

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de RELIZANE
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département : Sciences Biologiques



جامعة غليزان
RELIZANE UNIVERSITY

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER 2 en :
Parasitologie

Intitulé

Evaluation des performances du test d'agglutination modifié (MAT)
par rapport à un test référence utilisé pour la toxoplasmose humaine.

Présenté par :

Mme :ADDA Fatima Zohra

Mme :BENAICHA Khadija

Devant les membres de jury :

Président : Mme Maître de conférence B (U. Relizane)

Encadreur : MrAROUSSI Abdelkrim Maître de conférence B (U. Relizane)

Co-encadrant : Mme Ait Ouazzou Aldjia

Examineur : Mlle Maître de conférence B (U. Relizane)

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Je remercie ALLAH le tout puissant de m' à avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Dr AROUSSI Abdelkrim, je le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire.

J'adresse mes remerciements et ma gratitude au Co-encadrante

« Ait Ouazzou Aldjia ».

Mes sincères remerciements à mesdames les membres de jury pour l'honneur qu'elles nous font en participant Au jugement de ce travail.

Je remercie sincèrement tous les enseignants du département dessciences biologiques de la Faculté des sciences et de la Technologie de l'Université de Relizane.

Mes profonds remerciements vont également à toutes les personnesqui ont m'aidés et soutenue de près ou de loin.

Enfin, et en particulier, merci à moi-même.

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre amour, à votre patience, à vos innombrables sacrifices et pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis.

Que ce modeste travail, soit pour vous une petite compensation et reconnaissance envers ce que vous avais fait d'incroyable pour moi.

À ma chère sœur

Asma que j'aime profondément et que ALLAH les protège.

À mes frères

Miloud, Abdallah, Hamza et Mohamed à ceux qui ont toujours été soutien et mon appui à chaque étape que j'ai franchie.

À ma Grand famille paternelle Ben Aïcha et maternelle Benzakroufa.

À mes belles-sœurs

Wassila, Soumia et Sabrina.

À mes neveux et nièces

Khadidja, Hajar, Idriss, Oumaima, Mohamed et Ahmed.

*A tous qui ont contribué dans ma formation depuis mon enfance.
Toutes personnes que je n'ai pas citées mais que je porte dans mon cœur et à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.*

KHADIDJA

Dédicaces

Grâce à Allah, et aux personnes qui m'ont soutenu, je n'ai pas pu

Terminer ma carrière universitaire de 17 ans. Mes plus vifs

Remerciements et toute ma reconnaissance vont tout d'abord :

À mon cher mari Hamid Merci d'avoir toujours été là pour moi.

Merci de me pousser à être meilleur chaque jour. Merci d'être

Meilleur partenaire d'aventure. Merci d'être là pour sécher mes Larmes.

À mon cher père : Peu importe ce que je dis, je ne peux pas dire

Merci correctement. Votre affection m'a enveloppé, votre gentillesse

*M'a guidé, et être à vos côtés a été la source de ma force pour surmonter
divers obstacles.*

À ma chère mère : Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai

Point te remercier comme il se doit. Votre affection m'a enveloppé,

*Votre gentillesse m'a guidé et votre présence a été la source de ma Force
pour surmonter diverses difficultés.*

À mon petit frère Mohamed Nadir et ma grande sœur Souad et

Leur petite famille À mon neveu Mohamed Adam.

*À mes chères amies Wassila et Zohra et tous ceux qui m'ont
Soutenu et encouragé : Je vous souhaite sincèrement succès,
Bonheur, santé et prospérité.*

FATIMA ZOHRA

TABLE DES MATIERES

Liste D'abréviations

Listes Des Figures

Liste Des Tableaux

Résumé

Introduction.....1

CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique

1. La Toxoplasmose	6
2. Taxonomie	6
3. Morphologie	7
4. Cycle Parasitaire	9
5. Mode de contamination	13
6. Aspects Cliniques	14
7. Le diagnostic de la toxoplasmose.....	17
8. Traitement.....	20
9. Prophylaxie.....	21
10. Vaccination.....	22

CHAPITRE II : Matériels Et Méthodes

1. Objectif De L'étude.....	24
2. Technique Sérologique.....	24
3. Dépistage Des IgG Spécifiques Chez Les Primates Par La Méthode D'agglutinationDirecte Modifiée (MAT)	26
4. Teste De Référence : (ECLIA).....	29

CHAPITRE III : Résultats Et Discussion

1. Résultats.....	32
❖ Résultats De Test D'agglutination Modifié MAT.....	32
❖ Résultat De Test Référence.....	33
❖ Synthèse Des Résultats.....	35
2. Discussion.....	40
Conclusion.....	42

REFERENCES

ANNEXE

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps.

Ag : Antigène.

AMM : Autorisation de mise sur le marché.

ECLIA : Electrochimiluminensce.

ELISA : Enzyme LinkedimmunoAssay

ETF : Echographie transfontanellaire.

FN : Faux négatifs.

FP : Faux positifs.

Ig : Immunoglobuline.

IgG, IgM : Immunoglobulines G, Immunoglobulines M.

LBA : Lavage bronchoalvéolaire.

LCR : Liquide céphalo-rachidien.

MAT : Test d'agglutination modifié.

PCR : Polymérase chaine réaction.

VN : Vrais négatifs.

VP :Vrais positifs.

WB : Western Blot.

LISTES DE FUGURES

Figure 1 : Schéma d'un bradyzoite (Droite) et d'un tachyzoite (Gauche) (Dubey, 1998).

Figure 2 : Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique (Dubey et al., 1998).

Figure 3 : Cycle de vie de *T.gondii* (AMBROISE, 1998).

Figure 4 : Cycle de *T.gondii* et voies de contamination de l'homme (Esch et Petersen, 2013).

Figure 5 : Lésion rétinobulbaire chez un patient atteint de toxoplasmose oculaire (SHOBAB et al., 2013).

Figure 6 : Toxoplasmose de l'immunodéprimé (Anofel, 2014). (A) Abscès cérébral (B) Chorioretinite toxoplasmique.

Figure 7 : Histoplasmose pulmonaire : une miliaire thoracique (Garin et al., 2020).

Figure 8 : La forme majeure : encéphalo-méningomyélite (Dubey et Beattie, 1988).

Figure 9 : Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l'atteinte de l'enfant, en fonction de la période de primo-infection de la mère (SENEGAS, 2007).

Figure 10 : Matériels utilisés au niveau de laboratoire pédagogique.

Figure 11 : Réactifs utilisés au niveau de laboratoire.

Figure 12 : Les sérums diluent.

Figure 13 : La réalisation de la technique MAT.

Figure 14 : Résultats obtenus après l'incubation de microplaque.

Figure 15 : Résultat de l'analyse statistique.

Figure 16 : Valeur de la sensibilité et spécificité du test MAT.

Figure 17 : Représentation de fiabilité du test MAT.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Résultat de test MAT.

Tableau 02 : Les résultats obtenus par laboratoire privé.

Tableau 03 : Comparaison entre les deux résultats.

Tableau 04 : La détection des anticorps anti *T.gondii* par le MAT et par ECLIA.

Tableau 05 : Types d'accord et déviation de résultats entre les méthodes de référence et MAT.

RESUME

La toxoplasmose est une zoonose qui a fait l'objet d'études dans le monde entier. L'homme est considéré comme un hôte intermédiaire. Les méthodes de diagnostic sont des outils importants pour la surveillance et le contrôle de la maladie. Dans cette étude, les performances du test d'agglutination modifiée (MAT) dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose humaine ont été évaluées et comparées à test électrochimiluminescence (ECLIA). Un échantillon de sérum positif pour *Toxoplasma gondii* dilué 10 fois, de 1/10ème jusqu'à 1/200ème avec le PBS a été analysé par MAT et a présenté une sensibilité de 45% et spécificité de 100%. Selon la synthèse des résultats il existe une disparité de 55% et une concordance de 45% entre les deux méthodes.

Ce résultat serait idéal pour être utilisé comme un test de dépistage dans le cas de l'étude épidémiologique d'une population et pas comme un test d'examen clinique c'est pour l'application facile.

Mots clés : Toxoplasmose, Test d'agglutination modifiée (MAT), Electrochimiluminescence (ECLIA), *Toxoplasma gondii*, Test de dépistage.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis that has been studied worldwide. Humans are considered intermediate hosts. Diagnostic methods are important tools for the surveillance and control of the disease. In this study, the performance of the modified agglutination test (MAT) in the serodiagnosis of human toxoplasmosis was evaluated and compared to the electrochemiluminescence test (ECLIA). A serum sample positive for *Toxoplasma gondii*, diluted 10 times from 1/10 to 1/200 with PBS, was analyzed by MAT and showed a sensitivity of 45% and a specificity of 100%. According to the synthesis of results, there is a disparity of 55% and a concordance of 45% between the two methods. This result would be ideal for use as a screening test in epidemiological studies of a population, rather than as a clinical examination test due to its ease of application.

Keywords : Toxoplasmosis, Modified agglutination test (MAT), Electrochemiluminescence (ECLIA), *Toxoplasma gondii*, Screening test.

INTRODUCTION

La toxoplasmose est une zoonose présente à l'échelle mondiale, causée par un parasite ubiquiste nommé *Toxoplasma gondii*. Elle représente sans doute l'une des affections parasitaires les plus répandues à travers le monde, affectant toutes les régions et pouvant contaminer de nombreuses espèces animales homéothermes et humaines. Des études épidémiologiques menées chez l'homme ont démontré sa distribution géographique étendue ainsi que sa prévalence significative.

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite à multiplication intracellulaire obligatoire ; c'est l'un des parasites les plus courants et les plus répandus chez l'homme, dont l'hôte définitif est le chat considéré comme un premier facteur de risque par la sécrétion des oocystes qui contaminent l'environnement et infectent de nombreux autres mammifères (Ambroise, 1998).

La position systématique la plus admise de *T. gondii* a été précisée en 1988 par Levine. Ce protozoaire se développe dans les cellules du système réticulo-histiocytaire et peut provoquer des lésions tissulaires. Notamment, *T. gondii* marque un phénomène de perfection des organes appelé "**Tropisme parasitaire**" tels que (le système nerveux central, la rétine, les ganglions et les muscles...).

L'infection toxoplasmique existe sous trois formes : la toxoplasmose acquise ; habituellement bénigne et très souvent inapparente, la toxoplasmose congénitale ; responsable de fœtopathies graves et enfin la toxoplasmose de l'immunodéprimé (Ambroise, 1998).

Cette infection se produit le plus souvent par ingestion de viande infectée par les bradyzoïtes ou bien par la consommation des aliments souillés par des oocystes (Légumes, fruits, eau...) et par transmission congénitale de la mère au fœtus. Elle est très fréquente et confère une immunité protectrice, elle est habituellement sans gravité pour l'adulte immunocompétent, elle peut être redoutable chez l'immunodéprimé (sidéen ou greffé) ou en cas d'atteinte fœtale lors de la séroconversion chez une femme enceinte (toxoplasmose congénitale).

L'incidence de la toxoplasmose au sein de la population générale est difficile à estimer, principalement parce que l'infection est souvent asymptomatique. Cependant, elle peut entraîner des complications sévères chez les individus immunodéprimés ainsi que dans sa forme congénitale. Pendant la grossesse, le risque de transmission augmente avec l'avancement de la gestation, bien que la gravité des atteintes chez le fœtus tende à diminuer.

En cas de séroconversion durant le premier trimestre, le risque de toxoplasmose congénitale varie de 4 à 14 % et se manifeste par des atteintes sévères. Ce risque s'élève à 70 à 80 % au cours du troisième trimestre de grossesse, mais se traduit généralement par des formes infra-cliniques chez le nouveau-né (MONTROYA et REMINGTON, 2008).

Dans les pays développés, la contamination est principalement attribuée à la consommation de viande infectée mal cuite. La prévalence est généralement basse, souvent inférieure à 25%, dans les régions où la viande est consommée bien cuite, telle que le Royaume-Uni, la Scandinavie et l'Amérique du Nord et l'Afrique du Nord. En France et en Allemagne, où les habitudes de consommation incluent souvent des viandes saignantes ou fumées, les taux de prévalence sont plus élevés, se situant entre 40 et 60%.

En Asie du Sud-Est et au Japon, la prévalence de la toxoplasmose est très faible, généralement inférieure à 10%. Elle est plus élevée, de l'ordre de 20 à 30%, dans le sous-continent indien et au Proche-Orient. Dans les pays tropicaux d'Afrique et d'Amérique, la contamination est davantage associée à l'ingestion d'oocystes provenant de chats domestiques et de félidés sauvages.

