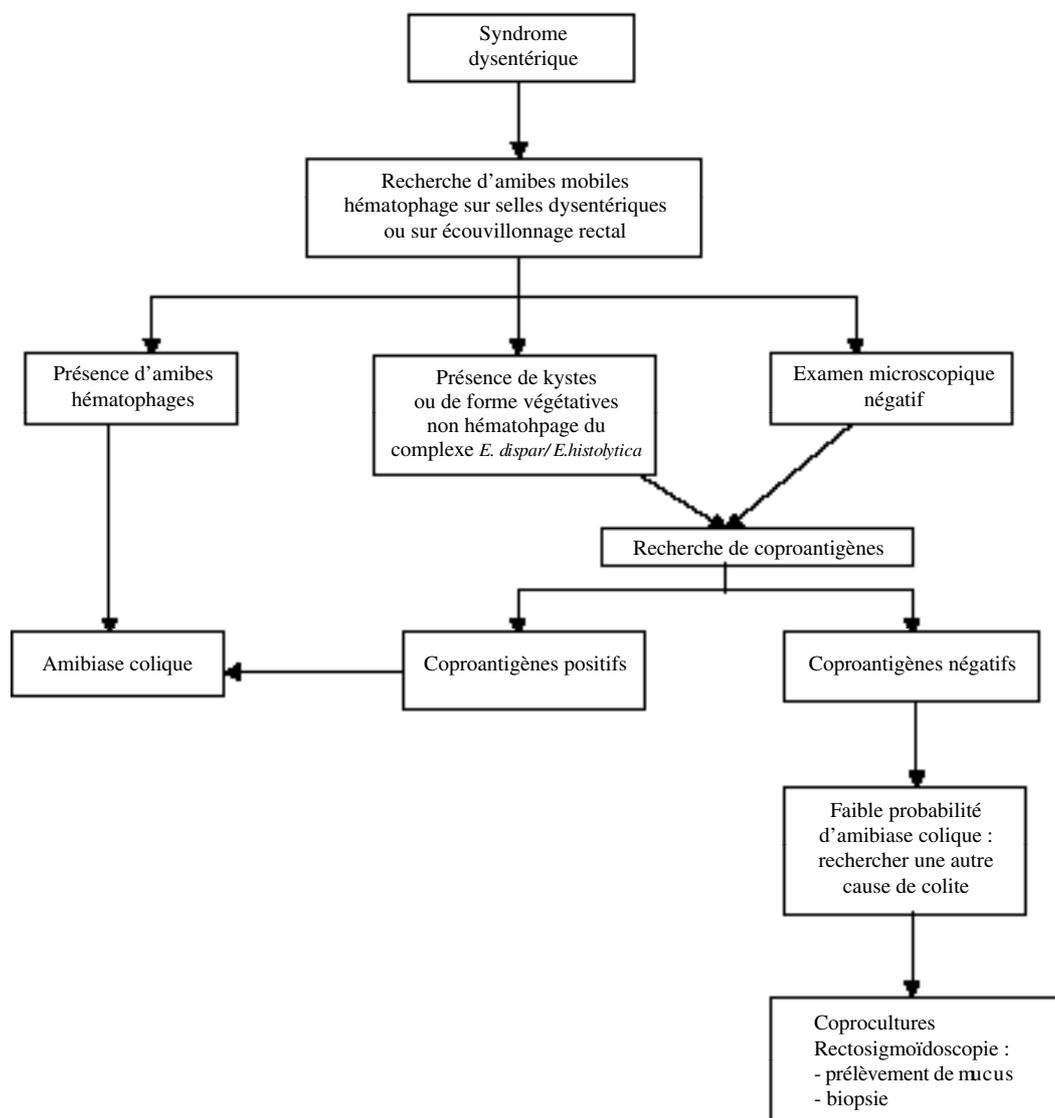


Figure 5 - Proposition d'algorithme diagnostique devant une suspicion clinique d'amibiase colique.

Amibiase extra-intestinale

Le diagnostic est évoqué devant le tableau classique d'hépatomégalie douloureuse et fébrile (triade de Fontan) survenant chez un sujet ayant des antécédents parfois très anciens de voyage en région endémique (59). Il est conforté par les données échographiques ou scanographiques. La notion d'antécédent de diarrhée fait défaut dans 70 % des cas (1,2,5, 39). Au laboratoire, l'hémogramme objective une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, sans hyperéosinophilie. Une anémie modérée est observée chez 50 % des malades, conséquence d'un syndrome biologique inflammatoire. Une augmentation des phosphatases alcalines et une hypertransaminasémie sont observées respectivement dans 80 % et 20% des cas (1, 39).

