

NOTE TECHNIQUE

**MICRORÉACTIONS D'AGGLUTINATION
ET DE FIXATION DU COMPLÉMENT
POUR LE DIAGNOSTIC DES BRUCELLOSES**

G. RENOUX, M. PLOMMET et A. PHILIPPON

*Station de Pathologie de la Reproduction,
Centre de Recherches de Tours, I.N.R.A.,
37 - Nouzilly*

RÉSUMÉ

Le matériel « Microtiter » assure rapidement et économiquement les réactions d'agglutination et de fixation du complément pour le diagnostic des brucelloses humaines ou animales. Ces microtechniques permettent l'analyse de 80 à 120 sérums à l'heure pour les 2 réactions.

Les résultats sont exactement superposables à ceux des réactions en tube, sous la réserve expresse que tous les titrages aient été effectués dans les plaques de microréaction.

INTRODUCTION

Le diagnostic sérologique des brucelloses animales est un temps essentiel de la prophylaxie, quand ce ne serait que pour déterminer les troupeaux indemnes de cette affection.

Le diagnostic épidémiologique de l'infection brucellique de l'homme, essentiellement en milieu rural, devient une nécessité pour prévenir d'éventuelles manifestations pathologiques à long terme qui pourraient découler d'une première atteinte, toujours difficile à diagnostiquer par les seuls moyens de la clinique (RENOUX, RENOUX et NOURRAIN, 1969 ; CARRARA, 1971.).

Dans l'un et l'autre cas, on se trouve confronté avec les problèmes connexes qui découlent du prix de revient des examens sérologiques et des difficultés à manipuler de grandes séries d'échantillons. Une approche intéressante de cette question, particulièrement pour les réactions de fixation du complément, est obtenue par un appareillage automatique (VARGUES *et al.*, 1970).

Les limites indiquées par ces auteurs eux-mêmes nous ont conduit à établir des microméthodes d'agglutination ou de fixation du complément qui soient très rapides, peu coûteuses et fidèles. Une microtechnique (TAKATSY, FURESZ et FARKAS, 1954) dont les paramètres ont été précisés pour la sérologie virale par SEVER (1962) a servi de base à nos investigations.

Le matériel utilisé est « Microtiter » (Cooke Engineering Co, Alexandria, Virginie, U.S.A.).

L'expérience a montré qu'il n'est pas possible, pour la sérologie de la brucellose, de se contenter des résultats des titrages en tubes (hémolysines, complément, antigène) et de la transposer à la microréaction. Il est indispensable d'effectuer tous les titrages dans les plaques en U pour

la déviation du complément, en U ou en V pour l'agglutination. Il est également indispensable de vérifier soigneusement et régulièrement le volume des microdilueurs, un par un, à l'aide du matériel fourni avec l'appareil.

I. — MICRORÉACTION D'AGGLUTINATION

L'antigène, coloré au chlorure de phényl tétrazolium, est celui qui est utilisé dans l'épreuve de l'anneau dans le lait (RENOUX, 1952; Comité FAO/OMS, 1953) d'origine commerciale (BD-M, Lyon), souche *B. abortus 99*.

Cet antigène est étalonné vis-à-vis du sérum étalon international, EISab (Comité OMS, 1953) afin que la dilution finale de ce sérum qui donne une réaction ++ en microréaction soit la même que dans la séroagglutination lente en tube : par exemple 1 : 650, ce qui correspond à la présence de 30 UI pour un sérum suspect agglutinant ++ à la dilution 1 : 20. Le plus souvent, ce titrage correspond à la dilution 1 : 20 de l'antigène concentré. Les sérums à étudier sont dilués 1 : 5 en tampon véronal ; les mêmes dilutions serviront à la réaction de fixation du complément.

Pour pratiquer la réaction d'agglutination, on place, à l'aide du distributeur, 25 microlitres d'eau salée à 0,85 p. 100 dans chacun des godets, sauf ceux de la première rangée. Dans cette première rangée, on porte 50 microlitres de chaque échantillon de sérum dans 1 godet ; ces sérums sont dilués 1 : 5. On dilue ces sérums à l'aide de microtiters de 25 microlitres, selon l'une ou l'autre des techniques du Manuel Cooke d'instruction. On ajoute alors, soit à l'aide de pipettes calibrées, soit avec le distributeur, 25 microlitres de suspension antigénique étalonnée dans chacun des godets de la plaque. Il faut empiler les plaques les unes sur les autres et recouvrir la plaque supérieure d'un plastique transparent adhésif pour éviter l'évaporation ; ensuite placer le tout pendant une nuit à l'étuve à 37°C. Lecture au-dessus du miroir. (fig. 1). Chaque plaque permet d'analyser soit 8 sérums à 12 dilutions (du 1 : 10 au 1 : 20 480), soit 12 sérums à 8 dilutions (du 1 : 10 au 1 : 1 280 = de 15 à 1920 UI).

II. — MICRORÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Antigène : suspension de *B. abortus 99* (BD-M) ;

Hémolysine et Complément : Institut Pasteur.

Globules rouges de mouton : récoltés aseptiquement en liquide d'Alsever contenant 0,1 p. 100 d'azide de sodium ; utilisés seulement 2 à 3 jours après la récolte. Ils se conservent au moins 1 mois. Pour l'emploi, laver le culot globulaire 3 fois en tampon véronal (KABAT et MAYER, 1948), remettre en suspension dans le même tampon pour obtenir une suspension globulaire à 3 p. 100 de culot. Les sérums, de référence ou suspects, sont dilués au 1 : 5 en tampon véronal et décomplémentés par chauffage à 60°C pendant 30 mn.

Les titrages — hémolysine, complément, antigène — se font dans les plaques de micro-réactions, avec les microtiters, en sorte que le titre final du sérum étalon soit dans le même dans la réaction en tubes (RENOUX et GAUMONT, 1966) et dans la microréaction.

Avec un antigène qui permet un titre final du sérum étalon de 1 : 256, nous considérons que tout échantillon de sérum qui donne une fixation du complément (hémolyse 50 p. 100), égale ou supérieure à la dilution initiale du sérum 1 : 10, est un sérum positif.

Pratique de la réaction

Nous donnons ici à titre d'exemple la réaction telle que nous la pratiquons. On peut utiliser d'autres systèmes, avec des volumes et concentrations de réactifs différents, dans les limites pratiques du matériel.

Tous les volumes sont exprimés en microlitre (= 0,001 ml).