La situation en Algérie est méconnue. En effet, la séroprévalence serait autour de 50% (données fournies par le Centre National de Référence de la toxoplasmose, service de biologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie¹), mais aucune étude à l'échelle nationale n'a été entreprise afin de l'évaluer (MESSERER, 2015).

La toxoplasmose affecte environ 7 à 80 % de la population mondiale, mais le pourcentage de personnes séropositives pour l'infection toxoplasmique varie d'un pays à l'autre en fonction du mode de vie et de l'environnement. Il est très élevé dans les régions chaudes et humides (Tenter et al., 2000). La toxoplasmose affecte environ 7 à 80 % de la population mondiale, mais le pourcentage de personnes séropositives pour l'infection toxoplasmique varie d'un pays à l'autre en fonction du mode de vie et de l'environnement. Il est très élevé dans les régions chaudes et humides (Tenter et al., 2000). Haut du formulaire

Nous nous proposons d'évaluer minutieusement l'efficacité du test d'agglutination modifié (MAT) en comparaison avec un test de référence couramment utilisé dans le diagnostic de la toxoplasmose chez l'humain dans des laboratoires privés. Notre étude vise à analyser en profondeur les performances du test MAT, en examinant des paramètres pertinents par rapport

¹www.pasteur.dz

au test de référence, afin de mieux comprendre son utilité et son efficacité, non pas dans la pratique clinique mais pour éventuellement procéder à un large screening sur une population humaine et déterminer leur statut immunitaire puisque ce test est moins coûteux et facile à réaliser.

Afin de réaliser ce travail, notre étude est composée de trois chapitres essentiels :

Chapitre 1 : constitue une partie bibliographique qui résume l'ensemble des généralités sur la toxoplasmose humaine.

Chapitre 2 : Explique la méthode et le matériel utilisés.

Chapitre3 : Interprétation des résultats et discussion.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

1. La Toxoplasmose :

La toxoplasmose est une infection parasitaire causée par un protozoaire (Leroy, 2016 ; Csep et al., 2021) à développement intracellulaire obligatoire et opportuniste : *Toxoplasma gondii* (Halonen et al., 2013).

2. Taxonomie:

Règne : Animal (Goldfuss, 1918).

Embranchement : Protozoa (Goldfuss, 1918).

Phylum : Apicomplexa (Levine, 1970).

Classe : Sporozoea (Leuckart, 1879).

Sous-classe : Coccidia (Leuckart, 1879).

Ordre : Eucoccidiida (Léger et Duboscq, 1910).

Sous-ordre : Eimeridea (Léger, 1911).

Famille : Sarcocystidae (Poche, 1913).

Sous-famille : Toxoplasmatinae (Biocca, 1957).

Genre : *Toxoplasma* (Nicolle et Manceau, 1909).

Espèce : *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceau, 1909).

Le genre *Toxoplasma* ne comporte qu'une seule espèce (Fortier, 1993).

3. Morphologie :

Toxoplasma gondii existe sous trois formes évolutives différentes :

1.1. Les tachyzoïtes (Tachys, du grec pour "vitesses")

Ce sont des structures végétatives asexuées, sous forme d'un croissant mesurant de 6 à 8 µm de long sur 3 à 4 µm de large se retrouvent dans la circulation sanguine, les fluides biologiques ainsi que dans les tissus (Bessières, 2008). Elle se reproduit rapidement dans toutes les cellules et c'est la seule forme qui est capable de franchir la barrière placentaire. Cependant, cette forme est très fragile et se détruit directement dans l'extérieure. Le tachyzoïte présente une extrémité antérieure conoïdale et une extrémité postérieure arrondie (Figure 1) (Dubey et al, 1998) mononuclés (Ripert,1996).

1.2. Les bradyzoïtes (Brady = lent en grec)

Ce sont des formes de résistance tissulaire qui résulte de la transformation du stade tachyzoïte au cours de son évolution chez l'hôte intermédiaire. Elle se reproduit lentement à l'intérieur de kystes tissulaires, principalement situés dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires et les cellules rétinienne. Ces kystes offrent au parasite une protection contre les mécanismes immunitaires de l'hôte (Bessières, 2008).

1.3. Oocystes : forme de résistance environnementale

L'oocyste est issu de la reproduction sexuée dans l'intestin du chat. Ovoïde, il mesure de 9 à 11 µm de large sur 11 à 14 µm de long (FERGUSON et al., 1978). Il est éliminé dans les fèces du chat sous forme non sporulé (immature). Il subit une maturation dans le milieu extérieur en se divisant en deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes infectieux (SPEER et al., 1998). Sa sporulation nécessite de 1 à 15 jours selon le taux d'oxygénation, la température et l'humidité environnante (FERGUSON et al., 1978). Les oocystes non sporulés ont une structure sphérique de 10 à 12 µm de diamètre, alors que la forme sporulée mesure de 11 à 13 µm (DUBEY et al., 1998). L'oocyste sporulé (mature) est résistant aux conditions extérieures grâce à la structure complexe de sa paroi. Elle est constituée de couches distinctes, extrêmement résistantes aux agressions physiques et chimiques (SPEER et al., 1998). L'oocyste n'est pas détruit par le froid et l'acidité gastrique, mais il est sensible à la chaleur (température supérieure à 60°C) ainsi qu'à la dessiccation. Il est détruit par le formol et l'ammoniaque en solution à 0.3% (NICOLAS et al., 1993).

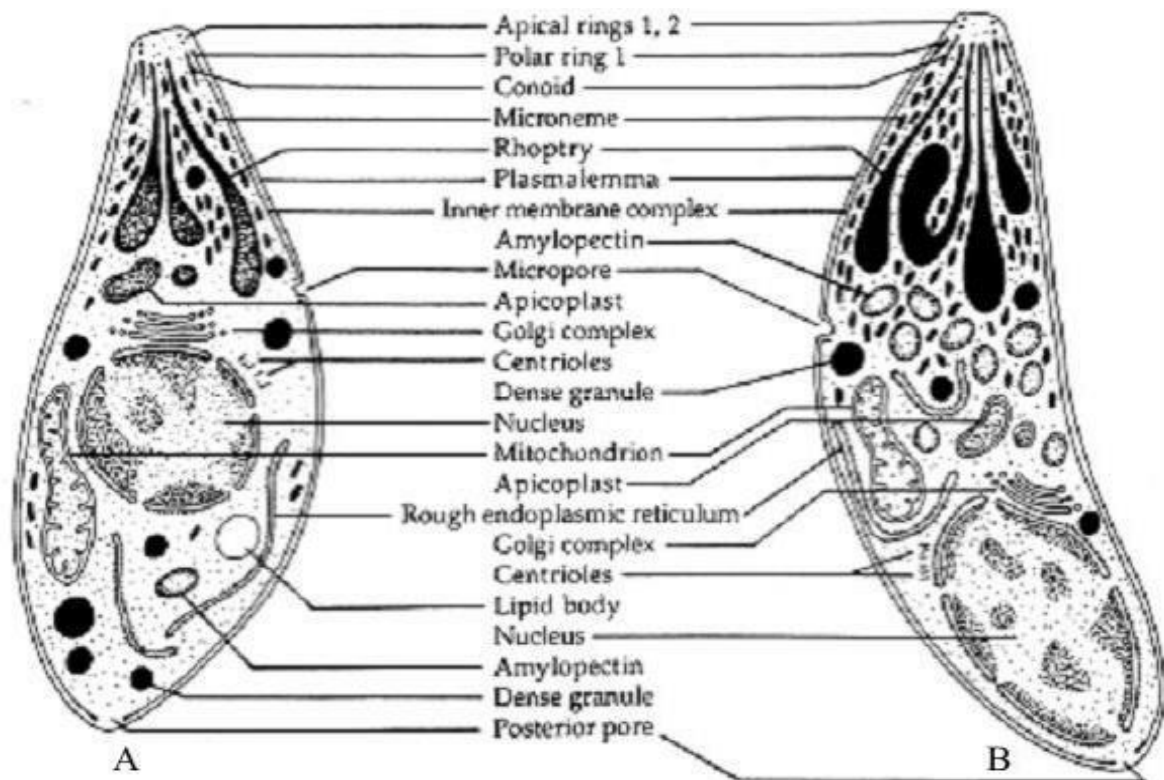


Figure 1 : Schéma d'un bradyzoite (Droite) et d'un tachyzoite (Gauche) (Dubey, 1998).

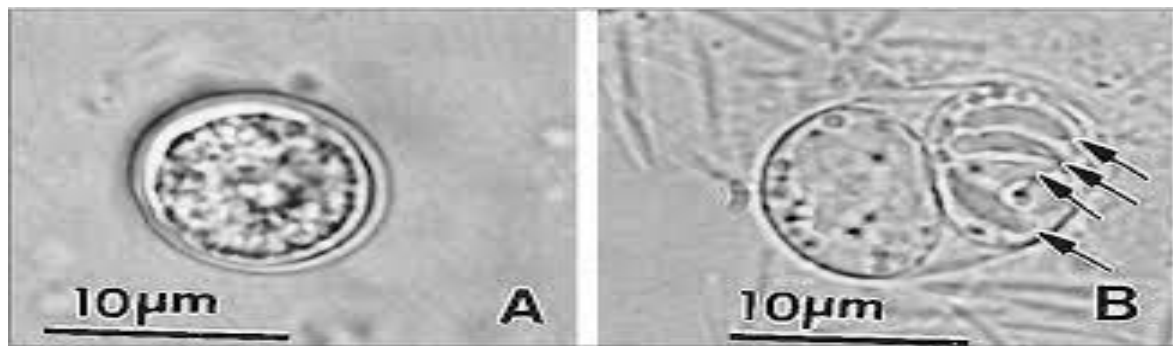


Figure 2 : Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie electronique (dubey et al, 1998) : (a) oocyste non sporulé. (b) oocyste sporulé contenant deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes (flèches).

4. Cycle Parasitaire

L'évolution de *T. gondii* (Fig.3) se déroule en deux phases (Gay, 2018) :

- Une phase de multiplication asexuée, également appelée cycle hétéroxène, se produit chez les hôtes intermédiaires, entraînant la formation de kystes qui persistent dans certains tissus, notamment ceux du système nerveux et des muscles.

- Une phase de multiplication sexuée, connue sous le nom de cycle monoxène, se déroule dans l'intestin de l'hôte définitif (les félinés), généralement le chat. Cette étape conduit à la dissémination des oocystes par les excréments de l'animal, où ils subissent une sporulation dans l'environnement extérieur, devenant ainsi infectieux pour les vertébrés supérieurs qui les ingèrent.

4.1. Cycle entéro-épithélial chez le chat :

Lors de la primo-infection chez le chat, le parasite se développe dans l'intestin grêle selon un cycle coccidien, passant par cinq stades de schizozoïtes, suivis d'une gamogonie permettant la production de gamétocytes mâles et femelles. La fécondation des gamétocytes conduit à la formation d'oocystes, éliminés dans les matières fécales. Sous des conditions favorables, les oocystes sporulent en deux à cinq jours dans l'environnement (Afssa, 2005).