Le diagnostic de certitude repose sur la sérologie, qui

reste l'examen de référence dans les amibiases tissulaires. Une recherche d'anticorps spécifiques par agglutination de particules de latex peut être demandée en urgence. Elle sera complétée, par exemple, par une technique immuno-enzymatique et une hémmagglutination indirecte dont l'association permet d'obtenir une sensibilité de plus de 94 % et une spécificité de plus de 95 % (1).

• La sérologie est positive

Le traitement par métronidazole par voie parentérale doit être débuté dès le résultat positif du test d'agglutination rapide. Lors d'une amibiase hépatique, les titres observés, généralement très élevés et corrélés aux signes échographiques, affirment le diagnostic. Devant des titres sérologiques peu élevés, il est classique de discuter une cicatrice

Tableau III - Sensibilité des examens biologiques dans le diagnostic de l'amibiase hépatique (adapté d'après la référence 31).

Technique	Sensibilité
Sérum	
- Sérologie	94%
- recherche d'antigènes circulants	75 % en phase tardive 100 % en phase précoce avant traitement
Selles	
- microscopie optique	10 %
- coproantigènes	habituellement négatif
Pus d'abcès	
- microscopie optique	<25%
- antigènes Gal/GalNac	97,6%
- PCR	100%

sérologique, notamment en zone d'endémie. La réalisation d'une électrosynérèse ou d'une immunoelectrophorèse peut être intéressante dans cette situation car elle se négative classiquement en 6 à 12 mois après une infection aiguë (5).

• La sérologie est négative

Une sérologie réalisée au cours de la première semaine suivant l'apparition des symptômes peut être négative. En cas de forte présomption clinique, la mise en route d'un traitement par Nitro-5-imidazolés ne doit pas être retardée. La sérologie sera renouvelée 7 à 10 jours plus tard. Dans l'intervalle, la recherche d'antigènes sériques circulants Gal/GalNac par ELISA pourrait trouver encore une indication puisqu'elle est positive chez 96 % des malades avant traitement (46).

Une ponction de l'abcès hépatique à visée diagnostique est exceptionnellement pratiquée dans les cas importés. Elle est réservée aux diagnostics difficiles (sérologie négative et forte suspicion clinique, en particulier) ou aux suspicions de coinfection (3). La recherche d'amibes en microscopie optique sur ce « pus » chocolat stérile est très difficile, car les parasites se trouvent généralement en périphérie, dans les parois de l'abcès (5). La sensibilité de la recherche d'antigènes par ELISA sur le pus de drainage est excellente (97,6%). La PCR a également été proposée, avec des sensibilités variables suivant les cibles utilisées (48).

Dans l'amibiase hépatique, la recherche d'amibes au niveau des selles a peu d'intérêt car elle n'est positive que dans 10 % des cas. Si elle est négative, elle ne dispense pas du traitement systématique par un anti-amoéboicide de contact associé au traitement par métronidazole. Le suivi est essentiellement clinique et la surveillance de l'évolution du taux d'anticorps n'a aucun intérêt.

La sensibilité des différentes méthodes de laboratoire dans le diagnostic de l'amibiase hépatique est résumée dans le tableau III. Un algorithme décisionnel peut être proposé (Fig. 6).

CONCLUSION

Ces dernières années, l'apparition d'outils diagnostiques nouveaux (recherche de coproantigènes, PCR), très sensibles et permettant de différencier *E. dispar* et *E. histolytica*, a bouleversé l'épidémiologie de l'amébose. La diffusion et la validation de ces tests à grande échelle par le biais d'une collaboration étroite entre biologistes et cliniciens

