ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome XXXX

1965

N° 4

Annales de Parasitologie (Paris), t. **40**, 1965, n° 4, pp. 393 à 401

MÉMOIRES ORIGINAUX

Sur la technique du séro-diagnostic de la Toxoplasmose par hémagglutination passive

par M. S. BEN RACHID (*)

Le diagnostic de la toxoplasmose repose principalement sur le test de Sabin et Feldman (11) (Dye-Test) ou test de lyse parasitaire (4). La spécificité, la sensibilité et la fidélité de cette réaction sont très satisfaisantes. Mais la méthode est assez complexe, parce qu'elle exige l'emploi de parasites vivants entretenus au stade de virulence maximale et aussi d'un « facteur accessoire » (complément humain) qu'il est difficile d'obtenir et de conserver. Ceci limite sa mise en pratique courante : seuls quelques laboratoires spécialisés l'utilisent régulièrement. Il serait donc utile de mettre au point des méthodes faisant appel à des réactifs stables et de bonne conservation : c'est dans cet esprit que de nombreuses réactions ont été proposées au cours de ces dernières années. L'une est l'hémagglutination passive appliquée à la toxoplasmose par Jacobs et Lunde (1956) (5).

On connaît le principe de cette méthode générale due à Boyden (1951) (2) et à Grabar (1953) (1). Des hématies traitées préalablement par l'acide tannique sont sensibilisées par l'antigène étudié : elles deviennent ainsi agglutinables par l'immunsérum spécifique correspondant. Nous avons entrepris de contrôler la valeur de cette réaction pour le diagnostic de la toxoplasmose. Mais nous avons rencontré quelques difficultés à la mettre en pratique. Certains détails techniques importants sont mal précisés dans la littérature. Notre propos est de les faire connaître.

(*) Boursier O.M.S. — Institut Pasteur de Tunis.

LES REACTIFS

1) Les hématies.

Nous avons utilisé des globules rouges frais de mouton. Il est important que ceux-ci soient en bon état de conservation, mais pas trop récemment prélevés : un délai de 48 à 72 heures au moins est nécessaire entre la saignée et l'utilisation. Nous n'avons pas expérimenté les hématies formolées (Park) (10), ni les hématies humaines (Maloney, Kaufmann) (9) (Lewis et Kessel) (6).

2) L'acide tannique.

Les essais de tannins à l'eau et à l'éther n'ont pas été satisfaisants ; les solutions se conservent mal et les résultats sont de ce fait très irréguliers. L'acide tannique pur est d'un emploi indispensable. On prépare une solution-mère à 1 % dans l'eau distillée qui doit être renouvelée toutes les deux semaines. Elle est diluée le jour de la réaction dans la solution tampon de $\text{pH} = 7,2$. La dilution optimale a été de 1/20 000 avec le lot d'acide tannique (Merck) que nous avons utilisé. Mais il est possible que ce chiffre doive être modifié pour d'autres lots, ou pour d'autres marques d'acide.

3) Les solutions-tampons.

a) TAMPON à $\text{pH} 7,2$

NaCl	8,5
Eau	900 ml
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} 0,15 \text{ M}$	72 ml
$\text{PO}_4\text{KH}_2 0,15 \text{ M}$	28 ml

b) TAMPON à $\text{pH} 6,4$

NaCl	8,5
Eau	900 ml
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} 0,15 \text{ M}$	26,7 ml
$\text{PO}_4\text{KH}_2 0,15 \text{ M}$	73,3 ml

Ces solutions sont conservées à $+4^\circ$ et renouvelées tous les quinze jours.

4) Le sérum de lapin.

Le sérum de lapin doit être tout d'abord contrôlé par le test de lyse pour vérifier l'absence d'anticorps spécifiques antitoxoplasmiques chez cet animal. Les sérums des animaux contrôlés sont inactivés à 56° pendant 45 minutes, puis absorbés par des globules rouges de mouton. Les agglutinines antimouton sont difficiles à faire disparaître et il est nécessaire de procéder à plusieurs absorptions successives et de bien contrôler leur absence totale dans le sérum utilisé finalement. Ce sérum est dilué au 1/100° dans de l'eau salée physiologique à 9/1 000° et utilisé comme diluant du sérum testé.

5) L'antigène.

L'antigène est obtenu en lysant les parasites par de l'eau distillée. Les débris cellulaires et parasitaires sont ensuite éliminés par centrifugation. Seul, le liquide surnageant est utilisé pour la sensibilisation des hématies.