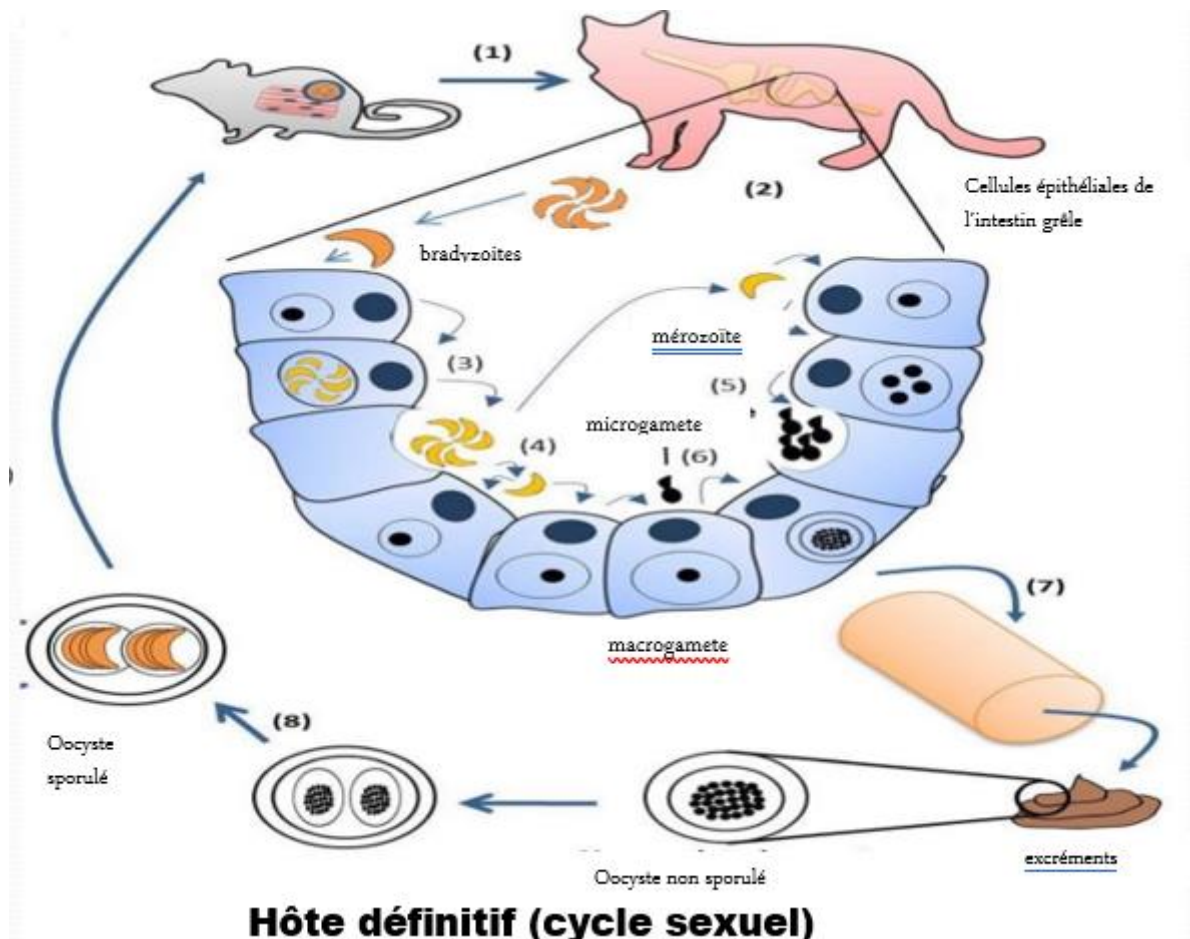


Figure 3 : Cycle de vie de *T.gondii* (AMBROISE, 1998).

4.2. Cycle extra intestinal chez l'hôte intermédiaire :

Les hôtes intermédiaires dont l'homme s'infectent soit à partir d'oocystes sporulés, soit à partir de kystes contenant des bradyzoïtes (par le biais du carnivorisme). Dans les deux cas, le processus de développement est similaire (Moulinier, 2002).

- Pendant la phase aiguë de l'infection, suite à l'ingestion d'oocystes, les sporozoïtes, ou de kystes, les bradyzoïtes sont libérés dans l'intestin, puis se propagent dans le corps par la circulation sanguine, envahissant divers organes. Une multiplication rapide conduit à la formation de pseudo kystes, la phase à tachyzoïtes. Après libération des tachyzoïtes par rupture des pseudo kystes, les parasites infectent de nouvelles cellules. Cette phase se caractérise par une présence théoriquement détectable de toxoplasmes dans le sang.

- Dans la phase chronique, environ une dizaine de jours après l'infection, l'hôte développe une réponse immunitaire qui ralentit le processus. Les parasites se multiplient alors très lentement et restent à l'intérieur des cellules hôtes donnant des kystes contenant des bradyzoïtes, capables de persister pendant plusieurs années. Cela établit un équilibre entre l'hôte et le parasite.

En cas de maladie intercurrente ou d'immunodépression, les kystes peuvent se rompre, libérant les bradyzoïtes qui reprennent leur développement en forme tachyzoïte, notamment dans le cas d'une infection transplacentaire du fœtus qui survient lorsque la femme enceinte est dans une phase aiguë à tachyzoïtes.

4.3. Hôtes du parasite :

L'infection toxoplasmique a été observée chez plus de 350 espèces animales, incluant des mammifères et des oiseaux, la plupart étant des espèces vivantes dans des milieux sauvages (Tenter et al. 2000). La contamination de l'environnement et des hôtes intermédiaires résulte des déjections des chats domestiques, errants et même des félidés sauvages dans certaines régions. Ces excréments sont responsables de la dissémination du parasite. Les espèces animales sauvages infectées peuvent également être consommées par l'homme (Halos et al., 2010).

5. Mode de contamination :

L'être humain peut contracter *T. Gondii* de trois manières différentes : par transmission congénitale des tachyzoïtes lors de la primo-infection chez la femme enceinte ; en consommant des bradyzoïtes présents dans le kyste tissulaire de produits carnés peu ou mal cuit ; ou en ingérant des sporozoïtes contenus dans les oocystes présents dans l'eau ou les aliments contaminés (Bastien, 2017).

5.1. Transmission par kystes :

La contamination survient par la consommation de viandes fumées, saumurées, ou insuffisamment cuites. Les kystes ne sont détruits que par une cuisson de la viande à 65°C ou par une congélation à une température inférieure à -12°C pendant au moins trois jours. Les kystes sont également impliqués dans la transmission par transplantation d'organe d'un donneur séropositif pour la toxoplasmose à un receveur négatif avant la greffe (Anofel, 2014).

5.2. Transmission par ingestion d'oocystes :

La contamination se produit principalement de manière indirecte, par la consommation de fruits et légumes crus mal lavés ou d'eau de boisson contaminée, ainsi que par une hygiène des mains insuffisante après le contact avec le sol (par exemple, lors du jardinage) ou avec des animaux (Anofel, 2014).

Le contact direct avec les chats semble moins risqué que le contact avec leur litière, où les oocystes peuvent être sporulés. De plus, les jeunes animaux non immunisés sont les seuls hôtes représentant un risque (Denis, 2002).

5.3. Transmission par les tachyzoïtes :

Après la contamination de la mère, le fœtus peut être infecté par une diffusion hématogène du parasite via un placenta lésé ou abîmé. Les tachyzoïtes peuvent également être contaminants lors d'une transfusion sanguine ou d'un accident de manipulation en laboratoire. Toutefois, ces contaminations accidentelles sont exceptionnelles (Priet, 2003).

6. Aspects Cliniques :

6.1. Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent :

❖ Forme asymptomatique dite sérologique :

C'est la situation la plus courante. Elle est généralement détectée lors d'examens biologiques systématiques, lors de bilans de santé préventifs ou au cours d'une grossesse (Priet, 2003).

La présence persistante de kystes dans les tissus favorise le développement d'une immunité durable et protectrice (Senegas, 2007). Une immunodépression, quelle qu'en soit la cause (qu'elle soit pathogène, oncogène ou iatrogène), peut entraîner une réactivation du parasite. Celle-ci peut se manifester par des symptômes affectant divers organes tels que l'œil, les poumons ou le système nerveux central (SNC), ou encore par une toxoplasmose disséminée, présentant un risque élevé de mortalité en l'absence de traitement spécifique. Cependant, une réactivation clinique est également possible chez les individus immunocompétents, se manifestant le plus souvent par des chorioretinites (Figure 5)(Petersen et al., 2006).

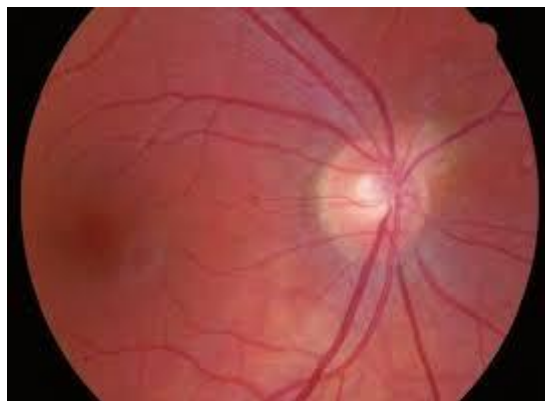


Figure 5 : Lésion rétinobulbaire chez un patient atteint de toxoplasmose oculaire (SHOBAB et al ,2013).

❖ Forme bénigne :

Les signes cliniques tels que les céphalées, l'asthénie, la fièvre transitoire et les adénopathies sont plus évocateurs (Figure 6).

Les modifications de la formule leucocytaire sont parfois associées, pouvant entraîner un syndrome mononucléosique caractérisé par une neutropénie et la présence de cellules hyperbasophiles. Rarement, une hyper-éosinophilie modérée et transitoire peut également être observée (Bouchene, 1981).

6.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé :

Chez l'adulte immunodéprimé, deux formes de toxoplasmose sont observées : la toxoplasmose localisée et la toxoplasmose disséminée (Anofel, 2014) :

❖ Toxoplasmose localisée :

- La localisation la plus courante se situe au niveau cérébral (Figure 6 « A ») ; les manifestations cliniques se présentent sous forme d'un tableau caractéristique d'abcès. Les symptômes incluent des céphalées persistantes et un déficit neurologique focalisé en fonction de l'emplacement du ou des abcès.
- La deuxième localisation la plus courante concerne les yeux (Figure 6 « B »). Les patients peuvent signaler une diminution de l'acuité visuelle, des sensations de « mouches volantes » et une rougeur oculaire.

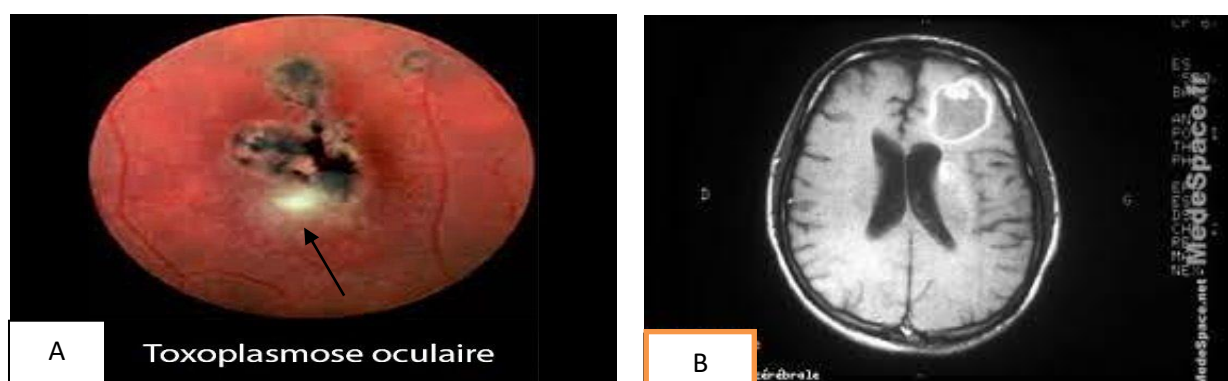


Figure 6 : Toxoplasmose de l'immunodéprimé (Anofel, 2014). (A) Abcès cérébral ;(B) Chorioretinite toxoplasmique.

- La toxoplasmose pulmonaire se manifeste par une pneumopathie fébrile avec dyspnée, qui peut évoquer la pneumocystose (**Figure 7**).



Figure 7 : Histoplasmose pulmonaire : une miliaire thoracique (Garin et al., 2020).

❖ Toxoplasmoses disséminées :

Chez les patients présentant un déficit immunitaire sévère, caractérisé par un faible nombre de lymphocytes TCD4 inférieur à 50 mm^3 , on observe un tableau clinique sévère et rapide, avec une défaillance multi-viscérale. En effet, ces patients peuvent développer plusieurs localisations de la toxoplasmose, telles que médullaires, musculaires, cutanées, hépatiques, digestives, et testiculaires. Ces manifestations traduisent souvent une dissémination parasitaire fébrile par voie hématogène. Le diagnostic repose essentiellement sur l'examen clinique. En cas de suspicion de toxoplasmose, il est impératif d'initier le traitement le plus tôt possible (Ganji et al., 2003).

6.3. Toxoplasmose au cours des transplantations d'organes

Les organes greffés liés à la toxoplasmose systémique incluent le cœur, les reins, la moelle osseuse et le foie, comme indiqué par (Hermannset al, 2001). Le niveau d'immunosuppression et le type de greffe sont deux indicateurs clés de l'infection à *Toxoplasma*. L'immunosuppression peut favoriser la réactivation d'une infection latente, notamment après une greffe de moelle osseuse, ou déclencher une primo-infection lors de greffes cardiaques ou pulmonaires parasitées (Rousseau et al, 1993).

7. Le diagnostic de la toxoplasmose :

7.1. Chez l'immunocompétent :

La méthode diagnostique de la toxoplasmose repose sur une recherche systématique des igt et des igm. Dans les cas de toxoplasmose oculaire et de formes graves de toxoplasmose acquise, le diagnostic est réalisé par PCR sur l'humeur aqueuse, notamment pour la chorioretinite (Anofel, 2014 ; HAS, 2017 ; Messerer, 2015).

7.2. Chez l'immunodéprimée :

Chez les individus immunodéprimés, la recherche du toxoplasme peut être effectuée par coloration optique, marquage avec des anticorps monoclonaux, inoculation à l'animal, ou par PCR à partir de divers échantillons biologiques tels que le sang, la moelle osseuse, LCR, LBA, et les biopsies, notamment cérébrales et de la chambre antérieure de l'œil (Koffi, 2021 ; Aubry et Gaüzère, 2019).

