

Essai de différenciation sérologique entre trypanosomes et schizotrypanosomes

PAR

J. RODHAIN et R. RESSELER.

Le mode de multiplication très particulier, qui caractérise le *Trypanosoma cruzi*, a déterminé Chagas à créer pour cet hémoflagellé un genre spécial : « *Schizotrypanum* » (Chagas 1909) (1).

En réalité la multiplication intracellulaire qui se poursuit dans les cellules musculaires du vertébré infecté du *Trypanosoma* de Chagas, n'est pas une vraie schizogonie, la division des formes aflagellés étant une division binaire. Une forme de multiplication analogue chez le vertébré se retrouve chez un trypanosome non pathogène : le *Trypanosoma pipistrelli* des Chauves-souris que décrivit E. Chatton en 1921 (1). Chatton distingua ce parasite du *Trypanosoma vespertilionis* avec lequel il était resté longtemps confondu. Ainsi le genre *Schizotrypanum* comprend jusqu'ici deux représentants. A vrai dire certains protistologues contestent la validité du genre *Schizotrypanum* précisément parce que la multiplication endocellulaire n'est pas comme nous le disions plus haut une vraie schizogonie.

Il n'en reste pas moins vrai que le stade intracellulaire chez l'hôte vertébré est bien particulier chez les deux représentants du genre. Nous nous sommes demandés si au moyen de diverses réactions sérologiques il ne serait pas possible d'établir une distinction entre les *Trypanosoma* sensu strictu et les *Schizotrypanosoma*.

Dans ce but, nous avons eu recours aux réactions de la fixa-

tion du complément, de l'agglutination et de la recherche des précipitines. Sans doute, les réactions sérologiques ne peuvent pas, comme le dit Weynon, servir de critère pour la distinction spécifique des trypanosomes, mais on pouvait penser que lorsqu'ils appartenaient à des genres différents, les hémoflagellés pouvaient provoquer des séroréactions distinctes.

Pour nos essais nous avons disposé :

1° d'une souche de *Trypanosoma brucei* conservée depuis plusieurs années sur souris et rats ;

2° d'une souche de *Trypanosoma cruzi* (*) reçue de notre collègue et ami le professeur E. Brumpt et conservée sur *Reduvius prolixus (fumatus)* et cobaye ;

3° d'une souche de *Trypanosoma pipistrelli*, isolée à Anvers ;

4° d'une souche de *Trypanosoma vespertilionis* isolée également à Anvers.

Les deux dernières qui s'étaient montrées absolument apathogènes étaient conservées en culture sur gelose au sang de lapin.

En plus, grâce à l'obligeance de notre collègue Ch. Van Goidsenhoven, nous avons pu disposer d'un sérum de lapin infecté de *Trypanosoma equiperdum*.

Pour obtenir des sérums spécifiques, nous avons infecté un lapin de *Trypanosoma brucei*, un autre de *Trypanosoma cruzi*.

Nous avons injecté à deux autres lapins, mi-adultes, des cultures des trypanosomes, des chauves-souris, l'un relevant du *Trypanosoma vespertilionis*, l'autre du *Trypanosoma pipistrelli*.

Le lapin qui fournit le sérum « *vespertilionis* » avait reçu du 7 janvier 1943 au 27 février, 14,5 centim. cubes de culture très riche, lorsqu'il fut saigné pour la première fois le 1^{er} mars.

Dans la suite, cet animal reçut chaque semaine 1 ou 2 centimètres cubes de culture très riche.

Jusqu'au 4 mars 1944 il avait totalisé 97 cm³ de culture lorsqu'il fut saigné pour la dernière fois le 16 mars. Entre le 19 avril

(*) *Trypanosoma cruzi* — 551 XXVII, virus du Venezuela rapporté par le Professeur Brumpt, en 1939, de Villa de Cura, sur *Rhodnius prolixus*.

et le 15 juin 1943 il avait présenté 2 abcès froids sur le dos entre les deux hanches.