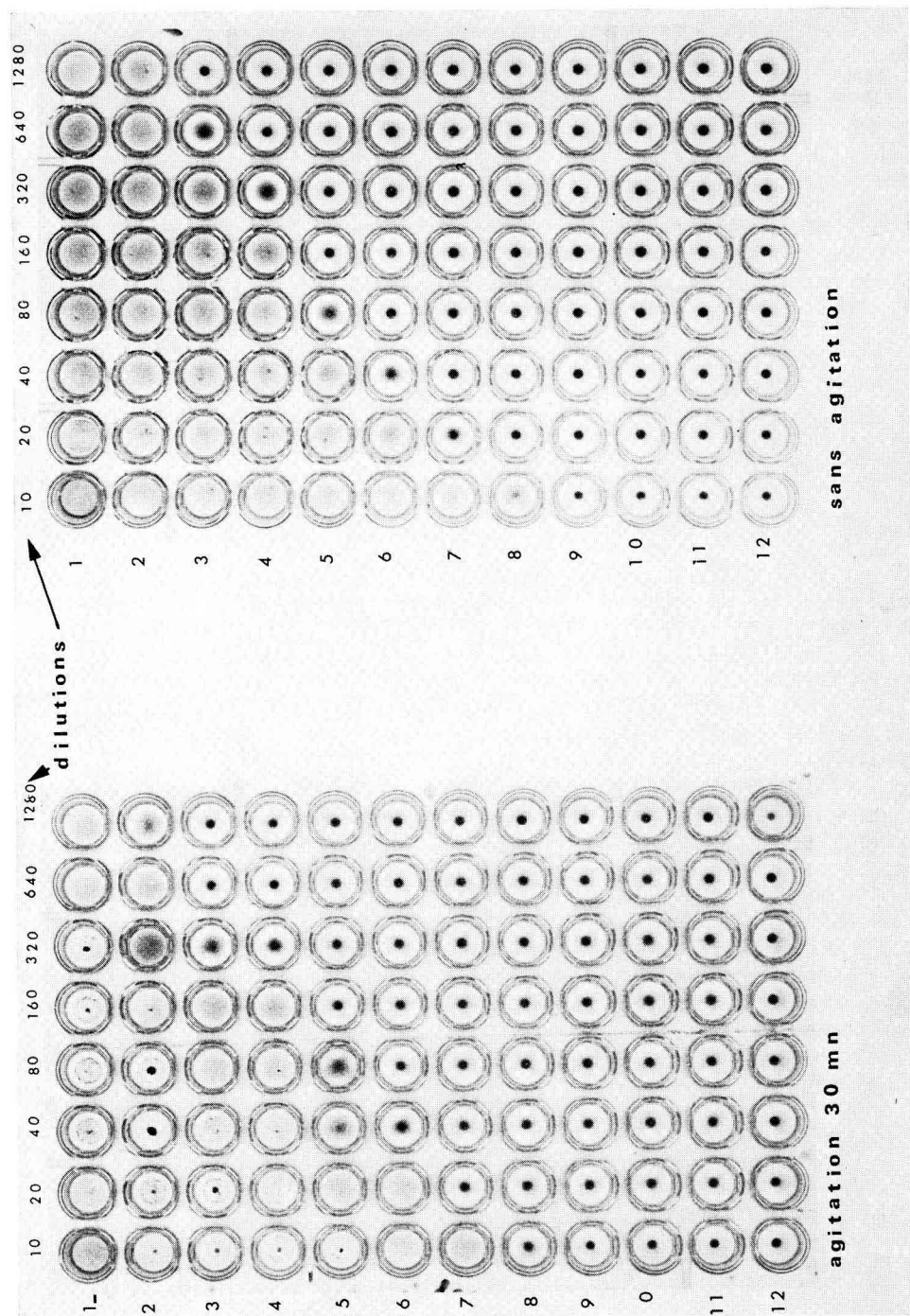


FIG. 1. — Lecture de l'agglutination

La plaque de droite a été incubée comme indiqué dans le texte, avec mélange des réactifs par agitation manuelle simple, en tapotant le bord de la plaque. Celle de gauche a été agitée sur appareil de Kline pendant 30 mn, à 37°C, avant d'être incubée.

Le point final de la réaction est désigné par la cupule où l'agglutination est au moins de 50 p. 100. L'agglutination complète est caractérisée par le dépôt des bactéries en voile homogène au fond du tube (ligne 1, droite) ou en forme de crêpe piquetée d'agglutinats (ligne 1, gauche). L'absence d'agglutination donne un dépôt bactérien en pastille (ligne 12). L'agglutination 50 p. 100 combine les 2 images, avec une pastille plus large, à bords flous, entourée d'un dépôt léger (cupule 320 : lignes 3 et 4 — cupule 80, ligne 6 — cupule 40, ligne 6 — cupule 20, ligne 7 — cupule 10, ligne 8). On peut noter une petite différence entre les deux réactions, ligne 3 : c'est la différence la plus importante que l'on peut observer en faisant des doubles.

1. *Titrage du système hémolytique.*

Le sérum hémolytique de l'Institut Pasteur est employé à la dilution 1 : 1 000 pour une suspension d'hématies de mouton à 3 p. 100.

2. *Titrage du complément.*

	Cupules	1	2	3	4
	Tampon	50	50 →	50 →	50 →
Ligne 1	Complément au 1 : 15	—	50		
	Antigène	25	25	25	25
			Incuber 1 h à 37°C		
	Système hémolytique	25	25	25	25
			Incuber 1 h à 37°C		
	Titre	T	1 : 30	1 : 60	1 : 120
Ligne 2	Complément 1 : 20				
	Titre	T	1 : 40	1 : 80	1 : 160
Ligne 3	Complément 1 : 25				
	Titre	T	1 : 50	1 : 100	1 : 200

Faire passer, dans chaque ligne, 50 de la 2^e cupule à la 3^e, puis de la 3^e à la 4^e et rejeter 50 de la 4^e cupule, à l'aide de microtiters de 50 microlitres.

La cupule donnant 100 p. 100 d'hémolyse (lecture au miroir) contient 1 Unité C'.

On utilisera 2 U C' 100 pour les réactions de fixation du complément sous le volume de 50 microlitres (0,05 ml).

3. *Titrage de l'antigène.*

Faire des dilutions du sérum de référence, EISab ou du sous-étalon de travail, sur autant de lignes qu'on veut tester de dilutions d'antigène (au moins 6 lignes) pour réaliser un titrage en échiquier, similaire à celui employé dans la réaction de fixation du complément en tubes : dans chaque cupule, 25 microlitres de la dilution sérique choisie et 25 microlitres de chaque dilution d'antigène ; ajouter 2 U C' 100 (50 microlitres) ; incuber 1 nuit à 4°C ; ajouter le système hémolytique titré (25 microlitres) ; 1 h à 37°C. Lecture au miroir.