7.3. Diagnostic de la toxoplasmose congénitale :

○ Dépistage anténatal :

Le diagnostic repose sur la surveillance échographique et l'amniocentèse (Halonen et al., 2013). Étant donné que l'échographie ne permet que la détection d'anomalies déjà présentes, c'est l'amniocentèse, suivie de l'inoculation du liquide amniotique chez la souris et de la PCR, qui permet de confirmer l'atteinte fœtale (Anofel, 2014).

○ Dépistage néonatal :

Il est impératif de mettre en place les moyens biologiques du diagnostic néonatal pour tous les nouveau-nés issus de mères ayant une sérologie suspecte pendant la grossesse, lorsque le diagnostic prénatal est soit négatif soit non effectué. Ces démarches, accompagnées d'un bilan clinique complet comprenant un examen ophtalmologique et des analyses d'imagerie cérébrale, sont essentielles pour le traitement et le suivi approprié de l'enfant (Robert-Gangneux et Kieffer, 2002 ; Halonen et al., 2013).

○ Dépistage post-natale :

S'il n'y a pas d'argument formel en faveur d'une toxoplasmose congénitale : le diagnostic anténatal est négatif ou n'a pas été réalisé, l'examen clinique, l'etf, l'examen ophtalmologique

sont normaux et le bilan biologique néonatal est négatif. La poursuite de la surveillance au-delà d'un an est inutile (Flori et al., 2009 ; HAS,2017).

Si une infection fœtale a été détectée lors du bilan prénatal, la surveillance doit être maintenue jusqu'à la disparition complète des anticorps transmis par la mère, ce qui peut prendre moins d'un an. De plus, un suivi clinique régulier, incluant l'évaluation du développement psychomoteur et des examens du fond d'œil, doit être effectué jusqu'à l'âge adulte (Flori et al, 2009).



Figure 8 : La forme majeure : encéphalo-méningomyélite (Dubey et Beattie, 1988).

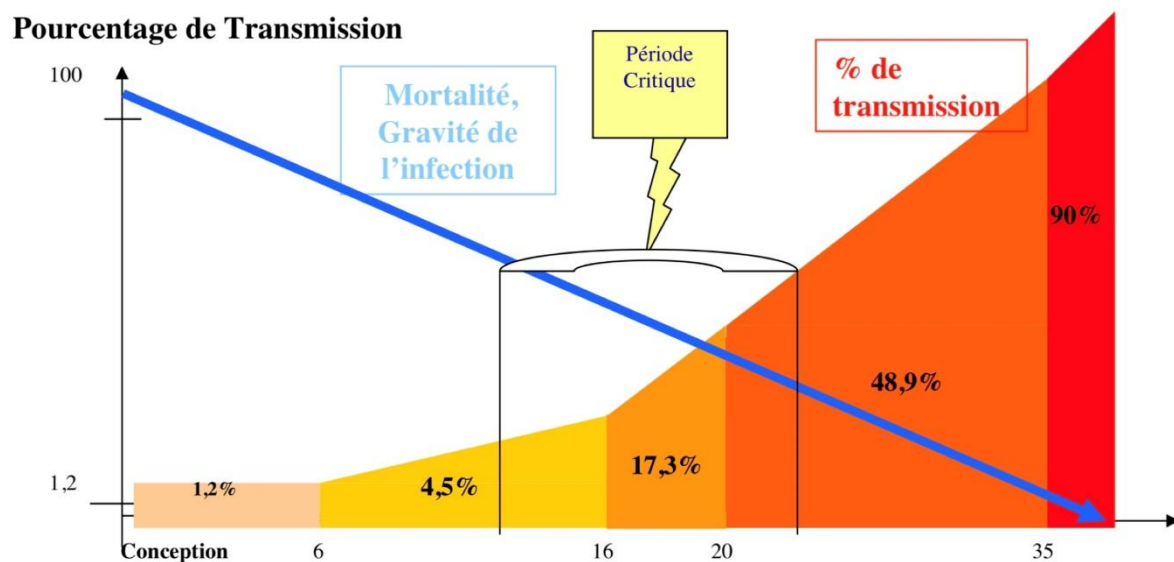


Figure 9 : Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l'atteinte de l'enfant, en Fonction de la période de primo-infection de la mère (SENEGAS, 2007).

❖ Diagnostic direct :

Dans le cas de la toxoplasmose congénitale, les échantillons utilisés pour le diagnostic incluent le sang du cordon ombilical, le liquide amniotique ou le placenta.

○ L'inoculation à la souris :

Il est possible d'inoculer le liquide amniotique du placenta à une souris (Prusa et al, 2015) dont l'objectif de cette méthode est d'isoler la souche de *T.gondii*. Le délai de réponse varie généralement de quatre à six semaines.

○ La recherche de l'ADN du toxoplasme par PCR :

C'est la méthode privilégiée pour le diagnostic prénatal ou postnatal de la toxoplasmose congénitale. Sa sensibilité est supérieure à celle de l'inoculation chez la souris (65-90%), et elle offre une spécificité de 100% (Aubry et Gaüzère, 2019).

❖ Diagnostic sérologique indirect :

L'infection par *T.gondii* est généralement asymptomatique ou présente des symptômes cliniques non spécifiques chez la plupart des individus. Le diagnostic repose principalement sur des tests sérologiques tels que le test au colorant (DT), le test d'agglutination modifié (MAT), les tests immuno-enzymatiques (ELISA), le test d'agglutination immuno-enzymatique (ISAGA), le test d'immunofluorescence indirecte (IFAT) et les tests d'héماغglutination indirecte (IHA). Ces tests ont été développés pour détecter les anticorps (Ac) dirigés contre les antigènes (Ag) de surface et solubles du parasite, principalement les immunoglobulines (Ig), dans le cas de la toxoplasmose (HAS,2009 ; Quan et al.,2015)

○ Test d'avidité :

La détection d'igg anti *T.gondii* indique une infection parasitaire, mais ne fournit pas d'informations sur la durée de l'infection. Le test d'avidité des igg, initialement décrit par Hedman et al., est désormais largement employé pour distinguer les infections aiguës des infections chroniques (Zakariya et al.,2010 ; Quan et al.,2015). Dans ce test, les sérums sont analysés avec ou sans traitement à l'urée ou à d'autres agents dénaturants des protéines. Il peut être appliqué aux igg, iga et ige grâce à différentes procédures sérologiques, telles que l'elisa et la WB (HAS, 2017 ; Aubry et Gaüzère, 2019).

8. Traitement :

Diverses molécules thérapeutiques antiparasitaires sont utilisées pour le traitement "curatif". Parmi celles-ci figurent la pyriméthamine et la sulfadiazine. En dehors de leur autorisation de mise sur le marché (AMM), d'autres médicaments tels que la clindamycine, le cotrimoxazole, l'azithromycine et l'atovaquone peuvent également être prescrits (Bourcier, 2011).

8.1. Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent :

En général, la primo-infection toxoplasmique ne nécessite généralement pas de traitement (HAS, 2017).

Le traitement est envisagé en présence de symptômes cliniques, avec l'utilisation de la spiramycine à raison de 3 fois 3 millions d'unités internationales par jour par voie orale pendant trois semaines. Il convient de noter que bien que son efficacité dans la réduction de la durée de l'asthénie et des adénopathies ne soit pas prouvée.

Lorsque des complications oculaires ou des signes sévères surviennent, une combinaison thérapeutique privilégiée consiste en premier lieu en l'utilisation de pyriméthamine associée à la sulfadiazine (Fortier, 2000).

8.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé :

Le traitement d'attaque de référence consiste en l'association de pyriméthamine et de sulfadiazine, accompagnée d'acide folinique pour compenser les effets antifoliques de ces deux médicaments (Vaubourdolle, 2007). En cas d'intolérance à cette association, d'autres options thérapeutiques telles que pyriméthamine + clindamycine, pyriméthamine + dapsone, pyriméthamine + atovaquone ou triméthoprim + sulfaméthoxazole sont prescrites (Fortier, 2000).

8.3. Toxoplasmose acquise de la femme enceinte :

Lorsqu'une séroconversion survient pendant la grossesse, le traitement préventif du passage transplacentaire du parasite consiste à prescrire de la spiramycine à la mère jusqu'à l'accouchement.

Lorsqu'une contamination fœtale est documentée, le traitement requis consiste en une association de pyriméthamine et de sulfadiazine (Fortier, 2000 ; Vaubourdolle, 2007).

8.4. Toxoplasmose congénitale :

Le traitement traditionnel de la toxoplasmose congénitale chez le nouveau-né repose sur l'association de pyriméthamine et de sulfadiazine pendant une durée d'un an (Fortier, 2000 ; robertgangneux et Dion, 2020), accompagnée d'acide folinique. Des corticoïdes sont également prescrits en cas de présence de signes inflammatoires (Vaubourdolle, 2007).

9. Prophylaxie :

Les mesures prophylactiques concernent principalement les femmes enceintes ayant une sérologie négative et les individus immunodéprimés (Gentilini, 1993).

9.1. Prévention primaire :

La prévention primaire s'appuie sur des mesures d'hygiène diététique visant à prévenir l'infection. Voici les principales recommandations à suivre :

- S'assurez de cuire toute viande à une température interne d'au moins 67°C pour garantir une cuisson adéquate.
- Veiller à bien laver à l'eau courante les fruits et légumes que vous consommerez crus, tels que les radis, la salade, les fraises et les champignons.
- Pratiquer le lavage des mains systématiquement, en particulier après avoir manipulé de la viande crue, des crudités souillées par de la terre, après avoir jardiné, et avant chaque repas.
- Préconiser d'éviter le contact direct avec la terre et recommandez le port de gants lors des activités de jardinage.
- Pour garantir la sécurité alimentaire, il est recommandé de congeler les aliments d'origine animale à des températures inférieures à -18°C, en les maintenant à cette température pendant au moins 3 jours.
- Pendant les repas pris à l'extérieur, privilégier la consommation de viande bien cuite. Évitez les crudités et préférez les légumes cuits (Villard, 2011 ; Anofel, 2014).

9.2. Prévention secondaire :

Pour la femme enceinte ; en raison du manque de résultats documentés permettant de confirmer l'acquisition de l'immunité, il est nécessaire de procéder à un dépistage sérologique de la toxoplasmose avant la fin du premier trimestre de grossesse. De plus, une surveillance

sérologique mensuelle est requise chez les femmes enceintes séronégatives jusqu'à l'accouchement (Bessières, 2008 ; Villard, 2011) Il est crucial de déterminer le moment de la séroconversion, car la fréquence et la gravité des dommages causés au fœtus dépendent du stade de la grossesse au moment de l'infection. Dans ce contexte, il est recommandé de commencer un traitement immédiat, en utilisant la spiramycine (Vaubourdolle, 2007 ; Bessières, 2008).

10. VACCINATION :

La stratégie vaccinale est fondée sur le principe selon lequel la primo-infection induit une immunité protectrice à vie, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal (HAL, 2012) À ce jour, il n'existe pas d'études sur la vaccination anti-toxoplasmique chez l'homme (Afssa, 2005) Le seul vaccin commercialisé est l'ovilis TOXOVAX. Il s'agit d'une préparation vivante contenant des tachyzoïtes de la souche S48, spécialement conçue pour les ovins (OIE, 2021).

CHAPITRE II :

Matériels et méthodes

Objectif :

Notre étude vise à évaluer la performance du test d'agglutination modifié (MAT) en détectant la présence d'anticorps spécifiques igg humains dirigés contre les antigènes membranaires de *T.gondii*, comparé à un test référence utilisé au niveau d'un laboratoire d'analyses biologiques privé situé à Sidi Bel Abbès.

➤ Technique sérologique MAT utilisé dans laboratoire pédagogique :

Dans notre laboratoire de recherche de l'environnement et développement durable (EDD) de l'université de Relizane, nous avons réalisé un test sérologique avec une réaction d'agglutination modifiée qui a comme principe de Co-incuber des dilutions de sérum connu pour être positif en igg, avec des suspensions contenant l'antigène de la souche RH de *T. Gondii*. C'est un phénomène complexe au cours duquel les anticorps s'unissent aux antigènes portés par la particule formant ainsi des ponts spécifiques entre les particules et permettent leur liaison en amas. On pratique cette technique est réalisée sur microplaque à 96 puits à fond rond. La réaction d'agglutination permet de visualiser la fixation Ag-Ac. Ainsi, si l'antigène est placé à la surface de grosses particules (parasite Toxoplasme dans notre étude), les anticorps peuvent provoquer leur agglutination. Après incubation, l'agglutination est observée à l'œil nu :

- Une réaction positive se caractérise par un voile formé à la surface de la cupule.
- Une réaction négative se caractérise par un bouton (point blanc) formé au fond de la cupule (sédimentation de l'antigène).

