

# Chapitre 8

## Techniques d'agglutination

Les techniques d'agglutination peuvent être mises en œuvre pour dépister soit les anticorps (Ac), soit les antigènes (Ag). Leur principe repose sur la mise en évidence d'un agglutinat résultant de la réaction entre des Ac et un Ag sous forme particulière [3].

L'agglutination directe active résulte de la formation de complexes immuns entre un Ag naturellement particulaire (Ag figuré) et les Ac lui correspondant. Dans l'agglutination dite passive, un Ag soluble est rendu particulaire par couplage à un support inerte, soit organique, tel que des globules rouges humains ou animaux (réaction d'hémagglutination), soit synthétique (principalement réaction au latex). À l'opposé, dans ce dernier cas, des Ac peuvent être greffés aux particules de latex en vue de la détection d'Ag dans les échantillons biologiques testés.

Les avantages des techniques d'agglutination sont la simplicité d'exécution, l'équipement modeste, le faible volume d'échantillon généralement requis, la réalisation de la réaction à température ambiante, la lecture possible à l'œil nu et, pour les latex notamment, la rapidité d'obtention du résultat, mais leur lecture peut être délicate.

### Agglutination directe

---

#### Indications

L'agglutination directe s'adresse plus particulièrement au sérodiagnostic de protozooses pour

lesquelles la recherche directe du parasite est de peu d'intérêt ou difficile.

#### Mise en œuvre

La préparation de la suspension antigénique influence les performances du test : seuls les Ag de surface sont accessibles et il peut être nécessaire d'utiliser des traitements enzymatiques et/ou chimiques pour démasquer des épitopes remarquables et sensibiliser ainsi la technique. Réalisée sur des cartes à usage unique (dépistage) ou dans les puits d'une microplaque, la technique permet un résultat qualitatif (présence/absence d'Ac), ou semi-quantitatif. Dans ce dernier cas, des dilutions sérielles de sérum (ou autre échantillon) sont réalisées et le titre en Ac correspond à la dernière dilution du sérum où une agglutination nette est observée. La technique peut permettre une détection des Ac globaux, ou des Ac IgG seuls après action d'agents dénaturants, ou d'Ac sélectifs IgM ou IgA, voire IgE, par immunocapture préalable de ces isotypes en microplaques.

#### Détails techniques

Pour les techniques en microplaques, une incubation de plusieurs heures est nécessaire afin d'obtenir la sédimentation des particules dans les réactions négatives.

Un *phénomène de prozone* peut se produire lorsque les Ac en excès entrent en compétition

pour occuper les sites antigéniques disponibles, la saturation des sites empêchant la réaction : on n'observe pas d'agglutination dans les faibles dilutions alors qu'on l'observe pour les dilutions supérieures. Pour déjouer l'éventuelle prozone en simple dépistage, *il convient de tester l'échantillon à deux dilutions, l'une faible (voire aucune dilution), et l'autre élevée (exemple 1/100).*

Par ailleurs, un traitement du sérum, ou autre échantillon, par le 2-mercaptoéthanol (2ME) ou le 1,4-dithiothréitol (DTT), permet d'éliminer la réponse due aux IgM (par destruction des ponts disulfures et donc perte du caractère pentavalent des IgM nécessaire à leur interaction avec l'Ag).

L'aptitude à la lecture de l'agglutination sur carte ou en microplaque demande une formation minimale.

## Exemples d'applications en parasitologie-mycologie

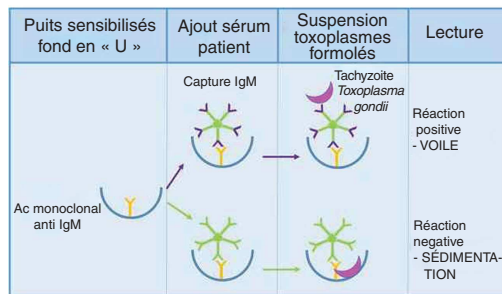
En parasitologie, plusieurs tests font l'objet de troussees commercialisées :