Le lapin « *pipistrelli* » fut injecté d'un volume sensiblement identique de cultures. Du 8 janvier 1943 au 1^{er} mars, il avait reçu 17 c.c. Une première prise de sang fut pratiquée le 1^{er} mars. Ultérieurement, jusqu'au 16 mars 1944, il reçut encore 82 c.c. de culture, totalisant ainsi 99 c.c. lorsqu'il fut saigné une dernière fois le 16 mars 1944.

Différentes prises de sang au cœur furent faites durant les périodes de préparation, les saignées se faisant toujours à 8 ou 10 jours de distance d'une injection.

Le lapin « *brucei* » inoculé le 10 septembre 1943 avec du sang de souris très riche en parasites, montra des trypanosomes dans la circulation périphérique dès le 14 septembre et fut sacrifié par saignée le 21 octobre parce que en mauvais état. Son sérum fut conservé à la glacière à 0°.

Le lapin « *cruzi* » injecté sous la peau le 16 novembre 1942 avec le sang du cœur d'un cobaye pauciparasité n'ayant pas montré de trypanosomes dans la circulation au 7 janvier 1943, il fut réinoculé cette fois au moyen d'un *Rhodnius prolixus* avec formes métacycliques. Le xenodiagnostic pratiqué le 30 mars fut positif.

Dans le but d'entretenir l'infection de l'animal, nous lui avons inoculé périodiquement 1 à 2 c.c. de culture riche en parasites. Ses inoculations s'espacent ainsi : le 27 février, le 1^{er} mars, le 6 mars, le 27 mars, le 15 mai, le 17 juillet et le 20 août 1943.

La persistance de l'infection fut vérifiée par le xenodiagnostic qui s'avéra positif, le 13 mai et le 13 septembre 1942. Répété le 3 décembre 1943 et les 4 janvier 1944, le 21 mars, le 1^{er} mai et le 27 décembre 1944, il donna invariablement des résultats positifs.

Le lapin avait reçu la dernière fois de la culture vivante le 20 août 1943, à la date du 27 août 1944, son infection s'étant donc maintenue depuis plus d'un an.

Les prises de sang en vue des réactions se sont échelonnées comme suit :

le 16 novembre avant l'inoculation ; puis le 1^{er} mars 1943, le 29 juillet, le 10 août, le 10 janvier et le 16 mars 1944.

1. — Réaction de déviation du complément.

Préparation des antigènes.

Nous nous sommes servis des antigènes préparés à partir de cultures sur milieu de Nöller pour les trypanosomes cruzi; pipistrelli; et vespertilionis.

Les trypanosomes ont été recueillis de ces milieux au moyen de l'eau physiologique et séparés des débris de gélose et de sang par centrifugation fractionnée et dans le dernier culot additionnés de deux fois leur volume d'un mélange à parties égales de glycérine pure et neutre et d'eau physiologique. Pour l'antigène *equiperdum* de notre collègue Ch. Van Goidsenhoven a employé la technique de Mohler, Eichorn et Buck, dont il a l'habitude.

Réactions.

En ce qui concerne les réactions mêmes, les sérums sanguins ont été éprouvés aux doses de :

0,3; 0,2; 0,1; 0,01 ce après inactivation à 56° pendant 30';
0,02; 0,01 ce sans inactivation préalable.

Les résultats notés à l'achèvement de l'épreuve ont été contrôlés le lendemain.

++++	=	empêchement total de l'hémolyse
+++	=	» quasi total
++	=	» partiel de l'hémolyse
+	=	trace d'empêchement
—	=	hémolyse totale.

Les résultats des différentes épreuves dont certaines ont été répétées sont consignés dans les tableaux ci-dessous :

ANTIGÈNE CRUZI.

Sérum cruzi :	inactivé :	0,3	anticomplémentaire	
		0,2	idem	
		0,1	++++
		0,01	++++
	non-inactivé :	0,02	++++
	0,01	++++	

Sérum pipistrelli :

inactivé :	0,3	++
	0,2	++
	0,1	+
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	+
	0,01	—

Sérum vespertilionis :

inactivé :	0,3	+++
	0,2	++
	0,1	+
	0,01	?
non-inactivé :	0,02	+
	0,01	?