Afin de réaliser cette méthode, le matériel et les réactifs suivants sont nécessaires (Figure10) :

❖ MATERIELS NECESSAIRES :

1. Microplaque en plastique à 96 puits à fond rond.
2. Papier collant.
3. Embouts de pipettes à usage unique.
4. Centrifugeuse.
5. Miroir grossissant.
6. Bécher.
7. Pipettes réglables 2-20µl, 20-200µl et 200-1000µl.
8. Tubes sec.

9. Les gants.

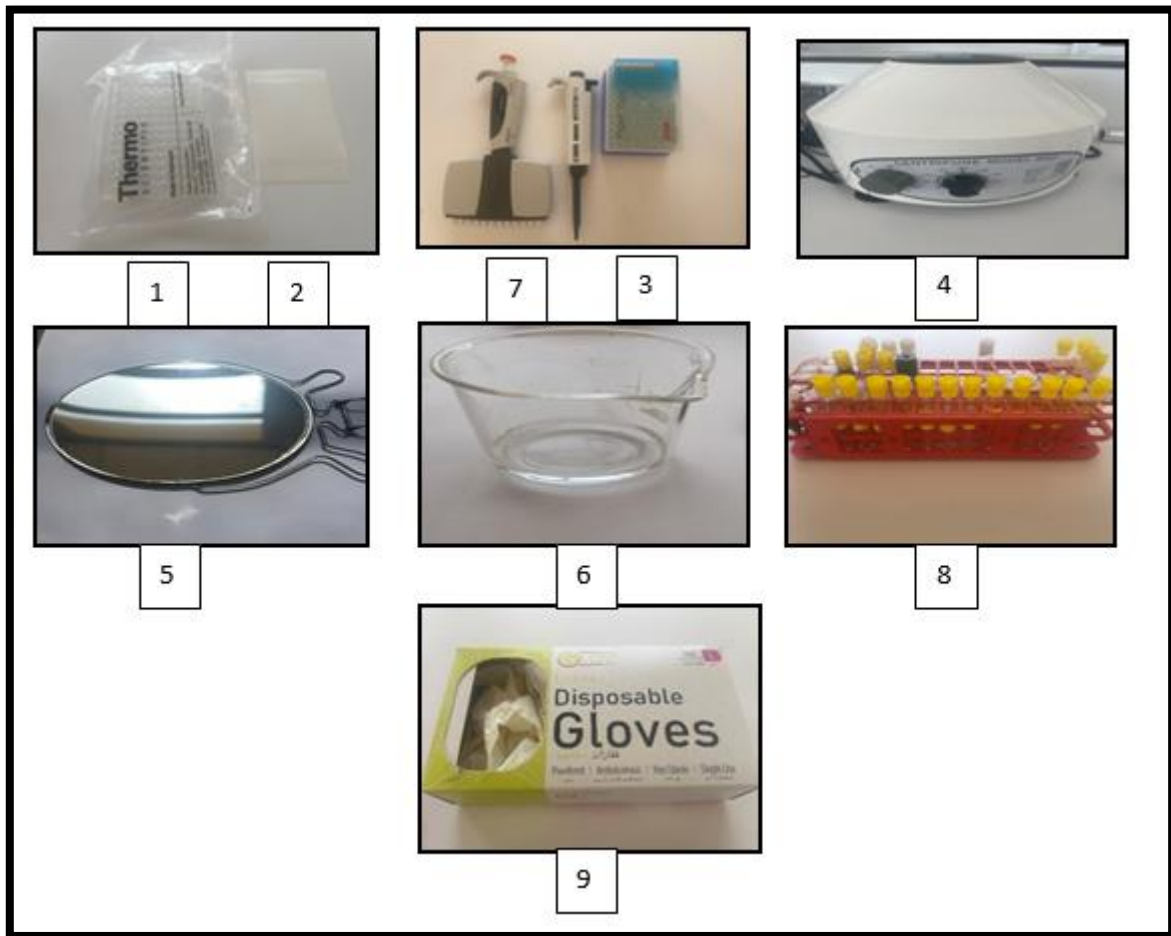


Figure10 : Matériels utilisés au niveau de laboratoire.

❖ REACTIFS

1. Suspension d'antigènes : conservé en position verticale à la concentration de 3.10^5 Toxo/ μ l dans PBS contenant 0.1% d'azide de sodium
Stabilité : au moins 6 mois à 2-8°C
2. Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,2 ; Biomérieux, 150mmol/l, #75511)
🚫 Stabilité : 2 mois à 4°C (ne pas contaminer)
3. 2-mercaptoéthanol (2-ME) : à diluer dans PBS 1 :2 et à garder à 4°C (solution-mère) – se conserve 2 à 3 semaines.
4. Sérum contrôle négatif.
🚫 Conservé à -20°C (répartir en aliquotes).
5. Sérum de contrôle positif.
🚫 Conservé à -20°C (répartir en aliquotes).



Figure 11 : réactifs utilisés au niveau de laboratoire.

❖ **Dépistage des IgG spécifiques chez les primates par la méthode d'agglutination directe modifiée (MAT) :**

1. Principe du test :

Le test MAT permet la mesure quantitative des immunoglobulines IgG anti – toxoplasmiques dans les sérums. Dans cette méthode, l'antigène est une suspension de tachyzoïtes du Type I (souche RH) qui va s'agglutiner avec l'anticorps après dilution des sérums contenant les anticorps spécifiques.

Le kit est fourni avec 6 réactifs dont l'antigène, le 2-Mercaptoéthanol, le sérum de contrôle positif et le sérum de contrôle négatif. Le 2-Mercaptoéthanol a pour rôle de dénaturer les igm, et permet d'affirmer la présence des igg spécifiques en cas de réaction positive.

2. Mode opératoire

On résume la réalisation de la technique MAT en quatre étapes essentielles :

- Etape 01 : Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin se fait de préférence à jeun chez le patient, au niveau de la veine superficielle du pli du coude. Le sang est ensuite recueilli dans un tube sec stérile et le centrifugé directement à 4500 tours/ min pendant 10 min, le dosage sérologique se fait sur le sérum. Ce dernier est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

- Etape 02 : Dilution du sérum.

Une quantité de 335 μ l du sérum humain est prélevée dont une quantité de 50 μ l de ce sérum est envoyée au laboratoire privé à Sidi Bel Abbès pour le test de référence. Les 285 μ l restants sont dilués comme suit (figure12) :

- ✓ Au 1/20 : 50 μ l de sérum ajouté au 950 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/40 : 45 μ l de sérum ajouté au 1755 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/60 : 40 μ l de sérum ajouté au 2360 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/80 : 35 μ l de sérum ajouté au 2765 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/100 : 30 μ l de sérum ajouté au 2970 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/120 : 25 μ l de sérum ajouté au 2975 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/140 : 20 μ l de sérum ajouté au 2780 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/160 : 15 μ l de sérum ajouté au 2385 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/180 : 10 μ l de sérum ajouté au 1790 μ l de PBS en tubes.
- ✓ Au 1/200 : 5 μ l de sérum ajouté au 995 μ l de PBS en tubes.



Figure 12 : les sérums diluent.

- Etape 03 : Dilution de l'antigène.

Pour avoir une quantité de 50 μ l toxo/ μ l dans chaque puit, il faut prendre un volume de 80 μ l Toxo/ μ l et le diluer dans un volume de 1280 μ l de PBS au 1/17^{ème}, sachant que dans 1 μ l de la suspension antigénique présente 3×10^5 Toxoplasmes.

✚ Equation de dilution :

1 μ l de la suspension antigénique est diluée dans un volume de **16 μ l** du PBS afin d'avoir une suspension diluée au **17^{ème}**.

Dans notre étude : un volume de **80 µl** de la suspension antigénique est dilué dans un volume de **(80×16)µl** du PBS afin d'avoir une suspension diluée au **17^{ème}**.

- Etape 04 : test MAT.
1. Marquait sur la microplaque le contrôle positif et le contrôle négatif par des signes suivants : (+) et (-), et aussi les facteurs de dilution, où les lignes sont utilisées pour enseigner les contrôles et les dilutions, tandis que la première colonne est pour le facteur de dilution 1/10^{ème} et la deuxième colonne est pour le facteur 1/20^{ème}, sans oublier de mentionner la date et l'heure de l'effectuation du test.
 2. Dans chaque puits de la première colonne (1 /10^{ème}), nous ajoutons 90µl de 2ME, tandis que dans les puits de deuxième colonne (1/20^{ème}) nous ajoutons 50 µl (suivant le Protocole de DESMONTS ETREMIGTON (Annexe)
 3. Ensuite, nous ajoutons 10 µl de sérum aux puits de la première colonne.
 4. Mélangeait les liquides dans tous les puits, puis nous retirons 50 µl de liquide de chaque puit dans la première colonne et les transférons à la deuxième colonne.
 5. Procédait à l'homogénéisation des liquides dans tous les puits, suivie de l'extraction de 50 µl de chaque puits, que nous rejetons ensuite puisque nous avons effectué seulement deux dilutions au 1 /10^{ème} et au 1/20^{ème})
 6. Ajouter 50 µl d'antigène dans chaque puit en évitant la formation des bulles d'air, puis agitions notre microplaque pour quelques secondes.
 7. Couvrir notre microplaque avec le papier collant pour éviter toutes contaminations ou contaminations croisées puis incubé pendant au moins 5 à 6 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière et des vibrations.

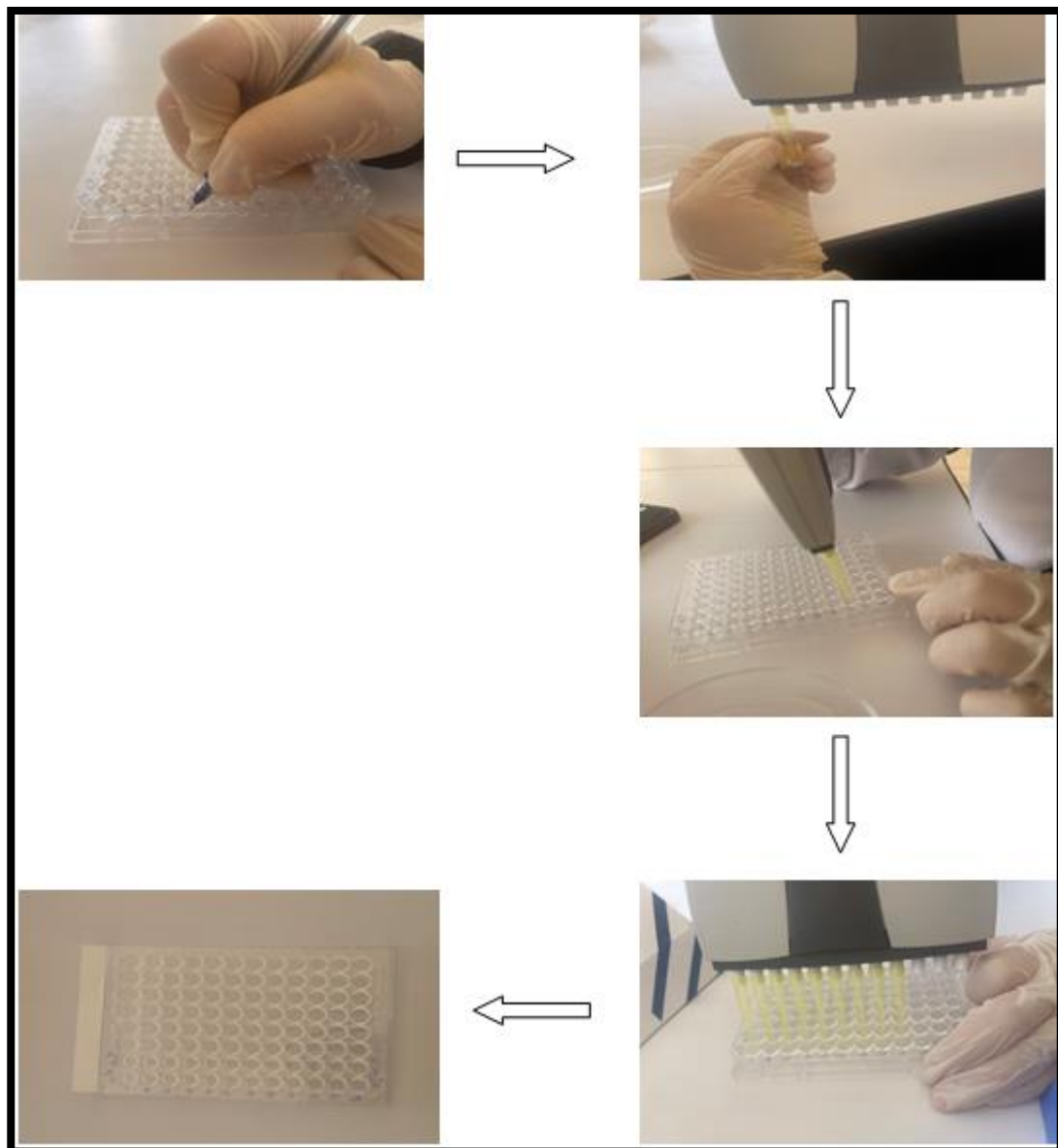


Figure 13 : la réalisation de la technique MAT.

