

ANNALES DE PARASITOLOGIE HUMAINE ET COMPARÉE

Tome XLIII

1968

N° 5

Annales de Parasitologie (Paris), t. 43, 1968, n° 5, pp. 539 à 544

MÉMOIRES ORIGINAUX

Nouvel antigène pour la réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la Toxoplasmose

par Jorge F. YANOVSKY, Oscar C. TRAVERSA, Gabriel A. SCHMUÑIS,
Ana CANTARELLA, Amalia A. PANDIELLA et Michel A. POTHIER

*(Institut de Microbiologie et de Parasitologie, Faculté de Médecine, Université de Buenos-Aires
Paraguay 2155, Buenos-Aires, Argentine)*

Résumé

Dans le présent travail est décrite une nouvelle technique de préparation des antigènes de *Toxoplasma gondii*, sous l'effet de la pression, à partir de toxoplasmes purifiés au moyen de la trypsine. Le toxoplasme a été soumis à des pressions de 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 et 25.000 PSI, cette dernière (25.000 PSI) étant la seule capable d'effectuer à 100 % la rupture des toxoplasmes.

L'antigène Fixateur du Complément a été obtenu en soumettant à une pression de 25.000 PSI une suspension de toxoplasmes purifiés au moyen de la trypsine utilisée à la concentration de 20 mg par ml.

Grâce à cette technique il est possible d'obtenir un antigène de titre supérieur ayant une spécificité et une sensibilité égales à celles obtenues par d'autres procédés.

Resumen

En el presente trabajo se describe una nueva técnica de preparación de antígenos de *Toxoplasma gondii*, por efecto de la presión, a partir de toxoplasmas purificados por medio de tripsina. El toxoplasma fue sometido a presiones de 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 y 25.000 PSI, siendo la de 25.000 PSI la única capaz de romper el 100 % de los toxoplasmas.

El antígeno fijador de complemento se elaboró, sometiendo a una presión de 25.000 PSI una suspensión de toxoplasma purificado por medio de tripsina en una concentración de 20 mg por cm³.

Con esta técnica es posible obtener un antígeno de mayor título con igual especificidad y sensibilidad a la obtenida por otro procedimiento.

Summary

A new technic of preparation of *Toxoplasma gondii* antigens, using trypsin purified toxoplasms under pression, is described.

Among the pressions experimented (5.000, 10.000, 20.000 and 25.000 PSI), only one (25.000 PSI) was proved to be able to break off 100 % of the toxoplasms.

The antigen fixator of the complement was obtained by using a suspension of trypsin purified toxoplasms, at 25 mg/ml concentration, under a pression of 25.000 PSI.

By this method, an antigen of higher titration, with a specificity and a sensitiveness equal to those obtained by other technics, can be produced.

Introduction.

La grande importance que l'on donne à l'infection toxoplasmique depuis plus de quinze ans dans la pratique médicale, et la valeur réelle que possède la réaction de Fixation du Complément pour déterminer l'activité probable du processus, a fait que de nombreux travaux ont porté sur la manière de produire des antigènes suffisamment sensibles et économiques pour que la réaction passe en routine.

En 1937, Nicolau et Ravelo (1) ont utilisé des extraits de cerveau de souris ou de rate d'animaux infectés.

Warren et Russ (2) en 1948, proposèrent pour la première fois l'utilisation d'extrait de chorio-allantoïde de poulet inoculé, sept jours avant avec *Toxoplasma gondii*. Mac Donald (3), un an plus tard, utilisa le même matériel congelé et décongelé pour lyser les toxoplasmes en utilisant les fractions solubles et insolubles, tandis que Sabin utilisait un antigène de caractéristiques similaires, n'utilisant que la fraction soluble (4).

En opposition à ces antigènes provenant d'organes d'animaux infectés ou d'embryon de poulet inoculé avec *Toxoplasma*, Steen et Kass en 1951 (5), obtinrent l'antigène pour la Fixation du Complément à partir d'exsudat péritonéal de souris infectées ; une méthode similaire fut utilisée par Desmond (6) et Garin (7).

La méthode la plus utilisée pour produire la rupture des Toxoplasmes fut la congélation et décongélation (5), quoique certains auteurs utilisent aussi les ultra-sons (8), ou l'eau distillée (6).

Comme antigène on utilise soit la fraction soluble (5), soit la fraction soluble et insoluble (6).

Dans ce travail nous présentons les résultats obtenus avec un antigène Fixateur du Complément à partir de Toxoplasmes purifiés, rompus par la pression, à basse température, provenant d'exsudat péritonéal de souris infectées.