Certains de nos essais ont été faits avec de l'antigène qui nous a été remis par le Docteur Jacobs. Nous avons aussi utilisé des préparations faites au Laboratoire de la Toxoplasmose à l'Hôpital Saint-Vincent-de-Paul. La méthode de préparation de l'antigène est pratiquement identique à celle utilisée pour la préparation de l'antigène de fixation du complément (4).

Des souris inoculées depuis trois jours par la souche RH de toxoplasmes sont sacrifiées. L'ascite est recueillie sur héparine pour éviter la coagulation, et la cavité péritonéale des animaux est lavée avec du sérum salé isotonique hépariné. Les ascites et les liquides de lavage sont mélangés et centrifugés dans un tube taré. Le surnageant est rejeté et le culot remis en suspension dans du sérum salé isotonique. Cette opération est renouvelée trois fois pour débarrasser complètement le culot de centrifugation du liquide d'exsudat. Le culot est alors pesé : 100 souris donnent environ un gramme de culot, constitué essentiellement par les parasites et par les cellules de l'exsudat où ils se sont développés.

Ce culot peut être traité immédiatement, ou bien conservé quelques jours congelé avant traitement. Le broyage est effectué dans un broyeur de Potter en présence de dix parties d'eau distillée. Le mélange est ensuite laissé à $+4^{\circ}$ pendant la nuit sous agitation magnétique lente. Le lendemain, le liquide est centrifugé, et le surnageant est additionné d'un volume égal d'eau salée à 17/1 000 pour rétablir l'isotonicité. Cette solution constitue la solution-mère d'antigène au 1/20, elle est conservée au congélateur à -20° . Dans les premiers jours de conservation de cette solution, il se produit une légère floculation. Le floculat doit être éliminé par une nouvelle centrifugation. La solution se conserve ensuite limpide, mais son titre ne reste stable que pendant deux mois environ. La conservation serait certainement meilleure en lyophilisant cet antigène (7).

LA TECHNIQUE

1) Sérum.

La dilution initiale du sérum à tester est inactivée une demi-heure à 56° . Le sérum est ensuite absorbé par des hématies de mouton (une goutte de culot d'hématies est ajoutée à la dilution initiale du sérum à tester), pendant une demi-heure à 37° , puis centrifugé et décanté. Les dilutions ultérieures sont faites à partir de cette dilution initiale en utilisant comme diluant le sérum de lapin à 1 %.

Dans nos essais, la dilution initiale était faite au 1/16, et les dilutions ultérieures de 4 en 4, c'est-à-dire : au 1/64, 1/256, 1/1 024 et 1/4 096. Pour la macrométhode, nous utilisons des tubes à hémolyse en matière plastique transparents, dans lesquels sont répartis 0,5 ml des dilutions sériques. Nos essais de microméthode ont été faits sur plaques de plexiglas, avec répartition de 0,1 ml par alvéole.

2) Préparation des hématies.

a) LAVAGE. — Les globules rouges de mouton frais datant de 48 à 72 heures sont lavés trois fois dans de l'eau physiologique. On en fait une suspension à 2 % dans la solution-tampon pH 7,2.

b) TANNAGE. — La dilution d'acide tannique utilisée doit être telle que les hématies ne s'autohématagglutinent pas. Mais elle doit être proche de cette dilution. En d'autres termes, la dilution d'acide tannique utilisée doit être la plus forte concentration pour laquelle les hématies tannées ne sont pas autothématagglutinables. Avec l'acide tannique Merck, la dilution de 1/20 000 en tampon pH 7,2, nous a donné des résultats satisfaisants. Cette solution est mise en présence d'un volume égal de globules rouges à 2 % pendant un quart d'heure dans un bain-marie à 37°. On centrifuge ensuite à 1 500 tours pendant deux minutes. On lave une première fois avec la solution-tampon pH 7,2 et une deuxième fois avec la solution pH 6,4. Ce lavage au tampon acide prépare les hématies à l'action sensibilisante de l'antigène.

c) SENSIBILISATION. — Les hématies tannées sont remises en suspension et ramenées à 2 % dans du tampon pH 6,4. L'antigène est dilué à son titre dans le même tampon. On mélange un volume égal d'hématies tannées et d'antigène : le mélange est porté au bain-marie à 37° pendant un quart d'heure. On lave ensuite deux fois dans du sérum de lapin à 1 %. Enfin, les hématies sont remises en suspension à 2 % et les globules sont prêts à être utilisés.

