ESSAI D'APPLICATION DE LA RÉACTION D'AGGLUTINATION DES PARTICULES DE COLLODION A QUELQUES PARASITOSES

Par J. COUDERT et M. COLY

La plupart des réactions immunologiques utilisées de façon courante ne permettant pas toujours de faire le diagnostic des maladies parasitaires, et surtout de faire un diagnostic différentiel entre diverses parasitoses du même groupe, il nous a semblé intéressant d'étudier la sensibilité et la spécificité de l'agglutination des particules de collodion dans ce groupe d'infestations.

De nombreux travaux ont déjà été consacrés à l'étude de cette réaction immunologique, principalement par des auteurs américains.

Le principe de base de la réaction est l'utilisation des particules inertes comme « facteurs adjuvants », comme supports d'antigène ; ces particules sur lesquelles se fixe l'antigène permettent l'observation de l'union de l'antigène avec l'anticorps, si celle-ci n'est pas directement apparente, ou raccourcissent les délais de cette observation en augmentant la vitesse de la réaction spécifique.

Les travaux de Jones, Loeb, Zozaya furent à l'origine de l'utilisation des particules de collodion comme particules inertes. Bedson et Mudd, reprenant les travaux de Loeb, montrèrent les conditions de stabilité de la suspension de particules. Puis, ce furent les travaux de Cannon et Marshall, de Goodner, de Eisler, qui utilisèrent cette réaction en bactériologie. Divers auteurs ont alors appliqué cette méthode d'agglutination à des sérums d'hommes et d'animaux présentant des affections variées :

Tuberculose : Weir, Riordan, Morris.

Syphilis : Berger.

Infection à pneumocoque : Burger.

Puis, Cavelti améliora la technique de préparation de la suspension, insistant surtout sur sa concentration ; il précisa également la technique de la réaction d'agglutination.

Saslaw et Campbell obtinrent des résultats très satisfaisants en utilisant cette méthode pour le diagnostic de l'histoplasmosé.

Havens et Eichman l'ont également utilisée dans l'étude des hépatites virales.

Le nombre des sérums que nous avons testés est évidemment trop restreint pour donner à nos résultats une valeur statistique ; nous ne pouvions en effet retenir que des sérums d'hommes ou d'animaux dont l'affection parasitaire ne faisait aucun doute. Ce que nous avons voulu étudier, ce sont les conditions d'application de la réaction d'agglutination des particules de collodion aux différentes parasitoses.

Les techniques que nous donnons ici sont inspirées de Cavelti, compte tenu de quelques modifications que nous y avons apportées.

Préparation des particules de collodion

Du collodion dissous dans de l'alcool-éther * est versé lentement dans une capsule de 2 litres contenant environ 1,5 litre d'eau tri-distillée, dans laquelle il est agité avec une baguette de verre. La masse spongieuse de collodion est rassemblée avec la baguette. On change plusieurs fois l'eau pour 500 cc. de collodion ; la masse de collodion est ainsi lavée plusieurs fois à l'eau tri-distillée en la remuant et en la pressant jusqu'à ce qu'elle devienne dure et résistante. L'eau est égouttée et la masse de collodion est desséchée à l'étuve à 37° C. pendant deux jours, puis à l'étuve à 56° pendant 4 à 5 jours. Pour la préparation de la suspension, l'appareil que nous schématisons est monté : un bocal de 500 cc. est fermé par un couvercle présentant trois ouvertures ; par l'une passe un ajustage en verre effilé, d'un diamètre de 1,5-2 millimètres, relié par un tube de caoutchouc à un entonnoir. Par l'ouverture centrale plonge un agitateur en verre formé d'une baguette coudée en crochet, et équilibré statiquement et dynamiquement. Cet agitateur est monté, à travers un tube de guidage fixé au statif, sur le raccord d'entraînement d'un moteur électrique à vitesse réglable, fixé verticalement sur le même statif, centré sur le tube de guidage. Un disque de caoutchouc ou de matière plastique est monté sur le haut de l'agitateur, pour prévenir toute chute de poussière ou d'impuretés (corps gras surtout) dans le bocal, le long de l'agitateur. Le bocal est plongé dans un bain-marie maintenu par un réchauffeur électrique à une température constante de 40° C. Le troisième orifice permet de décanter par aspiration le liquide surnageant.