Matériel et Méthodes.

On a utilisé les Toxoplasmes de la souche Santiago, provenant d'exsudat péritonéal de souris Rockland pesant plus de 30 g., inoculées avec 0,25 cm³ d'une suspension de toxoplasme avec 10.000 UI de Pénicilline et 0,05 mg de Streptomycine par ml. (la suspension inoculée contenait 15 toxoplasmes par champ microscopique observé avec un objectif $\times 40$ et un oculaire $\times 10$, d'un microscope Leitz Laborlux).

Les souris furent sacrifiées le quatrième jour après l'inoculation. On a extrait l'exsudat sans héparine à cause du pouvoir anticomplémentaire de celle-ci. Les exsudats hémorragiques furent éliminés.

Une fois l'exsudat recueilli, il a été lavé quatre fois avec du sérum physiologique 0,15 M. à 4° C°.

Le dernier culot constitué par les toxoplasmes et les cellules de l'exsudat péritonéal est remis en suspension dans dix fois son volume d'une solution de trypsine à 0,25 % de sérum physiologique 0,15 M, le laissant à 37° C° avec agitation périodique pendant une heure, ensuite le matériel a été centrifugé pendant dix minutes à 2.000 g., on obtient ainsi un culot constitué par les toxoplasmes et de très petits restes cellulaires.

Le culot est lavé quatre fois avec du sérum physiologique 0,15 M. pour éliminer les restes cellulaires et la trypsine.

Le toxoplasme pur ainsi obtenu et remis en suspension dans du sérum physiologique 0,15 M. jusqu'à l'obtention d'une concentration de toxoplasmes de 20 mg par cm³ de poids humide et fut soumis à des pressions de 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 et 25.000 PSI ; on a utilisé un désintégrateur cellulaire de SORVALL-RIBI RFJ, en maintenant la température constante au niveau de l'orifice de rupture au moyen de gaz inertes et tout le système fonctionnant à 4° C°.

On a déterminé la proportion de toxoplasmes rompus aux différentes pressions à l'aide d'une cellule de Neubauer.

Le matériel utilisé comme antigène Fixateur du Complément est obtenu par rupture du toxoplasme à 25.000 PSI, qui est ensuite centrifugé à 12.000 g. à 4° C° pendant trente minutes pour éliminer la fraction insoluble titrée par la technique d'Hémolyse

à 50 % utilisant 5U de complément hémolytique mis en présence d'un sérum positif au 1/64.

Le sérum de cobaye utilisé comme source de complément donnait des réactions négatives pour le diagnostic de la toxoplasmose (Hémagglutination, Sabin et Feldman, Agglutination simple et Fixation du Complément) (10).

Pour les épreuves de sensibilité on utilisa des sérums humains pris au hasard dans un service d'Hémothérapie (Hôpital Israélite, Buenos-Aires) et conservés à $-20^{\circ}\text{C}^{\circ}$, jusqu'à leur utilisation.

L'étude comparative a été réalisée avec un antigène produit par la technique de Steen et Kass (5).

Résultats :

La trypsinisation a démontré être une méthode très efficace pour purifier les toxoplasmes (11). Par gramme, de poids humide, de culot d'ascite de souris (toxoplasme plus cellulés) on a pu obtenir 295 mg, de poids humide, de toxoplasmes purs.

On a démontré qu'il était nécessaire d'avoir une pression supérieure pour la rupture de ce parasite à celle requise pour les formes de culture de *Trypanosoma cruzi* (12) et de *Trypanosoma equineum* (13).

L'étude effectuée a démontré que 100 % des toxoplasmes sont détruits avec une pression de 25.000 PSI, 69 % avec 20.000 PSI, 33 % avec 15.000 PSI et 8 % avec 10.000 PSI (Tableau I).

TABLEAU I
EFFET DE LA PRESSION SUR *Toxoplasma Gondii*

Pression en P.S.I.	Pourcentage de toxoplasmes rompus
5.000	0
10.000	8
15.000	33
20.000	69
25.000	100

Les résultats obtenus nous ont conduit à choisir la pression de 25.000 PSI comme pression minima de rupture pour la préparation d'antigènes Fixateurs du Complément de *Toxoplasma gondii*.

Le titre Fixateur du Complément pour ce matériel antigénique a été de 1/100.