Nous avons étudié l'influence de la température du tannage et celle de la sensibilisation. Des essais comparatifs des températures de 4°, 20° et 37° dans une même série de réactions nous ont montré que :

— *la température du tannage* n'a qu'une influence modérée sur les résultats. Ceux-ci sont pourtant meilleurs avec le tannage à 37° qu'à 20° ou à 4° ;

— *la température de sensibilisation* a beaucoup d'importance : la sensibilisation est mauvaise à 4°, médiocre à 20°, bonne seulement à 37°.

3) Répartition.

Aux 0,5 ml de chaque dilution du sérum, on ajoute 0,05 ml (une goutte) de globules rouges sensibilisés à 2 %, ceci pour la macrométhode. Pour la méthode en plaque, les globules rouges sont ramenés à 1 % et un volume de 0,025 ml est ajouté aux 0,10 ml de sérum.

Deux témoins sont effectués pour chaque test : un témoin pour chaque sérum à tester : première dilution initiale du sérum additionnée d'hématies tannées mais non sensibilisées, un témoin pour la série : globules rouges sensibilisés en présence de 0,5 ml de diluant.

4) Lecture.

L'intensité de l'hémagglutination est notée en croix (de 0 à 4) selon Stavitsky (12). Le titre adopté correspond à la dernière dilution du sérum donnant une réaction à deux croix.

d) DIFFICULTÉS DE LECTURE. — Souvent la lecture est facile : les premiers tubes sont positifs à quatre croix, puis d'un tube au suivant l'agglutination diminue franchement (une à deux croix) avant de devenir nulle.

Mais on rencontre parfois des difficultés, celles-ci sont de deux ordres :

a) *Le phénomène de zone*. Il a été surtout observé à la suite d'un tannage insuffisant des hématies (mauvais tannin) ou d'une mauvaise sensibilisation (temps trop bref, température inférieure à 37°). Il s'observe aussi lorsque le titre de l'antigène est insuffisant : ainsi l'apparition de réactions de zone au cours de séries successives d'hémagglutinations peut être l'indication que le titre de l'antigène utilisé s'affaiblit.

b) *Les réactions incomplètes*. Nous désignons ainsi les cas où l'agglutination, qui peut être manifeste même à une dilution forte (1/1 024 par exemple), n'est pourtant totale, à quatre croix, dans aucun tube. La lecture est difficile parce que l'agglutination n'est pas franche, et il est souvent impossible d'avoir une certitude sur le titre du sérum. Ceci est particulièrement fréquent dans la microméthode : sur plaque, les hémagglutinations incomplètes passent pour négatives. Ce type de réaction, comme le phénomène de zone, peut être lié à des erreurs techniques de manipulation, ou à une insuffisance de titrage des réactifs. Mais c'est dans certains cas une caractéristique du sérum : pour certains sujets, quel que soit le soin apporté à l'exécution des tests, les sérums donnent seulement des hémagglutinations incomplètes. On doit tenir compte de l'existence de tels sérums dans le titrage de l'antigène.

5) Titrage de l'antigène.

L'objet de ce titrage est de déterminer la dilution d'antigène la plus favorable pour la sensibilisation des hématies. Il consiste simplement à essayer plusieurs dilutions de la solution-mère, en présence de dilutions progressives de sérums positifs connus.

Certains détails doivent attirer l'attention :

a) Il existe effectivement une concentration de l'antigène optimale pour la sensibilisation des hématies : l'emploi d'une concentration *plus faible*, mais aussi *plus forte*, diminue le degré de positivité du sérum témoin utilisé.

b) L'antigène, à trop forte concentration, tend à rendre les hématies autohémagglutinables ou agglutinables d'une façon non spécifique.

c) Comme nous l'avons vu plus haut, certains sérums positifs ont tendance à donner seulement des agglutinations partielles, à toutes les dilutions, tandis que d'autres sérums sont franchement positifs, donnant quatre croix aux faibles dilutions, et passant en un à deux tubes de quatre croix à négatif.

Il faut tenir compte de l'ensemble de ces points dans le titrage de l'antigène. Pour cela, différents lots d'hématies sont sensibilisés par des dilutions progressives d'antigène allant du 1/5 au 1/30 par rapport à la solution-mère (1/100 à 1/600 par rapport au poids de substance fraîche initiale). Chacune de ces dilutions est essayée avec au moins trois sérums :

- un sérum connu comme négatif au test de lyse et à l'hémagglutination ;
- un sérum positif franc donnant une réaction à quatre croix aux premières dilutions ;
- un sérum positif incomplètement hémagglutinant.

La dilution retenue doit donner :

- une réaction totalement négative avec le sérum négatif ;
- le titre le plus élevé possible avec le sérum franchement positif ;
- une réaction bien lisible avec le sérum incomplètement hémagglutinant.