* Collodion officinal à l'éther. Gifrer et Barbezat, Lyon.

1. Moteur. — 2. Raccord d'entraînement. — 3. Disque de caoutchouc. — 4. Tube guide de l'agitateur. — 5. Couvercle. — 6. Bocal d'émulsion. — 7. Agitateur. — 8. Bain-marie. — 9. Réchauffeur du bain-marie. — 10. Entonnoir. — 11. Tube de caoutchouc. — 12. Ajutage d'injection du mélange eau-acétone. — 13. Statif de laboratoire.

A partir du collodion desséché, on prépare d'abord dans le bocal sous agitation, à 40° C., 100 cc. de solution de collodion desséché à 10 % dans l'acétone pure. Après complète dissolution du collodion, la vitesse de l'agitateur est fixée à 800 tours/minute environ, et, sous agitation, on injecte dans le bocal 50 cc. d'un mélange, préparé à part, de trois parties d'eau tri-distillée et d'une partie d'acétone. Ce mélange, versé dans l'entonnoir, s'écoule par l'ajutage, en un fin filet, dans la solution de collodion-acétone du bocal. La solution de collodion devient trouble par précipitation du collodion dans la solution eau-acétone, une partie en fines particules donnant un aspect laiteux à la phase liquide, le reste précipitant en flocons épais. On arrête l'agitation. Les flocons déposent au fond du bocal. Le liquide laiteux surnageant est décanté délicatement par aspiration. Le résidu du collodion précipité est redissous dans 95 cc. d'acétone pure, puis de nouveau précipité, sous agitation, par addition du mélange eau-acétone. Ce processus est répété 10 à 12 fois ; chaque fois, le volume de l'acétone employée pour la redissolution du collodion est diminué d'environ 5 % ; le mélange eau-acétone doit, chaque fois, être également diminué en proportion.

Ce qui surnage des trois premières précipitations est rejeté ; les surnageants des 7 à 9 précipitations suivantes sont aspirés, immédiatement après chaque précipitation, à travers un filtre de gaze, dans un flacon contenant 600 cc. d'eau tri-distillée froide. Puis, ce flacon est placé dans un bain d'eau à 28° C. environ et la suspension est lavée pendant plusieurs jours par un barbotage d'air filtré jusqu'à ce que toute odeur d'acétone ait disparu.

Après extraction de l'acétone, les particules sont lavées trois fois à l'eau tri-distillée de la façon suivante : la suspension est d'abord filtrée à travers plusieurs épaisseurs de gaze pour éliminer les gros amas ; elle est ensuite centrifugée à 2.500 t./m. pendant 5 minutes ; le surnageant est centrifugé à la même vitesse pendant une heure et le surnageant de cette centrifugation est rejeté ; le 2° culot est remis en suspension dans une moindre quantité d'eau, puis centrifugé à 2.500 t./m. pendant 5 minutes, et le surnageant pendant une heure. Ce processus est ainsi renouvelé 4 ou 5 fois.

Les plus grosses particules sont alors éliminées par une centrifugation de 3 minutes à 2.500 t./m. ; le surnageant est recueilli et le culot remis en suspension est à nouveau centrifugé de la même façon. Le sédiment ultime est rejeté et le dernier liquide surnageant, réuni au précédent, réalise la suspension stock.

Celle-ci est alors ajustée en densité de façon à réaliser le de-

gré n° 2 de l'échelle de Mac-Farland *, quand elle est diluée au 1/3. On place alors la suspension ainsi obtenue dans un flacon en pyrex, à température ambiante, dans un endroit obscur. L'examen microscopique de la suspension montre que les particules ont un diamètre variant depuis la limite de visibilité jusqu'à 4 ou 5 microns.

La suspension ainsi préparée ne peut être conservée plus de 3 ou 4 mois stable ; au bout de ce laps de temps, les particules ont tendance à s'agglutiner spontanément, et on ne peut plus pratiquer de réactions sérologiques valables.