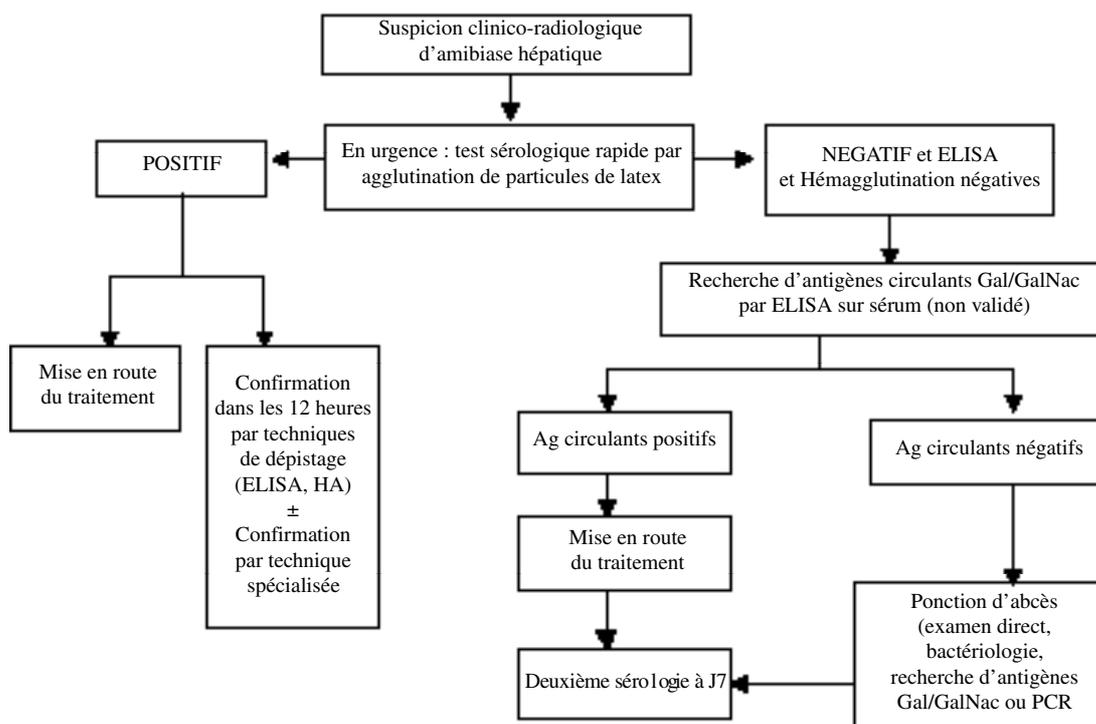


Figure 7 - Proposition d'algorithme décisionnel devant une suspicion d'amibiase hépatique.

devraient améliorer la prise en charge de cette maladie du péril fécal dans les régions de haute endémicité. L'arrivée de ces techniques en France devrait également modifier les algorithmes de prise en charge de l'amibiase d'importation. Cependant, comme l'ont souligné les auteurs français (32,60-62), ces techniques sont complémentaires de la microscopie qui doit rester l'examen de première intention dans l'amibiase colique. Cet examen parasitologique des selles est la seule technique qui permette de visualiser directement les formes végétatives hématophages d'*E. histolytica* et de détecter d'autres étiologies de diarrhées parasitaires.