Sérum equiperdum :

inactivé :	0,3	++
	0,2	+
	0,1	?
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	+
	0,01	—

Sérum lapin normal :

inactivé :	0,3	+
	0,2	—
	0,1	—
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	—
	0,01	—

ANTIGÈNE PIPISTRELLI.

Sérum cruzi :

inactivé :	0,3	anticomplémentaire	
	0,2	idem	
	0,1	++
	0,01	+
non-inactivé :	0,02	+
	0,01	?

Sérum pipistrelli :

inactivé :	0,3	++
	0,2	++
	0,1	+
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	+
	0,01	—

Sérum vespertilionis :

inactivé :	0,3	+
	0,2	—
	0,1	—
	0,01	—
non-inactiva :	0,02	++
	0,01	+

Sérum equiperdum :

inactivé :	0,3	+
	0,2	+
	0,1	—
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	+
	0,01	—

Sérum lapin normal :

inactivé :	0,3	—
	0,2	—
	0,1	—
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	—
	0,01	—

ANTIGÈNE VESPERTILIONIS.

Sérum cruzi :

inactivé :	0,3	anticomplémentaire	
	0,2	idem	
	0,1	++++
	0,01	+++
non-inactivé :	0,02	++++
	0,01	+++

Sérum pipistrelli :

inactivé :	0,3	++
	0,2	++
	0,1	+
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	++
	0,01	+

Sérum vespertilionis :

inactivé :	0,3	++++
	0,2	+++
	0,1	+++
	0,01	++
non-inactivé :	0,02	+++
	0,01	++

<i>Sérum equiperdum :</i>			
inactivé :	0,3	++
	0,2	?
	0,1	?
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	+
	0,01	—
<i>Sérum lapin normal :</i>			
inactivé :	0,3	+
	0,2	?
	0,1	—
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	—
	0,01	—
 <i>ANTIGENE EQUIPERDUM.</i>			
<i>Sérum cruzi :</i>			
inactivé :	0,3	anticomplémentaire	
	0,2	idem	
	0,1	idem	
	0,01	+ +
non-inactivé :	0,02	+ +
	0,01	+
<i>Sérum pipistrelli :</i>			
inactivé :	0,3	non-éprouvé	
	0,2	+
	0,1	+
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	?
	0,01	—
<i>Sérum vesperilionis :</i>			
inactivé :	0,3	non-éprouvé	
	0,2	+ +
	0,1	?
	0,01	—
non-inactivé :	0,02	+ + +
	0,01	+ + +
<i>Sérum equiperdum :</i>			
	0,3	+ + + +
	0,1	+ + + +

Ces réactions ont été faites par M. Van Goidsenhoven.

Nous pouvons réunir les résultats où il s'est produit de l'he-

molyse totale, partielle, ou trace, en un seul tableau comme suit :

Désignation des sérums	Antigènes employés et résultats				Observations
	Cruzi	Pipistrelli	Vespert.	Equiperd.	
Cruzi . . .	++++ tts doses	++ 0,3 et 0,2	++ 0,3	+	Les doses ayant fourni, les résultats sont indiquées sous les +
Pipistrelli . .	++ 0,1 inact.	++ 0,3 et 0,2	++ 0,02 non chauffé	++ 0,3—0,2 0,02 non chauffé	
Vespertilionis	++++ tts doses	++ 0,4—0,2	++++ 0,3	++ 0,3	Réaction pratiquée au laboratoire de Mr Van Goidsenhoven.
Equiperdum .	++ 0,1 inact. 0,02 non chauffé	++ 0,2—0,1	++++ 0,02—0,01	++++ 0,3 0,1	

L'examen de ce tableau montre que le sérum du lapin cruzi fixe l'alexine en présence de l'antigène cruzi à toutes les doses employées; que le sérum du lapin vespertilionis fixe de même intégralement l'alexine en présence de l'antigène vespertilionis mais à la dose forte de 0,3 c.c. seulement.

Ces réactions totalement positives sont bien spécifiques. Mais de plus, la fixation du complément se produit lorsque le sérum du lapin vespertilionis est mis en présence de l'antigène cruzi. Cependant les réagines du sérum lapin cruzi ne fixent qu'incomplètement l'antigène « vespertilionis ».