Comme on le voit, le titre de l'antigène se situe dans une zone critique très étroite qui doit être exactement précisée.

RESULTATS

208 sérums ont été étudiés à une ou plusieurs reprises. Il s'agissait de sérums qui avaient été adressés au Laboratoire de l'Hôpital Saint-Vincent-de-Paul pour séro-diagnostic de la toxoplasmose. Tous avaient été étudiés préalablement par le test de lyse parasitaire, puis conservés au congélateur à -25° . Nous avons pris 33 sérums négatifs au test de lyse et 175 sérums positifs. Ces derniers ont été choisis parmi les malades dont l'histoire clinique et dont les résultats étaient bien compatibles avec une toxoplas-

TABLEAU 1. — Répartition des sérums selon leurs titres respectifs au test de lyse (T.L.T.) et en hémagglutination (H.A.)

H.A.	< 16	16-64	256-1 024	$\geq 4 096$	Total
T.L.T.					
< 10	33				33
10-100	7	2	8	1	18
100-1 000	3	8	19	2	32
$\geq 1 000$	6	25	54	40	125
Total	49	35	81	43	208

mose, soit congénitale, soit acquise. Les résultats sont rassemblés dans le tableau I qui indique la répartition de ces sérums selon les titres respectifs du test de lyse et de l'hémagglutination.

DISCUSSION

Spécificité de la réaction.

Nous pouvons en juger par la comparaison de ces résultats avec ceux du test de lyse. Ce dernier est, on le sait, une réaction étroitement spécifique. Sur 33 sérums négatifs en test de lyse, aucun n'a donné une hémagglutination positive. Il semble donc que la réaction d'hémagglutination ait une bonne spécificité. Certaines publications font mention de sérums dont l'hémagglutination est positive et le Dye-Test négatif (3). De tels faits n'ont jamais été rencontrés au cours de nos expériences.

Sensibilité de la réaction.

La réaction d'hémagglutination passive, en général, est connue pour être extrêmement sensible. Ceci se vérifie dans le cas de la toxoplasmose : nous avons obtenu avec certains sérums des résultats positifs au-delà du 1/100 000. Ces chiffres sont très supérieurs à ceux que permet d'atteindre le Dye-Test.

Fidélité des résultats.

Cette qualité est difficile à obtenir en pratique. Nous avons, en décrivant la technique, insisté sur certains détails dont l'inobservance est cause d'irrégularité : la qualité de l'acide tannique, l'âge des hématies de mouton, la température du tannage et surtout de la sensibilisation des hématies. La qualité de l'antigène et la baisse de son titre après deux mois de conservation sont d'autres facteurs importants de variation. Pourtant, en discutant de la fidélité des résultats, nous devons tenir compte du sérum étudié et de son type réactionnel.

Les sérums franchement hémagglutinants (réaction à 4 + dans les premiers tubes passant en peu de tubes de 4 + à négatif) donnent des résultats régulièrement reproductibles d'une série de tests à l'autre et d'une préparation antigénique à une autre : ainsi, le sérum de référence positif, qui nous a été donné par le Docteur Jacobs, donne dans son Laboratoire un résultat positif au 1/1 024 ; nous trouvons avec ce sérum, dans chaque série, le même chiffre, aussi bien avec l'antigène de Béthesda qu'avec les différents lots d'antigène préparé par nos soins. Pour cette dilution limite de 1/1 024, le résultat est, à une croix près, le même d'une série de tests à l'autre.

Par contre, les sérums incomplètement hémagglutinants montrent des résultats assez infidèles d'une série de tests à l'autre. Ils sont, en particulier, très susceptibles aux écarts de titrage et au vieillissement de l'antigène.

Corrélation avec le Dye-Test.

La simple inspection du tableau de nos résultats montre des discordances importantes des titres du test de lyse et de l'hémagglutination. Ces discordances existent dans les deux sens : certains sérums dont le test de lyse est inférieur au 1/100 ont une hémagglutination supérieure au 1/1 024. D'autres, dont le test de lyse est supérieur au 1/1 000, montrent une hémagglutination négative ou de titre faible.