La cupule *non hémolysée* (où la fixation a lieu à 100 p. 100) qui, avec la plus forte dilution de sérum, contient le moins d'antigène est celle qui correspond à l'unité d'antigène. On travaillera avec 2 U d'antigène.

En général, on obtient 2 U d'antigène brucellique avec un sérum étalon dilué à 1 : 256 et la suspension antigénique concentrée du commerce diluée aux environs de 1 : 350.

	Cupule	1	2	3	4	5	6	T. Ag.
Ligne 1	Tampon	25 →	25 →	25 →	25 →	25 →	25 ↑	50
	Sérum référence 1/y	25						—
	Antigène 1/x	25	25	25	25	25	25	25
	Complément 2 U	50	50	50	50	50	50	50
		Incuber 1 nuit à 4°C						
	Système hémolytique	25	25	25	25	25	25	25
		Incuber 1 h à 37°C, lecture						

Ligne 2, 3, 4, 5 : *idem* avec antigène 1/2x 1/3x 1/4x 1/5x

Ligne 6 antigène remplacé par 25 µl Tampon = Témoins Anticorps.

Les témoins Ag. et Ac. ont pour but de vérifier l'absence de pouvoir anticomplémentaire de l'antigène brucellique et du sérum de référence.

4. Réaction de diagnostic (étude des sérums suspects).

Les témoins indispensables sont :

a) Témoin « référence » (1 seul pour toute une série d'épreuves) : sérum étalon à la dilution moitié de celle donnée par le titrage de l'antigène, puisqu'on utilise 2 U d'antigène. Ce témoin a pour but de vérifier que les réactifs (Système hémolytique, C' et antigène) sont corrects et correctement employés.

b) Témoin antigène (1 seul pour toute une série de dosages) : vérifie que l'antigène n'est, ou n'est pas devenu, anticomplémentaire.

c) Témoins du C' : pour une série donnée de dosages, permettent de vérifier soit que le complément n'a pas varié soit qu'il est correctement dilué et utilisé.

d) 1 Témoin anticorps pour chaque sérum étudié permet de vérifier que ce sérum n'est pas anticomplémentaire à sa plus forte concentration : un sérum anticomplémentaire rend la réaction de fixation du complément ininterprétable.

Disposer les réactions de fixation sur la plaque de la manière suivante :

Cupules	1	2	3.....	8.....	12
Tampon	25	25	→ 25	→ 25	→ 25
Sérum à titrer	25	25	
Antigène 2 U	—	25	25.....	25.....	25
C' 100 2 U	50	50	50.....	50.....	50

Agiter doucement, en tapotant les bords des plaques. Empiler les plaques et recouvrir la plaque supérieure de plastique transparent adhésif pour éviter l'évaporation. Porter au réfrigérateur à 4°C pour la nuit. Le lendemain, sortir les plaques du réfrigérateur, ajouter 25 micro-litres d'hématies sensibilisées à chaque cupule. Couvrir, agiter doucement, porter à 37°C pendant 30 minutes. Vérifier que les témoins du complément, des sérums et de l'antigène sont corrects. Procéder à la lecture au-dessus du miroir, 10 mn après lecture des témoins.

Les témoins sont effectués sur une plaque à part :

Cupules	1	2	3	4
Tampon	—	50	25	—
Sérum étalon à double dilution de référence	25	—	—	—
Antigène	25	25	25	25
C' 100 2 U	50	25	50	75
	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin
	sérum	C' 100 1 U	C' 100 2 U	C' 100 3 U
	de référence		et de l'antigène	

Il est évident que, sauf au cas d'expérimentation, il n'est jamais nécessaire pour une réaction de diagnostic de procéder à 12 dilutions de chaque sérum. En pratique, on pourra placer 12 sérums sur 1 plaque et procéder seulement à 6 dilutions (taux 1 : 160).

Les comparaisons, échantillons analysés en double exemplaire en micro et en macroréactions, ont porté sur :

— 5 220 sérums pour la réaction d'agglutination :

136 sérums humains, 4 736 sérums bovins, 22 sérums caprins,
13 sérums ovins, 222 sérums de souris et rongeurs sauvages,
91 sérums de lapins ;

— 5 154 sérums pour la réaction de fixation du complément :

133 sérums humains, 4 673 sérums bovins, 22 sérums caprins,
13 sérums ovins, 222 sérums de souris et rongeurs sauvages,
91 sérums de lapins.