➤ **Teste de référence : Electeochemiluminescenceimmunoassay(ECLIA)**

Les dosages immunologiques reposent sur la capacité d'un anticorps à reconnaître et à lier spécifiquement une macromolécule qui peut faire partie d'un mélange complexe de macromolécules. Dans le domaine de l'immunologie, la macromolécule liée par l'anticorps est appelée antigène, et la région sur cet antigène à laquelle l'anticorps se lie et appelée épitope.

Dans certains cas, un dosage immunologique peut utiliser un antigène pour détecter la présence d'anticorps qui reconnaissent cet antigène dans une solution. Autrement dit, dans certains dosages immunologiques, l'analyte peut être un anticorps plutôt qu'un antigène.

En plus de la liaison de l'anticorps à son antigène, la caractéristique clé de tous les dosages immunologiques est un moyen de produire un signal mesurable en réponse à cette liaison. La plupart, bien que pas tous, les dosages immunologiques impliquent le couplage chimique d'anticorps ou d'antigènes avec un marqueur détectable. Un grand nombre de marqueurs existent dans les dosages immunologiques modernes, permettant la détection par divers moyens. Beaucoup de marqueurs sont détectables parce qu'ils émettent de la radiation, produisent un changement de couleur dans une solution, fluorescent sous lumière ou peuvent être induits à émettre de la lumière. (ANNEX).

CHAPITRE III

Résultats et Discussions

➤ Résultats :

1. Résultats de test d'agglutination modifié MAT :

Les résultats du test sérologique MAT pour la détection des anticorps anti *T.gondii* dans les 24 puits sont illustrés dans la figure 12 et interprétés dans le tableau 01.



Figure14 : résultats obtenus après l'incubation de microplaque.

- La formation d'un voile qui est égale ou plus élevée que la moitié du diamètre du fond du puits est considéré comme un résultat positif ;Ce résultat positif s'explique par l'agglutination entre les antigènes de *T.gondii* et l'immunoglobuline spécifique d'anticorps igg qui caractérisée par la réunion en amas.
- La formation d'un bouton blanchâtre au fond du puits ou le voile recouvre moins de 50% du diamètre du puits est considéré comme un résultat négatif ;Ce résultat traduit par la précipitation des antigènes uniquement en absence de l'immunoglobuline spécifique d'anticorps igg.

Tableau 01 : résultat de test MAT.

	Au 1/10 ^{ème}	Au 1/20 ^{ème}
Sérum négative	Séronégatif	Séronégatif
Sérum pur	Séropositif	Séropositif
Au 1/20 ^{ème}	Séropositif	Séropositif
Au 1/40 ^{ème}	Séronégatif	Séronégatif
Au 1/60 ^{ème}	Séronégatif	Séronégatif
Au 1/80 ^{ème}	Séronégatif	Séropositif
Au 1/100 ^{ème}	Séronégatif	Séronégatif
Au 1/120 ^{ème}	Séronégatif	Séronégatif
Au 1/140 ^{ème}	Séronégatif	Séronégatif
Au 1/160 ^{ème}	Séronégatif	Séropositif
Au 1/180 ^{ème}	Séronégatif	Séropositif
Au 1/200 ^{ème}	Séronégatif	Séronégatif

L'interprétation du résultat de cette figure et de ce tableau a révélé que :

- Le sérum dilué au 1/20^{ème} est séropositif au 1/10^{ème} et 1/20^{ème} dans le test MAT.
- Les sérums dilués au 1/80^{ème}, 1/160^{ème} et 1/180^{ème} sont séropositifs au 1/20^{ème} dans le test MAT.
- Les sérums dilués au 1/40^{ème}, 1/60^{ème}, 1/100^{ème}, 1/120^{ème}, 1/140^{ème} et 1/200^{ème} sont séronégatifs au 1/10^{ème} et au 1/20^{ème} dans le test MAT.

2. Résultats de test de référence ECLIA :

Les résultats trouvés par le laboratoire privé selon le test ECLIA (Electrochimiluminence) avec l'utilisation de l'automate COBAS e411 pour la détection des anticorps anti *T.gondii* sur les 12 échantillons sont présentés dans le tableau 02 :

Tableau02 : les résultats obtenus par laboratoire privé.

Sérum	Pur	1/20	1/40	1/60	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/180	1/200
Valeur (UI)	465	265,443	188 ,686	125,779	84,732	43,387	21,446	9,654	2,155	2,865	1,821

L'interprétation du résultat de ce test est traduite comme suit :

- Si la valeur est supérieure à 3 ; le résultat est positif.
- Si elle est comprise entre 3 et 1 ; le résultat est douteux.
- Et Si elle est inférieure à 1 ; le résultat est négatif.
- Après une analyse statistique utilisant la formule boots rap, nous avons pu obtenir une valeur (x) pouvant être qualifiée comme seuil de positivité significative ($x > 0.80$).

Donc le test de référence va détecter les anticorps anti *T.gondii* dans tous les échantillons à analyser.

Pour comprendre ce résultat, on l'a illustré avec une courbe suivante :

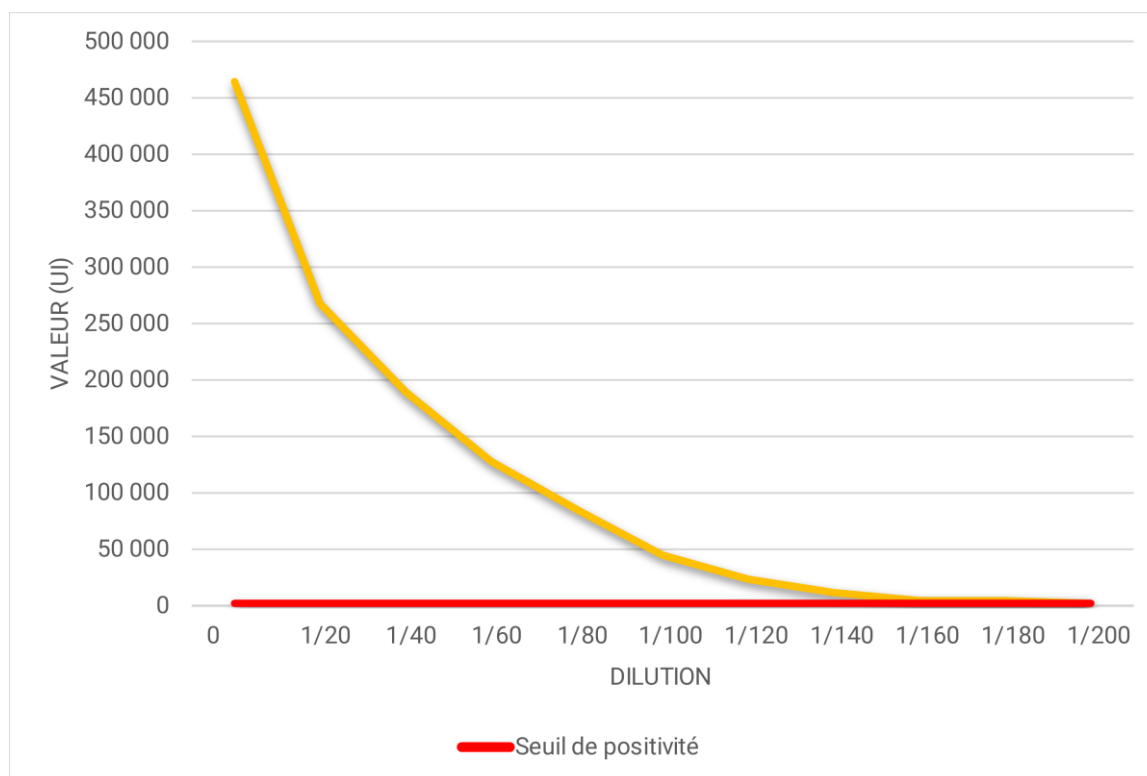


Figure 15 : résultat de l'analyse statistique.

Tous les 11 échantillons analysés avec le test de référence ECLIA étaient séropositifs, puisque le sérum pur utilisé avant et après dilution est d'origine séropositive.

3. Synthèse des résultats :

Le tableau suivant est un récapitulatif des résultats obtenus avec les deux méthodes sérologiques afin de confirmer la performance du test MAT utilisé.

Tableau 03 : Comparaison entre les deux résultats.

	Test MAT		Test ECLIA
	Au 1/10 ^{ème}	Au 1/20 ^{ème}	
Sérum négative	-	-	-
Sérum Positive	+	+	+
Au 1/20 ^{ème}	+	+	+
Au 1/40 ^{ème}	-	-	+
Au 1/60 ^{ème}	-	-	+
Au 1/80 ^{ème}	-	+	+
Au 1/100 ^{ème}	-	-	+
Au 1/120 ^{ème}	-	-	+
Au 1/140 ^{ème}	-	-	+
Au 1/160 ^{ème}	-	+	+
Au 1/180 ^{ème}	-	+	+
Au 1/200 ^{ème}	-	-	+

(-) : séronégatif.

(+) : séropositif.

Au regard de ce tableau nous avons constaté que les résultats sont en concordance entre les deux techniques (sérum pur et dans les dilutions au 20^{ème}, au 80^{ème}, au 160^{ème} et au 180^{ème}), tant dis que les résultats des deux techniques sont en discordant dans les autres dilutions, car on n'a pas ajouté d'autres dilutions par le 2-Mercaptoethanole.

La détection des anticorps anti *T.gondii* par le test MAT au 1/20^{ème} est confirmé par test de référence ECLIA dans **six échantillons (50%)**, En revanche, les résultats négatifs obtenus au 1/10^{ème} pour ces mêmes échantillons sont considérés comme des faux négatifs. (**Tableau 04**).

Tableau 04 : la détection des anticorps anti *T.gondii* par le MAT et par ECLIA.

Test	ECLIA			
	+	-	Total	
MAT seuil 1/10 ^{ème}	+	2	0	2
	-	9	1	10
Total		11	1	12

MAT seuil 1/20 ^{ème}	+	5	0	5
	-	6	1	7
Total		11	1	12

Le test MAT présente une déviation négative si elle donne un résultat négatif lorsque la méthode de référence donne un résultat positif. Une déviation négative devient un faux résultat négatif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif. Les différentes situations d'accord et de déviation entre les deux méthodes sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Types d'accord et déviation de résultats entre les méthodes de référence et MAT.

Seuil	Vrais positifs (VP)	Vrais négatifs (VN)	Faux négatifs (FN)
1/10	02	01	09
1/20	05	01	06

Les performances du test sont évaluées en termes de sensibilité et de spécificité.

- Sensibilité = $VP / (VP + FN)$.
- Spécificité = $VN / (VN + FP)$.

Pour seuil de 1/10^{ème} :

- Sensibilité = $2 / (2+9) = 0.18(18\%)$.
- Spécificité = $1 / (1+0) = 1(100\%)$.

Pour seuil de 1/20^{ème} :

- Sensibilité = $5 / (5+6) = 0.45(45\%)$.
- Spécificité = $1 / (1+0) = 1(100\%)$.

La sensibilité correspond à la probabilité d'être testé positivement lorsqu'on est malade : La spécificité correspond à la probabilité d'être testé négativement lorsqu'on n'est pas malade. **(Figure 16)** présente les résultats obtenus sur chaque seuil.