- test sur carte pour le dépistage de masse de la trypanosomose à *Trypanosoma brucei gambiense* en Afrique ;
- détection et titration en microplaque des IgG antitoxoplasmiques (destruction des IgM par le 2ME) par technique d'agglutination directe haute sensibilité [1]. La sensibilité de cette dernière se rapproche du *dye-test* ou test de lyse (technique de référence), avec une bonne sensibilité et une détection précoce des séroconversions, permettant la comparaison des titres entre divers échantillons, notamment humeur aqueuse et sérum pour calcul du ratio

de leur charge immunitaire [2]. Enfin, cette technique est utilisable avec le sérum d'autres espèces, en particulier pour dépister la séroconversion de souris inoculées par des produits pathologiques (tels que le liquide amniotique ou le placenta lors d'une suspicion de transmission maternofoetale de la toxoplasmose ; voir chapitre 27) ;

- technique ISAGA (*immunosorbent agglutination assay*) pour la recherche des Ac IgM (ou IgA) antitoxoplasmiques. L'échantillon de patient est déposé dans trois puits adjacents d'une microplaque tapissée d'Ac monoclonal antichaine mu (ou alpha) humaine, provoquant une première réaction de capture des isotopes IgM (ou IgA). Après lavages, l'addition d'une suspension de toxoplasmes entiers figurés en quantité croissante dans les trois puits successifs se traduit par une sédimentation des parasites en l'absence de l'isotype spécifique, tandis que la présence d'IgM (ou IgA) antitoxoplasmiques entraîne un voile d'agglutination. En augmentant le nombre de parasites, il y a saturation des complexes immuns et sédimentation proportionnelle des parasites libres. Cette propriété est exploitée pour rendre compte de la présence ou non des Ac IgM (ou IgA) sous forme d'un score semi-quantitatif, les résultats étant exprimés en nombre de croix par puits, de 0 (sédimentation complète des parasites, aucun voile d'agglutination) à 4+ (agglutination totale), soit un score total allant de 0 à 12 sur l'ensemble des trois puits pour un patient.

Contrairement à son usage répandu pour les sérotypages de bactéries, il n'y a pas d'application marquante de l'agglutination directe active en mycologie (figure 8.1).



**Figure 8.1.** Représentation schématique du principe de la technique d'immucapture IgM pour la toxoplasmose.

## Agglutination passive avec hémagglutination

### Indications

De faible coût, facile à exécuter et à interpréter, l'hémagglutination reste une technique courante pour le sérodiagnostic de parasitoses et mycoses autochtones ou d'importation. Néanmoins, le résultat ne doit pas être interprété isolément en raison de sensibilité et spécificité variables.

### Mise en œuvre

L'hémagglutination procède du même principe que l'agglutination directe active, mais elle ouvre des perspectives considérables puisque l'Ag exposé, soluble, peut être de toute origine. À côté des nombreuses trousse d'hémagglutination commercialisées, des tests d'hémagglutination « maison » concernant des Ag non disponibles dans le commerce peuvent être développées par les équipes de parasitologie et mycologie.

Les contraintes sont ici essentiellement liées aux propriétés des hématies. Leur durée de vie moyenne, environ 120 jours, peut être prolongée au-delà d'un an par action du formol : on parle d'hématies stabilisées. De plus, les globules rouges portent à leur surface de nombreux Ag susceptibles de réagir avec d'autres Ac que ceux recherchés. Pour cette raison, on emploie des hématies humaines du groupe O Rh- ou des hématies d'une autre espèce (mouton, poulet, dinde) limitant les réactions croisées.

La fixation des Ag sur le globule rouge stabilisé s'effectue généralement par fixation chimique (avec du glutaraldéhyde), ou par mécanisme immunologique par le biais d'IgG anti-hématie de l'espèce concernée.

### Détails techniques

Les recommandations décrites pour l'agglutination directe s'appliquent à l'hémagglutination, y compris le phénomène de prozone. S'y ajoute l'éventualité d'une réaction entre les hématies d'origine animale et des Ac hétérologues présents

dans le sérum. Aussi est-il préconisé d'inclure un témoin sérum avec des érythrocytes de l'espèce impliquée dépourvus de l'Ag cible. En cas d'agglutination du sérum testé avec les hématies témoins, il est nécessaire d'adsorber préalablement les Ac hétérologues du sérum avant de réaliser le test sur les hématies sensibilisées.