Technique de la réaction

1° Les sérums

Ils doivent être utilisés le plus rapidement possible après qu'ils aient été recueillis ; après 3 ou 4 jours de conservation, ils donnent lieu à des réactions non spécifiques. Ils doivent être décomplémentés pendant 30 minutes à 56° C. (sérums humains) ou à 60° C. (sérums animaux). Les dilutions sont faites dans du sérum physiologique jusqu'au titre que l'on désire étudier ; à ce sujet, nous avons remarqué que, pour la plupart des sérums, les dilutions inférieures à 1/10, ainsi que le sérum pur donnaient lieu, le plus souvent, à des réactions non spécifiques.

2° Les antigènes

Aussi souvent que nous l'avons pu, nous avons utilisé des antigènes lyophilisés et ils nous ont toujours donné satisfaction ; au contraire, les antigènes liquides préparés au laboratoire ne donnaient des résultats satisfaisants que lorsqu'ils étaient très récents et assez concentrés. Les dilutions de ces antigènes sont faites dans du sérum physiologique ; la dilution optimale est recherchée en utilisant des sérums positifs connus. La dilution d'antigène qui correspond à un titre élevé du sérum, ainsi qu'à une forte agglutination est prise comme type ; le plus haut titre ne coïncide d'ailleurs pas toujours avec la plus forte agglutination pour une dilution donnée de l'antigène, de sorte qu'un compromis est parfois nécessaire.

* N° 2 de l'échelle de Mac-Farland : mélanger : solution de chlorure de baryum à 1 % : 2 cc. ; acide sulfurique à 1 % : 98 cc.

3° Sensibilisation des particules de collodion par l'antigène

a) Dans une *première méthode décrite par Cavelti*, l'antigène et les particules sont mélangés ; le mélange est mis à incuber, puis les particules sont lavées par centrifugation et remises en suspension dans une solution saline, et c'est cette suspension que l'on ajoute aux dilutions de sérum. Dans notre travail, nous n'avons pas utilisé cette méthode, mais la seconde décrite par Cavelti, et qui est :

b) *Le simple mélange*. Ce procédé a l'avantage d'une grande rapidité, mais, selon Cavelti, on obtient parfois avec certains antigènes un titre de positivité moins élevé que lorsqu'on utilise des particules libres d'antigène non absorbé.

La meilleure façon de réaliser le mélange dépend de la tendance que possède l'antigène à provoquer une agglutination non spécifique des particules de collodion. Si cette tendance est faible, le mieux est de diluer le collodion avec l'antigène non dilué et de diluer ensuite le mélange jusqu'à la densité finale. Si la tendance à l'agglutination non spécifique est considérable, il vaut mieux diluer l'antigène avant d'ajouter la suspension de particules. C'est cette deuxième façon de procéder que nous avons utilisée le plus souvent.

Aussitôt que le mélange antigène-collodion est réalisé, il est agité vigoureusement pour être rendu homogène, et, après un délai de quelques minutes, il est ajouté aux dilutions de sérum.

4° Conduite générale du test

Pour rendre aisée la lecture du résultat, le volume dans chaque tube doit être finalement de 0,5 à 0,7 cc. environ, les volumes respectifs des dilutions de sérum et du mélange antigène-collodion étant sensiblement égaux. Pour des raisons de commodité, nous faisons la distribution en gouttes de la façon suivante :

	tube réaction	témoin-sérum	témoin-antigène
	—	—	—
collodion	3	3	3
antigène	3	—	3
sérum physiol. . .	—	3	4
	(incubation 3 à 5 minutes)		
sérum immun. . .	4	4	—