RÉFÉRENCES

- 1 - STANLEY SL - Amoebiasis. *Lancet* 2003; **361** : 1025-34.
- 2 - RAVDIN JI - Amebiasis. *Clin Infect Dis* 1995; **20** : 1453-1466.
- 3 - HAQUE R, HUSTON CD, HUGHES M *et Coll* - Amebiasis. *N Engl J Med* 2003; **348** : 1565-73.
- 4 - REED SL - Amebiasis : an update. *Clin Infect Dis* 1992; **14** : 385-93.
- 5 - LEGER N, DANIS M- Amibes et amibiase- Editions Techniques- Encycl Med Chir (Paris-France), Maladies infectieuses, 8-500-A-10, 1995, 14 p.
- 6 - WORLD HEALTH ORGANIZATION- Amoebiasis. *Weekly Epidem Rec* 1997; **72** : 97-99.
- 7 - PICOT S, AMBROISE-THOMAS P- Facteurs et conditions de pathogénicité d'*Entamoeba histolytica*- *Lett Infectiol* 1994; **9** : 317-22.
- 8 - RAVDIN JI- *Entamoebahistolytica* : from adherence to enteropathy. *J Infect Dis* 1989; **159** : 420-429.
- 9 - ESPINOSA-CANTELLANO M, MARTINEZ-PALOMO A - Pathogenesis of intestinal amebiasis : from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13** : 318-331.
- 10 - QUE X, REED SL - Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13** : 196-206.
- 11 - LEIPPE M, EBEL S, SCHOENBERGER OL *et Coll* - Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88** : 7659-7663.
- 12 - BRUMPT E- Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. Amibe à kystes quadrinuclées, parasite de l'homme. *Bull Acad Med* 1925; **94** : 943-952.
- 13 - SARGEAUNT PG, WILLIAMS JE- Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; **73** : 225-227.
- 14 - PETITHORY JC, BRUMPT LC, POUJADE F - *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903) et *Entamoeba dispar* E. Brumpt 1925 sont deux espèces différentes. *Bull Soc Pathol Exot* 1994; **87** : 231-237.
- 15 - S AVEL J- *Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Quelle espèce pour quelle amibiase ? *Spectra Biologie* 1998; **17** : 26-30.
- 16 - DODSON JM, CLARK CG, LOCKHART LA *et Coll* - Comparison of adherence, cytotoxicity and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol Int* 1997; **46** : 225-235.
- 17 - TANNICH E, HORSTMANN RD, KNOBLOCH J, ARNOLD HH- Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86** : 5118-22.
- 18 - TACHIBANA H, IHARA S, KOBAYASHI S *et Coll* - Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; **29** : 2234-2239.
- 19 - CLARK CG, DIAMOND LS- Ribosomal RNA genes of «pathogenic» and «non pathogenic» *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991; **49** : 297-302.
- 20 - PAYS JF - Progrès récents dans le diagnostic de l'amibiase intestinale. Apports de la biologie moléculaire. *Ann Biol Clin* 1994; **52** : 251-255.
- 21 - G ATTI S, PETITHORY JC, ARDOIN F *et Coll* - Asymptomatic amoebic infection : *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar*? That is the question. *Bull Soc Pathol Exot* 2001; **94** : 304-307.
- 22 - ABD-ALLA MD, WAHIB AA, RAVDIN JI - Comparison of antigen-capture ELISA to stool-culture methods for the detection of asymptomatic *Entamoeba* species infection in Kafer Daoud, Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 2000; **62** : 579-582.
- 23 - ABD-ALLA MD, RAVDIN JI - Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. *Trop Med Int Health* 2002; **7** : 365-370.
- 24 - BRAGA LL, MENDONCA Y, PAIVA CC *et Coll* - Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 1998; **36** : 3044-3045.
- 25 - HAQUE R, ALI IM, PETRI WA Jr- Prevalence and immune response to *E. histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **60** : 1031-1034.
- 26 - EVANGELOPOULOS A, LEGAKIS N, VAKALIS N - Microscopy, PCR and ELISA applied to epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitol Int* 2001; **50** : 185-9.
- 27 - RIVERA WL, TACHIBANA H, KANBARA H - Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the Northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58** : 916-921.
- 28 - KEBEDE A, VERWEIJ JJ, ENDESHAW T *et Coll* - The use of real-time PCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary school children in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; **98** : 43-48.
- 29 - NESBITT RA, MOSHA FW, KATKI HA *et Coll* - Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA test in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Natl Med Assoc* 2004; **96** : 671-677.
- 30 - PINHEIRO SM, CARNEIRO RM, ACASIS *et Coll* - Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the pernambuco state of northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **70** : 221-224.
- 31 - TANYUKSEL M, PETRI WA- Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; **16** : 713-729.
- 32 - MORILLON M- Diarrhées aiguës parasitaires. In «TEYSSOU R - Diarrhées infectieuses aiguës», Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS Paris, 2003, pp 135-148.
- 33 - GONZALES-RUIZ A, HAQUE R, AGUIRRE A *et Coll* - Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J Clin Pathol* 1994; **47** : 236-239.
- 34 - HIATT RA, MARKELL EK - How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg* 1995; **53** : 36-39.
- 35 - PETRI WA, HAQUE R, LYERLY D, VINES RR - Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today* 2000; **16** : 320-321.
- 36 - CLARK CG, DIAMOND LS - Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15** : 329-341.
- 37 - SHEEHAN DJ, BOTTONE EJ, PAVLETICH K, HEALTH MM - *Entamoeba histolytica* : efficacy of microscopic, cultural and serological techniques for laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 1979; **10** : 128-133.
- 38 - MAC MILLAN A, MAC NEILLAGE GJ - Comparison of the sensitivity of microscopy and culture in the laboratory diagnosis of intestinal protozoal infection. *J Clin Pathol* 1984; **37** : 809-811.
- 39 - PETRI WA, SINGH U- Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis* 1999; **29** : 1117-25.
- 40 - ORIHTEL TC, ASH LR- *Entamoeba histolytica*. In «ORIHTEL T.C., ASH L.R. - Parasites in human tissues». American society of clinical pathologists Press ed. Chicago, 1995, pp 4-9.