Il est donc très probable que ces deux réactions correspondent à des anticorps toxoplasmiques différents. Ces discordances ont d'ailleurs déjà été signalées par d'autres (6), mais elles sont plus nombreuses parmi nos résultats. Nous en comprenons aisément la raison : en effet, nos sérums n'ont pas été pris au hasard ; ils ont, au contraire, été sélectionnés parmi des sujets présentant certains syndromes cliniques précis. Comme nous avons été frappé des discordances sérologiques observées chez certains d'entre eux, nous en avons recherché d'analogues chez d'autres sujets dont l'histoire clinique était comparable. La fréquence des discordances dans notre série de sérums est le résultat de cette sélection. L'étude de leur signification est actuellement en cours.

CONCLUSIONS

Nous avons contrôlé les possibilités d'appliquer la réaction de Jacobs et Lunde au diagnostic de la toxoplasmose. Cette réaction d'hémagglutination passive s'est montrée très spécifique et très sensible. Quand certaines précautions sont respectées, elle est aussi relativement fidèle, mais son exécution reste très délicate.

Avec beaucoup de sérums, la concordance entre ces résultats et ceux du test de Sabin et Feldman est bonne. Mais certains sérums montrent des discordances très marquées, si bien que le test d'hémagglutination, qui semble mettre en évidence un anticorps différent, ne doit pas être substitué au test de Sabin et Feldman, dans le séro-diagnostic de la toxoplasmose. Son intérêt, par contre, résiderait ailleurs : il est possible que ses discordances avec le Dye-Test permettent, dans certaines circonstances, de préciser le stade évolutif de l'infection, hypothèse que nous étudions actuellement.

Résumé

1) L'hémagglutination passive appliquée au diagnostic de la toxoplasmose est une réaction d'exécution délicate : les résultats en sont reproductibles seulement si certains détails techniques sont rigoureusement respectés. Leur inobservance conduit à des difficultés de lecture : phénomène de zone et réactions incomplètes.

2) Cependant, même avec une technique bien codifiée, certains sérums montrent des hémagglutinations incomplètes dont le titre précis est difficile à définir.

3) La corrélation qualitative et quantitative entre le test de lyse des parasites et l'hémagglutination est, en général, bonne. Mais il existe des discordances de titre qui laissent penser que ces réactions mettent en évidence des anticorps différents.

4) L'hémagglutination ne saurait ainsi se substituer au test de lyse dans le diagnostic de la toxoplasmose, mais son intérêt résiderait ailleurs : ses discordances avec le Dye-Test pourraient peut-être aider à préciser le stade évolutif de l'infection.

Nous remercions vivement les Docteurs Léon Jacobs et J. S. Rémynton qui nous ont aidé de leurs précieux conseils.

Bibliographie

1. BORDUAS (A. G.) et GRABAR (P), 1953. — L'hémagglutination passive dans la recherche des anticorps antiprotéiques. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 84 : 903.
2. BOYDEN (S. V.), 1951. — The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hémagglutination by anti-protein serum. *J. Exp. Med.*, 93 : 107.
3. CHORDI (A.), WALLS (K. W.) et KAGAN (I. G.), 1963. — Specificity of indirect hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.* 49 : supp. 56.
4. DESMONTS (G.), 1960. — Diagnostic sérologique de la toxoplasmose. *Path. Biol.*, 8 : 109.
5. JACOBS (L.) et LUNDE (M. N.), 1957. — A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.*, 43 : 308.
6. LEWIS (W. P.) et KESSEL (J. F), 1961. — Hemagglutination in the diagnosis of Toxoplasmosis and Amoebiasis. *Arch. Ophthal.*, 66 : 471.
7. LUNDE (M. N.) et JACOBS (L.), 1959. — Characteristics of the toxoplasma hemagglutination test antigen. *J. Immunol.*, 82 : 146.
8. LUNDE (M. N.) et JACOBS (L.), 1958. — A comparison of results of hemagglutination and dye test for toxoplasmosis in a survey of trinidad natives. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 7 : 524.
9. MALONEY (E. D.) et KAUFMAN (H. E.), 1960. — The rapid and convenient detection of toxoplasma antibodies using formaldehyde-treated human erythrocytes. *Am. J. Ophthal.*, 50 : 945/275.
10. PARK (H. K.), 1961. — Toxoplasma hemagglutination test. *Arch. Ophthal.* ; 65 : 184.
11. SABIN (A. B.) et FELDMAN (H. A.), 1948. — Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (toxoplasma). *Science*, 108, 660.
12. STAVISKY (A. B.) et ARQUILLA (E. R.), 1958. — Studies of proteins and antibodies by spécific hemagglutination. *Int. Arch. Allergy*, 13 : 1.

[Institut de Parasitologie, Faculté de Médecine de Paris (Professeur : L. BRUMPT)]

[Laboratoire de la toxoplasmose, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris (D^r G. DESMONTS)]