ce qui donne au total 10 gouttes dans chaque tube, soit environ 0,5 cc. Les tubes sont alors agités et mis à incuber à la température du laboratoire pendant une ou deux heures ; ils sont agités de temps en temps pendant l'incubation. Puis les tubes sont centrifugés pendant 3 minutes à 1.400 t./m. et la lecture de l'agglutination se fait alors de la façon suivante : les tubes sont placés devant un écran noir, au-dessus et en arrière duquel se trouve une source de lumière vive ; ils sont vigoureusement agités et l'état d'agglutination est noté comme suit : dans l'agglutination ++++ le diamètre des amas est de l'ordre de 1 à 1,5 mm. ou plus ; des amas plus petits sont notés +++, ++, + : la notation + désignant des amas très nettement visibles ; des amas juste à la limite de visibilité sont désignés par la notation $\pm$. Dans la négative, aucune particule n'est visible à l'œil nu, c'est-à-dire qu'après agitation, on obtient une suspension homogène plus ou moins laiteuse, alors que, dans les tubes présentant une réaction positive, le liquide surnageant, dans lequel les amas sont en suspension, est parfaitement limpide après agitation. Dans quelques cas, nous avons également pratiqué une lecture microscopique et avons pu ainsi noter un certain degré d'agglutination, alors que l'examen à l'œil nu ne montrait rien ; mais, dans un très grand nombre de cas, nous n'avons pas noté de différence appréciable.

Résultats obtenus

1° Titrage d'antigènes

Nous avons testé, en utilisant des sérums connus comme positifs, certains antigènes dont l'état de conservation était douteux.

a) *Antigènes hydatiques* : L'antigène pris pour type était un antigène lyophilisé dont nous étions assurés de la conservation, et les antigènes testés, des antigènes liquides préparés au laboratoire à partir de liquides de kystes hydatiques parasitant des hommes ou des animaux ; ces antigènes étaient plus ou moins récents, certains datant de plus de 10 ans. Nous avons pu ainsi constater que les antigènes liquides récents donnaient un titre d'agglutination comparable à celui de l'antigène lyophilisé, mais qu'après quelques mois seulement de conservation, ils ne donnaient plus lieu qu'à des agglutinations très faibles, ne donnaient parfois aucun résultat et parfois même donnaient lieu à des agglutinations non spécifiques.

b) *Antigènes histoplasmiques* : Des expériences identiques nous ont permis de voir que, dans ce cas encore, la conservation des antigènes liquides (milieu de culture de Long, prélevé après que le champignon ait poussé, filtré et mis en ampoules) ne dépassait pas quelques mois. Dans un cas, nous avons pu constater, par l'examen microscopique, qu'un milieu de culture, dont un prélèvement n'avait eu aucune action antigénique vis-à-vis d'un sérum de malade atteint d'histoplasmose à *Histoplasma capsulatum*, avait été contaminé par un autre champignon.

2° Application au diagnostic de parasitoses

a) *Toxoplasmose* : Les quelques sérums de malades que nous avons testés étaient tous positifs jusqu'à la dilution de 1/40 à la déviation du complément ; l'agglutination des particules de colloïdion a en général donné des résultats analogues parfois supérieurs ; ainsi, un de ces sérums donnait encore une agglutination à la dilution au 1/1.000. Par contre, les essais que nous avons faits sur la toxoplasmose expérimentale du cobaye ont montré que, dans ce cas, l'agglutination était beaucoup moins sensible que la déviation du complément.

b) *Distomatose* : Nous avons testé cinq sérums de malades présentant une distomatose certaine et un sérum de malade suspect d'une parasitose (il n'y a pas eu de diagnostic clinique dans ce dernier cas). Seul, ce dernier sérum n'a pas agglutiné les particules de collodion, alors que les autres donnaient une agglutination importante, allant dans un des cas jusqu'à la dilution de 1/2.560 ; par ailleurs, les sérums pris comme témoins n'ont jamais donné d'agglutination.

c) *Trypanosomiase* : L'expérience a porté sur des sérums de rats et de souris inoculés quelques semaines auparavant par voie intrapéritonéale et présentant des trypanosomes dans leur sang périphérique au moment où le sang a été prélevé. Là encore, nous avons obtenu des agglutinations très nettes, alors que les sérums témoins donnaient des réactions parfaitement négatives. Par contre, le sérum d'une malade ayant reçu 12 injections d'extrait de *Trypanosoma cruzi*, alors qu'elle présentait un néoplasme, n'a pas agglutiné les particules de collodion.

d) *Ascaridiose* : Les sérums testés étaient des sérums de malades porteurs d'*Ascaris* et ayant une éosinophilie plus ou moins importante. Nous avons testé six sérums ; deux ont été négatifs, un a donné lieu à une réaction non spécifique (il s'agissait d'un

sérum vieilli), les autres ont donné des agglutinations positives spécifiques pour des dilutions variant de 1/40 à 1/320. Il semble que, dans ce cas, la réaction ne soit intéressante qu'à partir d'un certain degré d'infestation par le parasite.