Le sérum equiperdum qui ne réagit que faiblement en présence de l'antigène cruzi, donne une réaction davantage positive avec l'antigène pipistrelli. Quant aux réactions obtenues avec le sérum « pipistrelli », elles sont faiblement positives partout, aussi bien avec l'antigène spécifique qu'avec les hétérogènes. De même l'antigène pipistrelli mis en présence des sérums non spécifiques ne fournit que des réactions faiblement positives. Quant à l'antigène equiperdum, en dehors de la réaction spécifique vis à vis du sérum homologue, il ne réagit que faiblement en présence de l'antigène vespertilionis, et extrêmement peu lorsqu'il est en contact avec le sérum cruzi et pipistrelli. D'après cela l'antigène vespertilionis semble plus proche de l'an-

tigène cruzi que de l'antigène pipistrelli. D'autre part, si nous comparons l'antigène pipistrelli et l'antigène vesperilionis, nous voyons que les sérums des deux lapins, préparés respectivement avec ces antigènes se comportent comme s'ils n'avaient pas d'anticorps communs.

Le sérum equiperdum est en réalité celui qui se montre le plus spécifique.

Si l'on voulait tirer une conclusion de ces résultats, il faudrait dire qu'au point de vue de la fixation de l'alexine, le *Trypanosoma pipistrelli* forme un groupe à part.

Dans l'ensemble, il ressort qu'une différenciation entre les représentants du genre *Trypanosoma* et ceux du genre *Trypanosoma sensu stricto*, basée sur la fixation de l'alexine par les antigènes, n'est pas possible.

2. — Recherche des précipitines,

En serait-il différemment en ce qui concerne les précipitines?

La réponse qui ressort des essais que nous avons institués et que nous résumons ci-dessous, est qu'il nous fut impossible de mettre en évidence des précipitines spécifiques dans aucun de nos sérums éprouvés.

Préparation de l'antigène.

Les antigènes ont été préparés comme pour la réaction de déviation du complément, avec ensuite broyage des trypanosomes et leur remise en suspension. D'autres antigènes ont été préparés d'après la méthode de digestion acide, neutre ou alcaline à la tripsine.

Réaction.

Les dilutions des sérums ont été de :

0,1 ; 0,01 ; 0,001 ; 0,0001.

Les dilutions des antigènes ont été de :

1,0 ; 0,1 ; 0,01 ; 0,001.

Les réactions suivantes ont été exécutées :

Antigène vespertilionis : sérum cruzi — sérum pipistrelli —
sérum vespertilionis — sérum lapin normal.

Antigène cruzi : sérum cruzi — sérum pipistrelli — sérum ves-
pertilionis — sérum lapin normal.

Antigène pipistrelli : sérum cruzi — sérum pipistrelli — sé-
rum vespertilionis — sérum lapin normal.

Résultats.

Dans aucun cas une réaction positive nette a été observée.

3. — *Réactions d'agglutination.*

Mais peut-être les réactions d'agglutination allaient-elles nous
permettre une différenciation.

Au cours d'essais nous avons voulu d'abord éprouver si le
sérum du lapin « pipistrelli » possédait une agglutine spécifi-
que, et agissait aussi sur le *Trypanosoma cruzi*.

Les résultats de cet essai sont consignés dans le tableau ci-
après.

Essai d'agglutination « sérum pipistrelli ».

Dilutions du sérum Pipistrelli	Spécification des cultures		Témoins avec sérum lapin normal		Observations
	Trypano- soma cruzi	Trypan. pipistrelli	Trypano- soma cruzi	Trypan. pipistrelli	
1 10	Rares trypanos. libres mobiles. Grand amas avec trypanos. mobiles.	Pas de trypanos. libres mobiles. en lyse.	Trypanos. libres assez nombreux. Quelques grands amas.	Plus de 10 trypanos. libres par champ.	Les examens ont été faits après 2 h. d'étuve à 38° et puis le lendemain après une nuit à la température du laboratoire.
1 20	idem	idem	idem	idem	
1 40	Trypanos. libres plus nombreux.	idem			
1 80	Peu de Trypanos. libres bien mobiles. Amas nombreux.	idem			
1 200	idem	Trypanos. libres.			