- 41 - PILLAI DR, KAIN KC - Immunochromatographic strip-based detection of *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* and *Giardia lamblia* coproantigen. *J Clin Microbiol* 1999; **37** : 3017-3019.
- 42 - MIRELMAN D, NUCHAMOWITZ Y, STOLARSKY T - Comparison of use of enzyme-linked-immunosorbent assay based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J Clin Microbiol* 1997; **35** : 2405-2407.
- 43 - PILLAI DR, KEYSTONE JS, SHEPPARD DC *et Coll* - *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* : epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clin Infect Dis* 1999; **29** : 1315-1318.
- 44 - YAU YCW, CRANDALL I, KAIN KC - Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserved stools samples. *J Clin Microbiol* 2001; **39** : 716-719.
- 45 - HAQUE R, ALI IK, AKTHER S, PETRI W - Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 1998; **36** : 449-452.
- 46 - HAQUE R, MOLLAH NU, MALI IK *et Coll* - Diagnosis of amoebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 2000; **38** : 3235-3239.
- 47 - GONIN P, TRUDEL L - Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003; **41** : 237-241.
- 48 - ZENGZHU G, BRACHA R, NUCHAMOWITZ Y *et Coll* - Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1999; **37** : 3034-3036.
- 49 - TROLL H, MARTI H, WEISS N - Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *J Clin Microbiol* 1997; **35** : 1701-1705.
- 50 - RAMOS F, ZURABIAN R, MORAN P *et Coll* - The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; **93** : 335-336.
- 51 - BLESSMANN J, BUSS H, NU PA *et Coll* - Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol* 2002; **40** : 4413-4417.
- 52 - LOTTER H, JACKSON TF, TANNICH E - Evaluation of three serological tests for detection of anti-amoebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amoebiasis. *Trop Med Parasitol* 1995; **46** : 180-182.
- 53 - KRAOUL L, ADJMI H, LAVARDE V *et Coll* - Evaluation of a rapid enzyme-linked immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol* 1997; **35** : 1530-1532.
- 54 - JACKSON TF, ANDERSON CB, SIMJEE AE - Serological differentiation of past and present infection in hepatic amoebiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; **78** : 342-345.
- 55 - SHETTY N, DAS P, PAL SC, PRABHU T - Observations on the interpretation of amoebic serology in endemic areas. *J Trop Med Hyg* 1988; **91** : 222-227.
- 56 - ROBERT R, MAHAZA C, BERNARD C *et Coll* - Evaluation of a new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol* 1990; **28** : 1422-1424.
- 57 - SANCHEZ-GUILLEN MC, PEREZ-FUENTES R, SALGADOROSAS H *et Coll* - Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66** : 731-737.
- 58 - FLECHAIRES A, HUGUET R, LAVERDANT C - L'amibiase colique et ses complications. *Rev Med Ther* 1982; **39** : 2075-2082.
- 59 - LAVERDANT C - L'amibiase hépatique « d'importation ». *Med Mal Infect* 1986; **5 bis** : 327-333.
- 60 - PAUGAM A, LARIBI N, HAMRIOUI B - *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar* : des progrès pour le diagnostic de l'amibiase. *Immunoanal Biol Spec* 2001; **16** : 47-50.
- 61 - PAUGAM A, TOURTE-SCHAEFER C, DUPOUY-CAMET J - *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar* : deux amibes microscopiquement identiques mais une seule espèce pathogène. Conséquences pratiques et perspectives. *Sem Hop Paris* 1998; **74** : 177-181.
- 62 - PAUGAM A, TOURTE-SCHAEFER C, ROUSSET JJ - Quels examens prescrire pour le diagnostic de l'amibiase ? *Presse Med* 2002; **31** : 1482-1483.

nouveau site • www.actu-pharo.com • nouveau site

www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com



www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com
www.actu-pharo.com