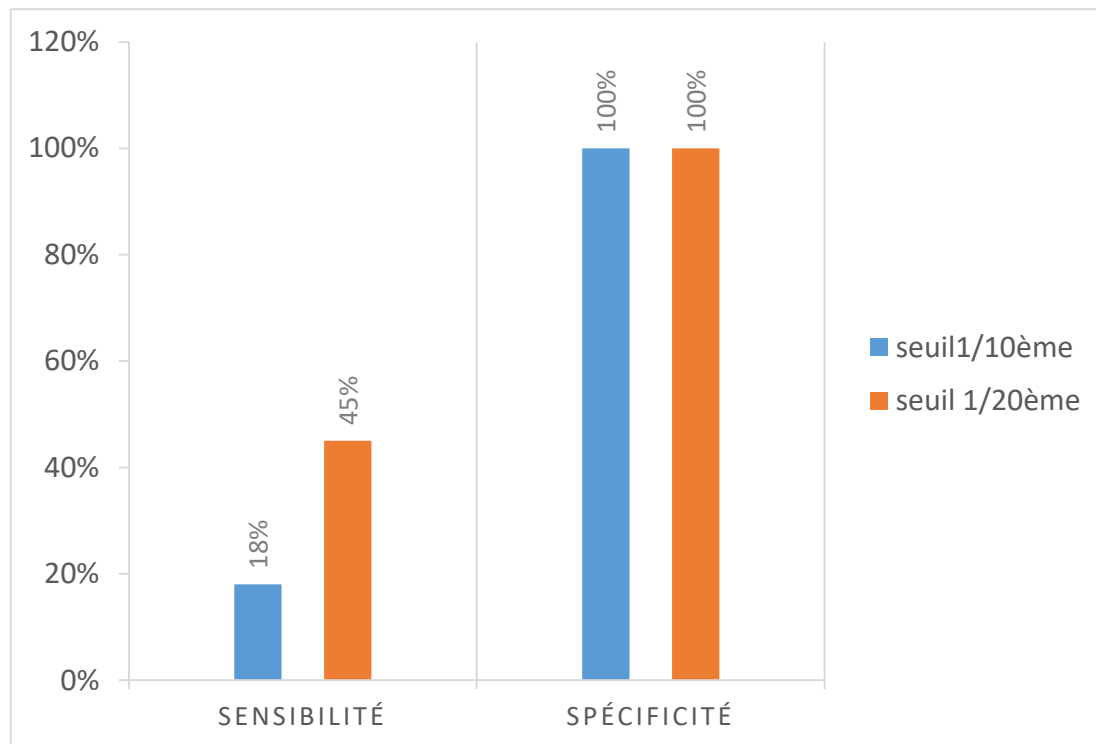


Figure 16 : valeur de la sensibilité et la spécificité du test MAT.

Une augmentation de sensibilité du test ainsi qu'une augmentation du seuil ont été observées, la spécificité n'a pas varié, restant à 100% pour les deux seuils.

Cela démontre que le test MAT présente une fiabilité de 50% pour la détection des anticorps spécifiques IgG du toxoplasme, cette performance est traduite par le cercle relatifci-dessous **(figure 17)**.

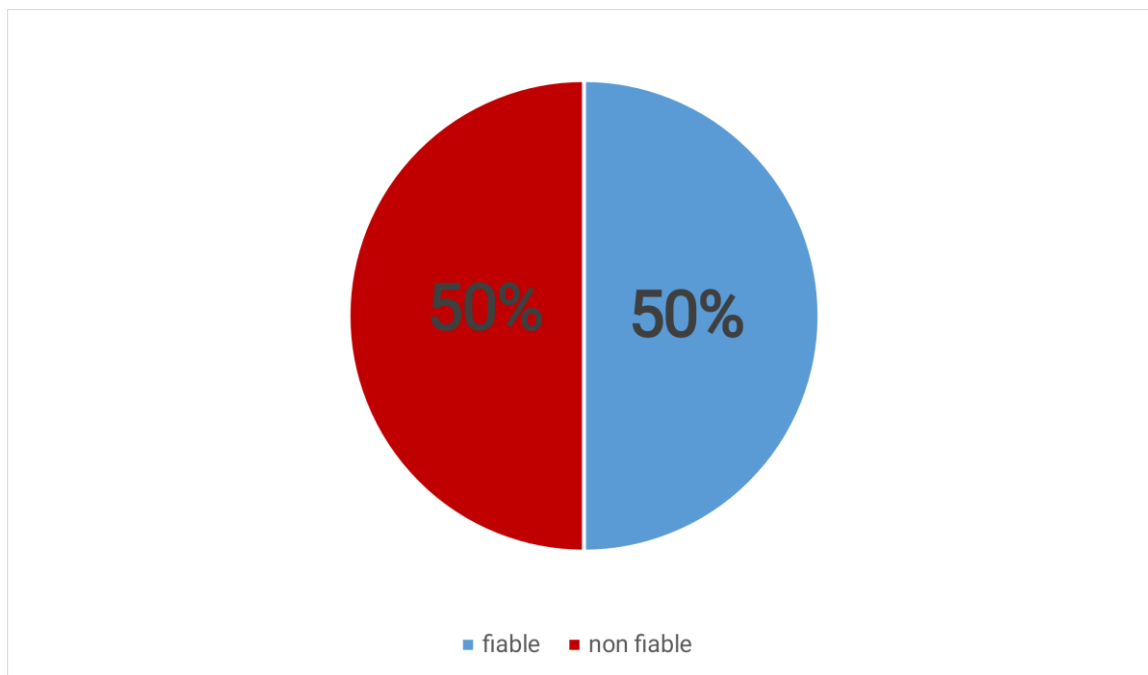


Figure 17 : représentation de fiabilité du test MAT.

➤ Discussions :

L'objectif principal du projet est de Comparer les résultats obtenus antérieurement par le test ECLIA avec les résultats réalisés au cours de notre stage avec le test MAT sur les mêmes prélèvements conservés au laboratoire de recherche de l'université Ahmed ZABANA RELIZANE., en mettant en évidence les différences de sensibilité et de spécificité et d'évaluer la fiabilité et l'efficacité du test MAT dans le diagnostic de toxoplasmose humaine. Chez de nombreuses espèces animales, les performances des tests sérologiques habituels utilisés pour détecter les anticorps anti *T.gondii* tels que MAT n'a jamais été évaluées (AROUSSIA et al 2015). Actuellement, les études d'évaluation de performance de test MAT pour détecter les anticorps anti *T.gondii* sont beaucoup plus nombreuses chez les animaux (chien -chat -cheval...) que chez les humains dans la littérature.

Dans cette étude nous avons évalué la performance de test MAT dans les dilutions de sérum positif en les comparant à la détection de l'antigène anti *T.gondii* par test ECLIA dans ces échantillons, le test ECLIA a été considéré comme le test de référence. il se distingue par la détection des anticorps avec un seuil de détection bas, ce qui signifie qu'il produit un signal avec de faibles quantités d'interaction entre les antigènes et les anticorps. D'autre part, les tests d'agglutination requièrent une quantité plus importante de cette interaction pour produire un signal, ce qui entraîne une augmentation du seuil de détection ; Etant donné que les tachyzoïtes ont des épitopes très spécifiques à leur surface (Romand et al 1998).

Au cours de cette étude, le MAT a démontré des résultats satisfaisants dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose humaine, avec une sensibilité de 45 % et une spécificité de 100%. Prenons l'exemple des chiens, une étude en Brésil a rapporté des résultats avec une sensibilité de 85% et une spécificité de 100%. Les bons tests de dépistage se caractérisent par une sensibilité élevée, c'est-à-dire que les échantillons positifs seront correctement détectés. (Baraz, 2003). Occasionnellement, on n'observe pas d'agglutination aux fortes concentrations d'anticorps (c'est-à-dire aux premières dilutions au 1/10^{ème}) et celle-ci n'apparaît qu'à des dilutions plus fortes (au 1/20^{ème}). L'absence d'agglutination à forte concentration d'anticorps s'appelle « effet de prozone ». La prozone est due à un excès d'anticorps qui conduit à la formation de complexes trop petits pour être visibles sous la forme d'une agglutination. (Gene Mayer, 2015).

Selon la synthèse des résultats obtenus, il est possible de constater qu'il existe une disparité de 55 % entre les deux méthodes. Effectivement, certains échantillons qui sont négatifs à 1/10ème par la méthode MAT obtenant un résultat positif par la méthode de ECLIA comme référence. Donc, les deux méthodes présentent des concordances de 45 % dans la dilution au 1/20ème du test MAT. Il est possible que des facteurs tels que la sensibilité analytique du test et la phase de réponse immunitaire (production d'anticorps) soient associés à l'apparition de résultats faussement négatifs (9/11 au 10ème). Et (6/11 au 20ème). Il est important de prendre en compte ces facteurs, en lien avec la nature du test et le seuil, lors de l'évaluation des performances du MAT, notamment dans les cas où la réponse immunitaire est diminuée ou lors d'infections récentes. Il est important de souligner que les niveaux d'anticorps circulants sont conditionnés par le degré d'exposition, une épreuve antigénique persistante et/ou le contrôle du parasite par l'hôte. Un autre facteur à considérer est l'émergence du phénomène Prozone dans les réactions d'agglutination, ce qui rend l'agglutination invisible à des concentrations élevées d'anticorps. Il se distingue par une inhibition de l'agglutination causée par un excès d'antigènes ou d'anticorps. Il est donc essentiel de standardiser chaque lot d'antigènes en utilisant toujours les mêmes sérums de contrôle positif et négatif.

Les tests de dépistage de qualité se distinguent par leur grande sensibilité, ce qui signifie que les échantillons positifs seront détectés de manière précise. Malgré le fait que la sensibilité du MAT ait été loin d'être idéale dans cette étude, l'utilisation de dilutions plus élevées entraînerait probablement une augmentation de caractéristiques. Il est conclu qu'il n'est pas approprié pour le dépistage de la toxoplasmose chez l'homme. Toutefois, des éléments tels que le prix relativement bas, l'absence de besoin d'anticorps spécifiques à une espèce, ainsi que la facilité et la rapidité d'exécution rendent le test tout à fait pertinent, notamment lorsque l'utilisation d'une technique plus performante comme le ECLIA est impossible, Ce qui facilite la prise de décision lors de la mise en œuvre d'une nouvelle technique au laboratoire.

Les résultats démontrent que le test MAT est performant pour être utilisé comme un test de dépistage et fournirait un moyen simple et peu coûteux pour la surveillance des femmes séronégatives pendant la grossesse et pour la détection des séroconversions et avec cette fiabilité peut être adopté dans le cas de l'étude épidémiologique d'une population afin de savoir s'ils ont déjà été immunisés contre le *T.gondii* ou non. C'est pour l'application facile et la possibilité de diagnostiquer un grand nombre d'échantillons à l'aide d'une seule microplaque. En outre, le test n'est pas destiné à être utilisé comme un test d'examen clinique.

Conclusion

Toxoplasma gondii, un parasite responsable de la toxoplasmose, en examinant ses modes de transmissions, ses effets sur la santé, et les méthodes de diagnostic. La détection des anticorps IgG spécifiques est essentielle pour le diagnostic. Parmi les tests analysés, le test MAT et le test ECLIA (Electrochimiluminescence) sont mis en comparaison. Les résultats montrent que le test MAT présente une sensibilité et une spécificité, avec une fiabilité de 50 % pour la détection des anticorps. Les discordances entre ces méthodes soulignent l'importance des tests de référence pour une évaluation précise de l'infection par *Toxoplasma gondii*. Ce mémoire conclut sur l'évaluation des performances de test MAT .Selon littérature, le test MAT est un test plus sensible par rapport les autres tests utilisés pour le dépistage des IgG de toxoplasmose (ECLIA,PCR,ELISA....).

REFERENCES

- Aroussi A, PhilippeY, Dalmay F, Wime ,L , Dardé1 M, Mercier1 A , and Ajzenberg D.(2015).** 22, 14, Detection of Toxoplasma gondii DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests.
- Afssa. (2005).** Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail « Toxoplasma gondii » de l'Afssa : agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Ambroise-thomas P. (1998).** Parasitologie et mycologie médicale, Paris, Médecine Sciences P : 141-152.
- Ambroise-thomas P. (1998).** Parasitologie Mycologie. 141-149.
- Anofel (2014).** Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Polycopie nationale, 411p.
- Aubry P. et Gaüzère B.A. (2019).** Toxoplasmose. J. Méd. Trop. De l'Océan Indien. P7.
- Bastien M., (2017)** - Contamination des terrains potagers par Echinococcus multilocularis, Toxoplasma gondii et Toxocara spp, parasites responsables de zoonoses transmises par l'alimentation, Thèse de Doctorat, Université Reims Champagne-Ardenne, 208p.
- Bessièrès M.H., Cassaing S., Fillaux J., Berrebi A., (2008).** Toxoplasmose et grossesse, Francophone des laboratoires, 402-4.
- Bhadra R., Cobb D.A., Khan I.A. (2013).** Donor CD8⁺ T cells prevent Toxoplasma gondii de-encystation but fail to rescue the exhausted endogenous CD8⁺ T cell population. Infection and immunity., 81 :3414-3425.
- Bouchene B.Z., (1981).** La toxoplasmose à la maternité de CHU-Hussein-Dey Alger [ressource textuelle, sauf manuscrits] : étude séro-épidémiologique, Thèse de Doctorat, Université d'Alger, Institut des sciences médicales, 159p.
- Bourcier T. (2011).** RéfleXions. Les urgences infectieuses en ophtalmologie. Tome 16.
- Braz J. Vet. Res. Anim. Sci. 40 (6) (2003).** Evaluation of the performance of the modified direct agglutination test (MAT) for detection of Toxoplasma gondii antibodies in dogs.
- Denis F., (2002).** Toxoplasmose In : Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant, ed. John Libbey Eurotest, Paris, 317-347.