Il résulte de cette expérience que le sérum du lapin « pipistrelli », était trypanocide et partiellement trypanolytique jusqu'aux dilutions 1/80, le pouvoir agglutinant n'apparaissant guère pour le *Trypanosoma pipistrelli*.

Son action sur le *Trypanosoma cruzi* se traduit aux dilutions de 1/10, 1/20 et 1/40 par une réduction des trypanosomes libres et une congglomération en amas dans lesquels les trypanosomes restent mobiles.

Mais dans le témoin aussi les *Trypanosoma cruzi* de culture montrent une tendance nette à former des amas. Cette tendance naturelle qui se retrouve aussi dans les cultures de *Trypanosoma vespertilionis*, nous fit choisir pour l'expérience suivante une culture en bouillon au sang de lapin du *Trypanosoma pipistrelli*. Pour augmenter le nombre de parasites, nous y avons ajouté une fraction de culture sur NNN. Dans ce mélange les trypanosomes sont bien séparés, mobiles et nombreux dans chaque champ microscopique.

Le tableau ci-dessous résume les résultats.

Essai d'agglutination avec « culture Trypanosoma pipistrelli ».

Dilution des sérums	Désignation des sérums					Témoin sans sérum
	Brucei	Cruzi	Vespertilionis	Pipistrelli	Lapin normal	
1/10	Nombreux tryp. libres bien mobiles	Nombreux tryp. libres rares amas	Trypanosomes libres	Trypanosomes moins nombreux q.q. amas	Nombreux tryp. libres q.q. grands amas	Trypanosomes nombreux libres pas d'amas
1/50	»	»	»	»	—	—
1/100	»	Tryp. libres	»	»	—	—
1/250	»	»	»	Nombreux tryp. libres	—	—
1/500	»	»	»	»	—	—
1/1000	»	»	»	»	—	—

La seule conclusion que cette expérience permet de tirer, c'est que les sérums « lapin brucei » et « vespertilionis » sont sans action aucune sur les cultures du *Trypanosomes pipistrelli*.

Que le sérum lapin cruzi exerce une très faible action agglutinante aux dilutions de 1/10 et même 1/50.

Que le sérum lapin pipistrelli exerce la même action à côté d'une action trypanocide qui ici est moins marquée que dans l'expérience précédente.

Pour terminer ces essais, nous avons institué une expérience contrôle où les sérums ont été mis en présence d'une culture de *Trypanosoma cruzi*. Afin de prévenir la formation de conglomerats par les trypanosomes vivants, nous avons tués les parasites par du formol à 0,3% et par du bleu Borrel à 1/1000 qui colore légèrement les flagellés.

Au cours d'un premier essai, nous nous sommes bornés à faire agir du sérum du lapin cruzi sur une culture du même trypanosome.

Elle nous permet de déceler une action agglutinante encore nette jusqu'au taux de $\frac{1}{100}$, la lecture étant faite après 5 heures d'étuve à 37°.

Essai d'agglutination avec « culture *Trypanosoma cruzi* ».

Dilution des sérums	Désignation des sérums				Culture sans sérum	Observations
	Cruzi	Vespertilionis	Pipistrelli	Lapin normal		
$\frac{1}{10}$	++ nombreux petits amas	—	± trace d'agglutination, petits amas peu nombreux	Trypanosomes tous libres	Trypanosomes tous libres	Les cultures de trypanosomes employées étaient en bouillon sang. Avec addition de 0,3 % de formol.
$\frac{1}{50}$	+ petits amas. Assez nombreux, assez bien tryp. libres	—	—	—	—	—
$\frac{1}{100}$	—	—	—	—	—	L'agglutination se manifeste par la formation de petits amas de trypanosomes. Ces amas comportent un petit nombre de parasites.
$\frac{1}{200}$	—	—	—	—	—	—

L'action du sérum homologue cruzi ne fut pas si nette que dans notre expérience préliminaire où elle était encore évidente

à $\frac{1}{100}$. Peut-être le milieu bouillon peut-il avoir eu quelque influence.