e) *Anguillulose* : Dans les premiers cas étudiés, nous n'avions obtenu que des réactions non spécifiques ou très faiblement positives ; cela tenait à notre antigène (antigène liquide ou plus exactement suspension d'anguillules lysées par des congélations et dégels successifs), d'une concentration insuffisante. Une série plus récente, avec un antigène titrant 600 à 900 larves par goutte, nous a, au contraire, donné des agglutinations spécifiques parfaitement nettes chez deux malades parasités.

f) *Affections dues aux Cestodes* : Nous avons dans cette série de réactions testé une dizaine de sérums de malades porteurs de ténia ou de kyste hydatique, et avons obtenu des résultats assez intéressants en ce sens que nous avons toujours eu des agglutinations spécifiques (témoins négatifs), et d'autre part nous avons pu différencier, mieux que ne le fait l'intradermo-réaction de Casoni, les deux parasitoses. En effet, la réaction couplée est différente dans les deux cas : un sérum de porteur de ténia agglutine les particules sensibilisées soit avec l'antigène hydatique, soit avec l'antigène ténia, alors qu'un sérum de malade porteur d'un kyste hydatique n'agglutine pas les particules sensibilisées avec l'antigène ténia.

Dans ce groupe de parasitoses, l'agglutination des particules de collodion semble donc être intéressante.

g) *Histoplasmose* : Saslaw et Campbell ont montré, par une expérimentation portant sur un grand nombre de sérums, que l'agglutination des particules de collodion est applicable au diagnostic de l'histoplasmose, tout au moins en ce qui concerne la maladie expérimentale, avec une certaine réserve pour la maladie humaine. Nous sommes arrivés à des conclusions analogues avec le petit nombre de sérums que nous avons testés.

Cette réaction peut permettre de séparer l'histoplasmose américaine de l'histoplasmose africaine à *Histoplasma duboisii*, sous réserve qu'il semble exister une partie antigénique commune aux deux affections, alors qu'une partie antigénique de l'histoplasmose africaine ne se retrouve pas dans l'histoplasmose américaine. Cette expérimentation fera l'objet d'un travail ultérieur.

Conclusion

La réaction d'agglutination des particules de collodion présente l'intérêt d'être une réaction polyvalente, puisqu'on peut la sensibiliser par le moyen de différents antigènes.

Les antigènes utilisables doivent répondre dans chaque cas à des conditions bien précises de préparation et de conservation.

Nous avons utilisé des antigènes lyophilisés préparés à partir des parasites suivants : Douve, *Ascaris*, *Tænia*, Trypanosome, kyste hydatique, *Histoplasma capsulatum*. Ces antigènes nous ont donné des résultats plus intéressants que les antigènes liquides de : *Tænia*, kyste hydatique, *Histoplasma capsulatum* et *duboisii*, Anguillule, toxoplasme.

La réaction est utilisable pour le titrage des antigènes, en présence d'un sérum témoin de malade ou d'animal. Ce titrage s'est montré intéressant pour le liquide de kyste hydatique conservé en ampoules, ainsi que pour l'histoplasmine liquide.

Dans un but de diagnostic, la réaction s'est avérée intéressante pour les parasitoses suivantes : distomatose, trypanosomiase, infestations dues aux Cestodes, histoplasmoses, et à degré moindre pour la toxoplasmoses, l'ascaridiose et l'anguillulose.

Des réserves sont encore nécessaires, non pas vis-à-vis de sa spécificité, mais vis-à-vis de sa sensibilité.

Pour cette réaction d'agglutination, les sérums doivent dans tous les cas être utilisés frais ou conservés sous congélation à basse température.