Dubey J. P., Lindsay D. S., et Speer C. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 267-299.

Esch K.J., Petersen C.A., (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals, *Clin Microbiol Rev*, 26(1), 58–85.

Ferguson D.J.P., Birch-Anderson., Siim J.C., Hutchinson W.M. (1978). Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initial of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol. Scand Sect B.*, 86 : 165-167.

Flori P.G., Chene M.N., Varlet R., TranManh Sung. (2009). Sérologie de la toxoplasmose chez la femme enceinte : caractéristiques et pièges. *Ann Biol Clin*, vol. 67, No 2, mars-avril 2009.

Fortier B., Dao A. et Ajana F. (2000). Toxoplasme et toxoplasmoses. *encyclmédchir*. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Maladies infectieuses, 8-509-A-10, Pédiatrie, 4-330-A-10.

Fortier B., Dubremetz J. F. (1993). Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. *Med Mal Infect.*148-153.

Ganji M., Tan A., Maitar M., Weldon-Linne C.M., Weisenberg E., Rhone D.P., (2003). Gastric toxoplasmosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. A case report and review of the literature, *Arch Pathol Lab Med*, 127(6), 732-4.

Gene M, Denis H Ph.D 2015. IMMUNOGLOBULINES : REACTIONS ANTIGENE-ANTICORPS ET TESTS EXPERIMENTAUX POUR LA DETECTION DE CES RÉACTIONS, 7ème édition pp 67-74

Gentilini M., Caumes E., Danis M., Mouchet J., Duflo B., Lagardère B., Richard Lenoble D., Brucker G. (1993). Médecine tropicale. FLAMMARION. Paris.

Halonen S. K., et Weiss L. M. (2013). Toxoplasmosis. *Handbook of clinical neurology*, 114, 125–145.

Halos L., Thébault A., Aubert D., Thomas M., Perret C., Geers R., Alliot A., Escotte-Binet S., Ajzenberg D., Dardé M.L., Durand B., Boireau P., Villena I., (2010). An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France, *Int J Parasitol*, 40(2), 193-200.

HAS. (2009). Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse. Recommandations en Santé Publique. Haute Autorité de Santé.

HAS. (2015). Détection et quantification de *Toxoplasma gondii* par PCR en temps réel : adaptation d'une PCR classique pour l'amplification du gène B1 avec les amorces JW 58 et JW 59. Université Joseph Fourier. Haute Autorité de Santé.

HAS. (2017). Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire-Argumentaire. Haute Autorité de Santé.

Hermanns B., Brunn A., Schwarz E.R., Sachweh J.S., Seipelt I., Schroder J.M., Vogel U., Schoendube F.A., Buettner R., (2001). Fulminant Toxoplasmosis in a heart transplant recipient, *Pathol Res Pract*, 197(3), 211-5.

Koff, A. D. (2021). Manuel de la Société Africaine de Parasitologie (SoAP) –Tome 1– Maladies parasitaires endémiques. Les Éditions d’AVENIR, Abidjan, Côte d’Ivoire.

Marion J. (2014). La prévention de la toxoplasmose pendant la grossesse, connaissance et mise en application des méthodes de prévention. Gynécologie et obstétrique.HAL.

Messerer, L. (2015). Épidémiologie de la toxoplasmose à l’est algérien avec prévention de la toxoplasmose congénitale. Thèse de doctorat en biologie animale. Université Badji Mokhtar Annaba.

Montoya J.G., Remington J.S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Clinical Infectious Diseases.*, 47 : 554-66.

Moulinier C., (2002). Parasitologie et mycologie médicales : Éléments de morphologie et de biologie. Ed Med Inter, Paris, Lavoisier,796p.

Nicolas J.A., Pestre-alexandre M. (1993). Toxoplasmose : une zoonose transmissible à l’homme. *Med Mal Infect* 23 spécial. 129- 138.

OIE. (2021). Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre toxoplasmosis. Organisation mondiale de la santé animale référence laboratoires.

OMS. (1969). La toxoplasmose. Rapport d’une réunion d’Organisation mondiale de la santé de chercheur. Genève.

Petersen E., Edvinsson B., Lundgren B., Benfield T., Evengård B., (2006). Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(6), 401- 4.

Priet A., (2003). Apport de la PCR en temps réel dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose, Thèse de Doctorat, Université de Nantes, 148p.

Prusa A.R., Kasper D.C., Olischar M., Pollak A., Hayde M., Gleiss M. (2015). Amniocentesis for the detection of congenital toxoplasmosis: results from the nationwide Austrian prenatal screening program. *Clinical Microbiology and Infection Diseases*. Elsevier Ltd. Volume 21 Number 2.

Quan L., Ze-Dong W., Si-Yang H., Xing-Quan Z. (2015). Diagnostic de la toxoplasmose et typage de *Toxoplasma gondii*. *Parasites et vecteurs*. Bio Med Central

Ripert C. (1996). Épidémiologie des maladies parasitaires 1 Protozooses. Achevé d'imprimer par Corlet, imprimeur, S.A.

Robert-Gangneux F., Dion S. (2020). Toxoplasmose de la femme enceinte. Journal de pédiatrie et de puériculture 33, 209-220.

Robert-Gangneux F., Kieffer F. (2002). Prise en charge diagnostique et thérapeutique de la toxoplasmose congénitale. La Lettre du Gynécologue - n° 268.

Rousseau F., Leport C., Vilde J.L., (1993). Prévention de la toxoplasmose chez les immunodéprimés, Médecine et maladies infectieuses, 23(1), 201-210.

ROMAND S. ; THULLIEZ P. ; DUBEY JP(1998) . Test d'agglutination directe pour le diagnostic sérologique de l'infection à *Neospora caninum* . Parasitology Research, v. 84, n. 1, p. 50-53 .

SENEGAS A. (2007). Physiopathologie de l'infection à *Toxoplasma gondii* : Mécanismes cellulaires et moléculaires contribuant à l'arrêt de la gestation dans un modèle murin de toxoplasmose acquise. Univ. Louis Pasteur Strasbourg I., 16P.

Senegas A., (2007). Physiopathologie de l'infection à *Toxoplasma gondii* : mécanismes cellulaires et moléculaires contribuant à l'arrêt de la gestation dans un modèle murin de toxoplasmose acquise, Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, 139p.

Shobab L., Pleyer U., Johnsen J., Metzner S., James E.R., Torun N., Fay MP., Liesenfeld O., Grigg M.E. (2013). *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. J Infect Dis., 208(9) : 1520-8.

Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M., (2000). *Toxoplasma gondii* : from animals to humans, Int J Parasitol, 30(12-13), 1217-58.

Vaubourdolle, M., (2007). L'Infectiologie 3 ème édition. Pharmacie, biologie : Concours de l'internat, formation continue, Tome 3. Collection Le moniteur internat.

Villard O., Jung-etienne J., Climon B. (2010). Le Réseau du Centre National de Références de la Toxoplasmose Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. Feuilles Biol., 52 :1-7.

Villard O., Jung-Etienne J., Cimon B., Franck J., Fricker-Hidalgo H., Godineau N., Houze S., Paris L., Pelloux H., Villena I., Candolfi E. (2011). Sérodiagnostic de la toxoplasmose : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. Le Réseau Du Centre National De Référence De La Toxoplasmose. Feuilles de Biologie. VOL LII N° 298 - JANVIER 2011.

Zakariya I., Aboulmakarim S., Tligui H., Agoumi A., (2010). Sérodiagnostic de la toxoplasmose : place de l'avidité des IgG. Laboratoire de parasitologie et de mycologie de l'hôpital d'enfant de rabat. Journal marocain des sciences médicales 2010, Tome XVII ; N°2.

Zhang M., Zhao L., SONG J., Li Y., Zhao Q., He S. et Cong H. (2013). DNA vaccine encoding the *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific surface antigens SAG2CDX protect BALB/c mice against type II parasite infection. *Vaccine.*, 31 :4536-4540.

ANNEXE

TESTE SEROLOGIQUE POUR DETECTER L'INFECTION

PAR *TOXOPLASMA GONDII*

MODIFIED AGLUTINATION TEST (MAT)

(Référence : Desmonts & Remington, 1980)

Principe : Agglutination des toxoplasmes (antigènes) en présence d'Ig G spécifiques (les Ig M sont détruites par un traitement des sérums au 2-mercaptoéthanol) .

Materiel

Plaques de microtitration à fond rond 96 puits (Greiner Labortechnik)

Miroir grossissant

Feuilles autocollantes

Pipettes réglables 2-20 µl, 20-200 µl et 200-1000 µl.

Agitateur de plaques (ou agitation manuelle)

Reactifs (Tous les réactifs sont conservés à 4°C sur un portoir)

- Suspension d'antigènes : conservé en position verticale à la concentration de 3.10^5 toxo/µl dans PBS contenant 0.1% d'azide de sodium
Stabilité : au moins 6 mois à 2-8°C

Agiter vigoureusement avant l'usage pour le mettre en suspension homogène

A diluer au 1/30 dans le tampon BABS (pH 8,95 ; Biomérieux, 125 ml, #73331), soit une concentration finale de 15000 toxo/µl

La solution diluée peut se conserver 3-4 semaines à 4°C

- Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,2 ; Biomérieux, 150mmol/l, #75511)
Stabilité : 2 mois à 4°C (ne pas contaminer)
- 2-mercaptoéthanol (2-ME) : à diluer dans PBS 1 :2 et à garder à 4°C (solution-mère) – se conserve 2 à 3 semaines.
- Pour la solution d'usage pour le MAT (solution de 2-ME 0,2 mol/l), il faut diluer :

2-ME (solution-mère) 0,35 ml

PBS (qsp) 25 ml
- Stabilité 2-ME (pur): 4 semaines à 4°C en flacon verre brun à l'abri de la lumière
- Sérum contrôle négatif (titrage en Dye-Test)
Conservé à -20°C (répartir en aliquotes)
- Sérum contrôle positif (titrage en Dye-Test)
Conservé à -20°C (répartir en aliquotes)
- Sérums à tester

Technique

- Dilutions pré-déterminées :
 - Sang d'oiseaux : 1/10^{ème}, 1/20^{ème}, 1/40^{ème}, 1/100^{ème} et 1/400^{ème}
 - Sang de Mammifères : 1/20^{ème}, 1/40^{ème}, 1/100^{ème} et 1/400^{ème}
 - Sang des souris : 1/20^{ème}, 1/40^{ème}, 1/100^{ème}, 1/400^{ème} et 1/800^{ème}
 - Jus de viande : 1/10^{ème}, 1/20^{ème}, 1/40^{ème}, 1/100^{ème} et 1/400^{ème}
- Il est important d'éliminer par centrifugation tout débris cellulaire qui pourrait empêcher ou favoriser des agglutinations aspécifiques.
- Des pipettes multicanaux peuvent être utilisées si le nombre d'échantillons est important.

	Puit 1 (1 :10)	Puit 2 (1 :20)	Puit 3 (1 :40)	Puit 4 (1 :100)	Puit 5 (1 :400)	Puit 6 (1 :800)
2-ME	90 µl	50 µl	50 µl	75 µl	150 µl	50 µl
Soro	10 µl	50 µl (du puit 1)	50 µl (du puit 2)	50 µl (du puit 3)	50 µl (du puit 4)	50 µl (du puit 5)

rejeter rejeter rejeter
 25 µl 100 µl 50 µl

- La suspension d'antigène est diluée au 1/20^{ème} (ou 1/17^{ème}) dans le tampon BABS, puis 50 µl de cette suspension diluée sont ajoutés dans chaque puits (volume final dans chaque puits est 100 µl).
- Les plaques sont agitées brièvement, recouvertes par les feuilles autocollantes, puis incubées pendant au moins 5 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière et des vibrations

Lecture de la plaque

- Réaction positive : un voile de toxoplasmes agglutinés se forme et recouvre plus de la moitié du fond du puits
- Réaction négative : les toxoplasmes sédimentent au fond du puits sous forme d'un bouton blanchâtre (ou le voile recouvre moins de 50% du diamètre du puits)

Référence

Desmonts, G., Remington, J.S. *Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity*. J. Clin. Microbiol., 1980, 11, 562-568