Retenons de cette expérience que le sérum du lapin pipistrelli a exercé une action agglutinante très peu marquée sur les cultures du *Trypanosome cruzi*.

Comme d'autre part dans l'expérience précédente le sérum du lapin cruzi a montré une action agglutinante sur les cultures du *Trypanosoma pipistrelli*, il semble bien qu'il existe chez ces deux trypanosomes une communauté d'antigène provoquant la formation des agglutinines.

CONCLUSIONS.

Si nous essayons de conclure de ces essais, nous pouvons dire :

1° Que les réactions de fixation de l'alexine indiquent qu'il existe une parenté antigénique entre *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma vespertilionis* et que cette parenté est beaucoup moins accusée entre le *Trypanosoma cruzi* et le *Trypanosoma equiperdum*, qu'elle est moins nette encore entre *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma pipistrelli* : les deux représentants du genre *Schizotrypanum* de Chagas.

Ainsi la réaction de déviation du complément ne permet pas de différencier les représentants du genre trypanosoma de ceux du genre schizotrypanum.

2° Que les précipitines si elles existent dans les sérums des lapins infectés de *Trypanosoma cruzi* ou préparés par des injections répétées de cultures vivantes de *Trypanosoma vespertilionis* et *Trypanosoma pipistrelli* ne peuvent pas être mises en évidence par les méthodes ordinaires.

3° Que les réactions d'agglutination pratiquées par le sérum d'un lapin infecté de *Trypanosoma cruzi*, et le sérum d'un lapin préparé par l'injection répétée de cultures vivantes de *Trypanosoma pipistrelli*, indiquent que les deux représentants du

genre *Trypanosoma* possèdent un agglutinogène commun qui n'existe pas chez *Trypanosoma vespertilionis*.

Remarque.

Considérés dans leur ensemble, ces essais ont abouti à des résultats paradoxaux et décevants. L'absence de précipitines décelables par les méthodes ordinaires. La parenté antigénique pour l'anticorps fixant l'alexine entre *Trypanosoma Schizotrypanum*, *cruzi* et *Trypanosoma vespertilionis*, opposée à l'absence de cette parenté entre le premier et le deuxième représentant du genre schizotrypanum; l'existence pour ces deux espèces d'un agglutinogène commun sont des faits qui n'autorisent aucune déduction à portée générale.

La seule conclusion qui se dégage de ces essais est qu'en réalité les méthodes sérologiques ne permettent pas de différencier les représentants du genre *Trypanosoma* de ceux du genre *Schizotrypanum*.

Samenvatting. — Schrijvers hebben willen opzoeken of door serologische reacties, verschillen zouden kunnen aangetoond tusschen trypanosomen soorten behorende tot het geslacht *Trypanosoma* en het geslacht *Schizotrypanum* volgens Chagas. Opgvolgens werden toegepast:

De reacties van de complement binding van het precipitine en agglutinatie proeven.

Sera van konijnen besmet door *Trypanosoma cruzi*, *brucei*, en *equiperdum* of ingeënt door kulture van *Trypanosoma vespertilionis* en *pipistrelli* werden onderzocht.

De zeer afwijkende en soms paradoxale resultaten wijzen er op dat de serologische proeven geenè waarlijk verschil laten ontdekken tusschen de vertegenwoordigers van het geslacht *Trypanosoma* en diegene van het zoo genoemde geslacht *Schizotrypanum* van Chagas.

BIBLIOGRAPHIE.

1. C. Chagas. — Ueber eine neue Trypanosomiasis des menschen. Studien über Morphologie und Entwicklungcyklus des Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp. *Mem. Inst. O. Cruz*, 1909, I, 159.

2. E. Chatton et R. Courrier. — Un Schizotrypanum chez les Chauves-Souris (*Vesperugo pipistrellus*) en Basse-Alsace. *C. R. Sc. Biol.*, 1921, LXXXIV, 943.
3. G. M. Wenyon. — *Protozoologie*. London, 1926, vol. I, p. 454.