Dans le tableau II on peut observer le résultat type de six déterminations effectuées par la Fixation du Complément à 50 % d'Hémolyse. Le titre de l'antigène n'a

TABLEAU II

TABLEAU TYPE DE TITRAGE DE L'ANTIGÈNE POUR LA FIXATION DU COMPLÈMENT
 POUR LE DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE UTILISANT
 5 UNITÉS HÉMOLYTIQUES DE COMPLÈMENT

Dilutions du sérum

Dilutions de l'antigène		4	8	16	32	64	Testigo
	1 : 10	0	0	3	11	14	80
	1 : 20	0	0	9	15	19	98
	1 : 30	4	5	12	18	25	100
	1 : 40	12	11	10	24	29	100
	1 : 50	17	14	16	26	30	100
	1 : 60	21	20	23	30	34	100
	1 : 70	20	25	29	30	39	100
	1 : 80	24	23	31	35	42	100
	1 : 100	26	28	34	37	46	100
	1 : 120	34	45	54	53	62	100
	1 : 150	49	66	72	68	77	100
1 : 200	61	75	80	80	100	100	

pas changé à $-70^{\circ} \text{C}^{\circ}$, pendant six mois et baissa de moitié pendant la même période mais conservé à $-20^{\circ} \text{C}^{\circ}$.

Les résultats des épreuves comparatives ont été similaires pour les deux antigènes : 6 % de positifs. Ces trente sérums donnèrent des titres en Hémagglutination et en Agglutination simple qui variaient entre 1/256 et 1/2048 (10).

Discussion :

Le matériel antigénique obtenu par la méthode précédemment exposée a démontré être plus efficace que ceux obtenus jusqu'à présent les titres desquels, n'excèdent pas 1/35, ceux-là présentant souvent un fort pouvoir anticomplémentaire.

Il est probable que ces inconvénients devraient pouvoir être éliminés en utilisant une concentration adéquate de toxoplasme pur, totalement rompu.

La trypsinisation est une méthode plus simple que celle décrite par Fulton (15), permettant d'obtenir les toxoplasmes libres des autres cellules de l'exsudat, puisque la trypsine agit sur des cellules partiellement lésées.

La pression effective de rupture (25.000 PSI) a démontré une analogie dans la résistance à la pression avec *Escherichia coli* (16).

La rupture totale du toxoplasme sous l'effet de la pression libéra tous ses antigènes, évitant ainsi la dénaturation protéique par le refroidissement au niveau de l'orifice de rupture, étant tous les deux d'importance vitale si l'on veut conserver toutes les qualités de la préparation.

Le titre élevé des antigènes obtenus par cette méthode, qui a déjà démontré son efficacité dans la préparation de l'antigène Fixateur du Complément pour le *Trypanosoma cruzi* (12), serait probablement dû au fait que la fraction totale de la membrane du toxoplasme permet la solubilisation de tous ses constituants.

En ce qui concerne la sensibilité, celle de cet antigène est similaire à celle de l'antigène produit par la technique de Steen et Kass (5).

Bibliographie

1. NICOLAU y RAVELO, 1937. — *Bull. Soc. Path. exot.*, 30 : 855.
2. WARREN (J.) y RUSS (S. B.), 1942. — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 51 : 11-14.
3. MAC DONALD (A. A.), 1949. — *Lancet*, 256 : 950-953.
4. SABIN (A. B.), 1949. — *Pediatrics*, 4 : 443-453.
5. STEEN (E.) y KASS (E.), 1961. — *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 28 : 36-39.
6. DESMOND (G.), 1961. — *Ann. Biol. Clin.*, 19 : 13-29.
7. GARIN (J. P.), 1962. — *Rev. Hyg. Med. Soc.*, 20 : 519-566.
8. WESTPHAL (A.) et ZISCHR (F.), 1951. — *Tropenmed u Parasitol.*, 3 : 191-204.
9. KABAT (T.) et MEIER (E.), 1963. — *Tecnics in Immunochemistry*, Jhon Walley.
10. Mira Gutiérrez (J. A.), 1965. — *Med. Trop.*, 41 : 418-489.
11. YUKINORI Tsunematsu, 1960. — *Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.*, 9 : 556-561.
12. GONZALEZ (S. M.), SCHMUNIS (G. A.), TRAVERSA (O. C.), YANOVSKY (J. F.); ETCHEVERRY (M. E.) et GARAVELLI (H. J.), 1966. — *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 42 : 78-84.
13. YANOVSKY (J. F.). — Comunicación no publicada.
14. DOMÍNGUEZ Carmona (M.), 1961. — *Rev. Ibérica Parasit.*, 21 : 13-62.
15. FULTON (J. D.), TURK (J. L.), 1959. — *Lancet II* ; 1068-1069.
16. DUERRE (J. A.), RIBI (E.), 1963. — *Applied Microbiol.*; 11 : 467-471.