Le traitement éventuel du sérum par le 2ME ou le DTT est recommandé dans les suspicions d'infection récente, la réaction réalisée simultanément sur l'échantillon natif et le même échantillon après traitement permettant d'apprécier la présence d'IgM ; cette possibilité n'a d'application que dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose. En raison de l'utilisation d'Ag solubles, la détection des IgG est alors plus tardive en hémagglutination que dans les techniques faisant appel aux Ag de surface.

La titration en hémagglutination repose sur le principe de dilutions sérielles du sérum, mais les seuils d'interprétation sont variables d'un pathogène à l'autre, et d'une trousse à l'autre.

## Exemples d'applications en parasitologie-mycologie

### En parasitologie

Des trousse commercialisées sont disponibles pour le diagnostic de l'amébose, la schistosomose, la distomatose, l'hydatidose et la toxoplasmose. Cependant, la sensibilité limitée de cette technique fait qu'elle est progressivement remplacée par des techniques ELISA ou Western blot dont les performances sont supérieures.

### En mycologie

Des trousse commercialisées sont disponibles pour le diagnostic de candidose et d'aspergillose, dont la sensibilité est parfois limitée.

## Agglutination passive avec particules de latex

### Indications

Les tests au latex conviennent généralement aux situations de diagnostic rapide, éventuellement

en tests d'orientation à confirmer par d'autres méthodes.

## Mise en œuvre

La fixation d'Ag solubles ou d'Ac, sur les particules de latex est une réaction par contact. Les particules de latex présentent les mêmes avantages que les hématies, sans l'inconvénient de réagir avec les Ac hétérologues, et sans risque de perdre leur fonction en s'hémolysant avec le temps ou en cas d'insuffisance de stabilisation.

Les réactions d'agglutination au latex s'appliquent à différents milieux biologiques, après un éventuel prétraitement (tel qu'une incubation à haute température) indiqué dans la notice selon la trousse commercialisée. Concernant le sang, pour éviter une interférence due au facteur rhumatoïde ou à des complexes immuns, le prétraitement du sérum par la pronase (fournie dans la trousse) est recommandé dans certains cas.

## Détails techniques

L'agglutination de particules de latex est particulièrement indiquée pour un dépistage rapide de la présence d'Ac ou d'Ag dans un milieu biologique donné. Le phénomène de prozone étant toujours à redouter, il est préférable de réaliser deux tests, avec l'échantillon pur d'une part, et suffisamment dilué avec le tampon fourni d'autre part, selon les recommandations du fabricant.

Les facteurs pouvant influencer sur la réaction du latex sont essentiellement le pH du tampon de réaction, la température de réalisation, les réactifs et échantillons devant être amenés à température ambiante. De plus, le temps de réaction et le mouvement de rotation continue sont importants à respecter. Ces éléments sont faciles à maîtriser, et les trousse d'agglutination de latex commercialisées fournissent le matériel (très simple) et les tampons indispensables.

Un dépistage positif peut être complété par une réaction de titration en testant des dilutions sérielles de l'échantillon.

Il convient de faire attention aux modalités de lecture, une réaction positive devant correspondre à un éclaircissement de la zone centrale de réaction.

Dans tous les cas, l'aspect du sérum doit être pris en considération, des réactions faussement positives pouvant être observées en cas de forte hémolyse, d'hyperbilirubinémie ou d'hyperlipémie par exemple.

Les tests d'identification rapide de levures ne présentent en général pas de difficulté d'exécution ni d'interprétation.

## Exemples d'applications en parasitologie-mycologie

### En parasitologie

Les applications sont restreintes ; citons la recherche d'Ac dans la toxoplasmose, où le test au latex est utilisé par certains laboratoires comme test d'orientation.

### En mycologie

Les applications des tests au latex sont variées en mycologie, soit pour l'identification de levures (résultat en quelques minutes à partir d'une colonie isolée), soit pour la recherche d'Ag, en premier lieu dans le LCR pour le diagnostic de cryptococcose méningée, avec recherche concomitante d'Ag circulants dans le sérum.

## Références

1. Desmots G. Detection of toxoplasmosis by agglutination of parasites. Value of a very sensitive antigen in the search for specific immunoglobulin G. *Ann Biol Clin (Paris)* 1983;41:139-43.
2. Desmont G. Definitive serological diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Arch Ophthalmol* 1966;76:839-51.
3. Golvan YJ, Ambroise-Thomas P. Nouvelles techniques en parasitologie. 2<sup>e</sup> ed. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 1990.