BIBLIOGRAPHIE

- BEDSON (S. P.), 1929. — Simple method for determining electrical charge carried by virus particles. *Brit. J. Exp. Path.*, 10, 364.
- BERGER (F.-M.), 1943. — Agglutination test for serological diagnostic of syphilis. *J. Path. Bact.*, 55, 363.
- BURGER (M.), 1943. — Microscopic observation of collodion particles as indicators of type-specific pneumococcal immune reactions. *J. Lab. Clin. Med.*, 28, 1128.
- 1944. — Microscopic observation of collodion particles agglutination in protein-antiprotein systems. *J. Lab. Clin. Med.*, 29, 352.
- CANNON (P. R.) and MARSHALL (C. E.), 1940. — Studies on mechanism of Arthus phenomenon. *J. of Immunology*, 38, 365.
- 1941. — Improved serologic method for determination of precipitative titers of antisera. *J. of Immunology*, 40, 127.
- CAVELTI (P. A.), 1944. — Studies on technique of collodion agglutination ; influence of certain qualities of collodion particles and of proportions of antigen and collodion on sensitivity and specificity of reaction. *J. of Immunology*, 49, 365.

- 1947. — The technic of collodion particles agglutination. *J. of Immunology*, 57, 141.
- CHASE (J. H.), 1945. — Serological and immunological studies on gonadotrophic hormones. *Yale J. Biol. Med.*, 17, 517.
- COLY (M.), 1955. — *Application de la réaction d'agglutination des particules de collodion à quelques parasitoses*. Thèse Lyon.
- COUDERT (J.), 1955. — Antigènes lyophilisés en parasitologie. *La Presse Médicale*, 63, 1080.
- DELVÈS (S.), 1937. — Immunological studies with purified serum bearing on unitarian theory of antibodies. *J. of Inf. Dis.*, 60, 55.
- DULANEY (A. D.), ALDEN (R. H.), CONGER (R. P.), 1950. — The preparation and biological activity of alpha-œstradiol sensitized collodion particles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 74, 466.
- EISLER (D. M.), 1941. — Influence of collodion particles on visible endpoint in antibody titration. *J. of Immunology*, 42, 405.
- FREUND (J.), 1925. — ...in *Am. Rev. of Tuberc.*, 12, 124.
- 1930. — Toxin-antitoxin reactions on surface of collodion particles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 28, 65.
- 1931. — On nature of toxin-antitoxin neutralization studied on collodion particles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 28, 1010.
- 1931. — On mechanism of toxin-antitoxin reactions. *J. of Immunology*, 21, 127.
- 1932. — Toxin-antitoxin réaction without neutralization. *J. of Exp. Med.*, 55, 181.
- 1932. — A method for Immunization with Carbohydrates haptens absorbed on collodion particles. *Science*, 75, 418.
- GARIN (J.-P.), 1953. — *Etude du Toxoplasme et de la Toxoplasmose Humaine acquise*. Thèse Lyon.
- GOODNER (K.), 1941. — Collodion fixation, new immunological réaction. *Science*, 94, 241.
- HAVENS (J. R.), LLOYD (H.), 1949. — A method of preparing collodion particles for serological agglutination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 72, 98.
- HAVENS (J. W. P.), EICHMAN (H. L.), 1950. — Collodion particles agglutination with acute phase serums and immune globulin in viral hepatitis. *J. of Immunology*, 64, 349.
- JONES (F. S.), 1927. — Agglutination by precipitin. *J. of Exp. Med.*, 46, 303.
- 1928. — Agglutination by precipitin. *J. of Exp. Med.*, 48, 183.
- LANGE (K.), GOLD (M. M. A.), WEINER (D.), SIMON (V.), 1944. — *J. of Clin. Invest.*, 28, 80.
- LOEB (J. J.), 1922. — The influence of electrolytes on the cataphoretic charge of colloidal particles and the stability of their suspensions. Experiments with collodion particles. *Gen. Physiol.*, 5, 109.
- SASLAW (S.) and CAMPBELL (C. C.), 1949. — A collodion agglutination test for Histoplasmosis. *Public Health Reports*, 64, 424.
- 1950. — Studies on the stability of the Histoplasmin collodion agglutination test. *J. of Labor. and Clin. Med.*, 35, 780.
- WEIR (J. M.), 1941. — Technic for demonstrating antibodies against tuberculin in experimental animals with sensitized collodion pellets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46, 47.
- ZOZAYA (J.), 1932. — Carbohydrates absorbed on colloïd as antigen. *J. of Exp. Med.*, 55, 326.