Les résultats de ces comparaisons permettent d'affirmer que les microréactions d'agglutination ou de fixation du complément pour le diagnostic des brucelloses sont exactement superposables aux réactions habituelles en tubes, sous la réserve essentielle que tous les titrages aient été faits dans les plaques et avec les microtiters.

Depuis 3 ans, ces microméthodes sont normalement utilisées dans ce laboratoire. L'expérience porte maintenant sur au moins 15 000 sérums provenant de toutes les espèces animales, Homme compris. Cela fait, approximativement, plus de 40 000 réactions d'agglutination ou de fixation du complément de la brucellose qui ont été ainsi effectuées à l'aide des microtiters.

Cette vaste expérience permet des conclusions pratiques :

— il faut 0,2 ml d'antigène coloré, dilué 20 fois, pour une réaction d'agglutination ; 1 ml d'antigène pur suffit pour 100 sérums ;

— il faut 0,2 ml de suspension antigène pour une réaction de fixation du complément ; 1 ml de suspension du commerce suffit pour 1 750 sérums ;

— il faut 0,1 ml de sérum dilué 1 : 5 pour pratiquer les deux réactions, agglutination et déviation du complément ;

— il faut 0,4 ml de complément dilué pour chaque déviation du complément.

Ces faibles quantités de réactifs, jointes au prix peu élevé du matériel, rendent économiquement possible les études épidémiologiques par sérologie, y compris les examens nécessaires pour les prophylaxies.

De plus, le temps de travail est considérablement réduit, au point que, dans ce laboratoire, toute la sérologie est concentrée en une journée :

— à partir du moment où les échantillons de sang arrivent au laboratoire jusqu'au moment où tous les résultats sont inscrits sur le registre soit, par exemple, de 9 h au lendemain 11 h, 1 technicien analyse, par les deux réactions, entre 350 et 400 échantillons ;

— si l'on ne compte que le temps passé à partir du moment où les sérums sont décantés, 1 technicien effectue les microréactions d'agglutination et de fixation du complément de 80 à 120 sérums par heure.

Reçu pour publication en mai 1971.

SUMMARY

THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS BY MICROAGGLUTINATION AND COMPLEMENT FIXATION TESTS

The use of « Microtiters » permitted serial serological diagnosis of brucellosis to be performed in man and animals, quickly and cheaply, by agglutination and complement fixation techniques. 80 to 120 sera could be analyzed per hour by both tests using these microtechniques.

The results obtained were identical to those obtained by tube tests, if all titrations were performed in the microtitration plates.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CARRARA J. B., 1971. *Enquête sur l'incidence de la brucellose des éleveurs de chèvres dans une zone de la région Centre*. Thèse Médecine, Tours.
- Comité mixte FAO/OMS d'Experts de la Brucellose, 1963. *Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn.*, **67**.
- KABAT E. A., MAYER M. M., 1948 in *Experimental Immunochimistry* pp. 97-139, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- RENOUX G., 1952. Étallonage de l'antigène coloré au chlorure de phényltétrazolium (Bendsten) pour l'épreuve de l'anneau sur le lait, *Bull. Off. internat. Épizoot.*, **37**, 542-551.

- RENOUX G., GAUMONT R., 1966. Méthodes de diagnostic biologique des brucelloses animales. *Cahiers du C.N.E.R.N.A.*, C.N.R.S., Paris.
- RENOUX G., RENOUX M., NOURRAIN G., 1970. Brucellose à *Brucella abortus* chez l'homme en France. Une enquête en Indre-et-Loire. *Sem. Hôpitaux*, **48**, 2015-2023.
- SEVER J. L., 1962. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*, **88**, 32-37.
- TAKATSY G., FURESZ J., FARKAS E., 1954. Studies on the quantitative relationship of Influenza virus-antibody union by means of a simple antibody absorption test. *Acta Physiol. Hung*, **5**, 241-245.
- VARGUES R., VALETTE L., RIVE M., STODIEVIC C., 1970. Automatisation du dépistage de la brucellose bovine par séroagglutination ou par fixation du complément avec l'auto-analyseur Technicon. *Internat. Symp. Brucellosis*, Tunis, 1968; *Symp. séries immunobiol. Standard.*, vol. 12 pp. 382-388; Karger Basel, New York.
-