

La réaction de fixation du complément dans le dépistage de la brucellose à l'aide d'un appareil automatique (*)

L. VALETTE et L. JOUBERT (**)

(Note présentée par P. GORET)

L'automatisation en sérologie spécifique, née des premiers travaux de VARGUES (7, 8, 9, 10) et son application particulière au dépistage de la Brucellose, ont été décrites dans leurs principes fondamentaux dans une publication précédente (4). La présente note se propose d'en préciser les modalités d'application et la réalisation pratique. Après la description du montage de l'appareil choisi et l'inventaire des réactifs utilisés, les résultats obtenus seront exposés puis discutés.

1. MONTAGE DE L'APPAREIL

Identique à celui mis au point par VARGUES (11) en sérologie de la syphilis, le montage correspond à une *réaction rapide*.

Les réactifs proviennent d'un plateau à échantillons, sont aspirés par une pompe à galet, passent devant la cellule photoélectrique et les résultats sont notés par un enregistreur (schéma n° 1).

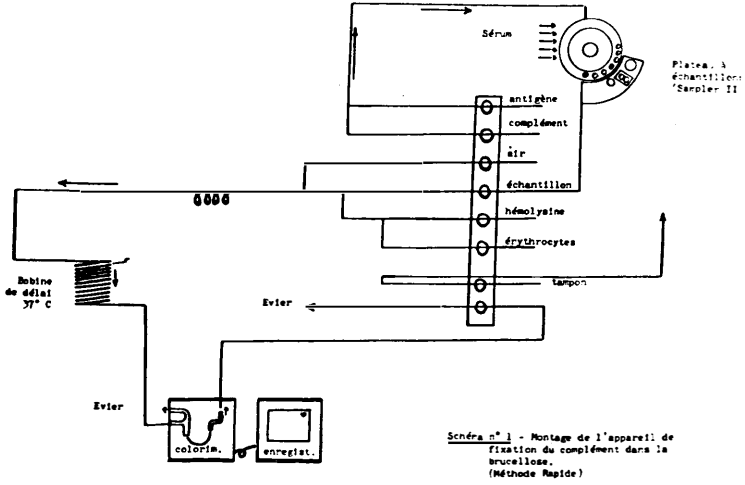
Le plateau à échantillons sert également de bain-marie de fixation du complément. La température du mélange est de 37° C. Les variations de cette température présentent d'ailleurs peu d'importance sur la fixation, dans des limites données [Tableau n° 2 (***)].

La pompe proportionnante aspire l'antigène (0,80 ml/minute) et le complément (0,80 ml/minute) et les envoie sur le plateau ; le mélange tombe dans un godet maintenu à 37° C, où se trouvent les sérums à examiner. La pompe aspire alors, après incubation (came

(*) Auto-analyseur Technicon, Domont (95).

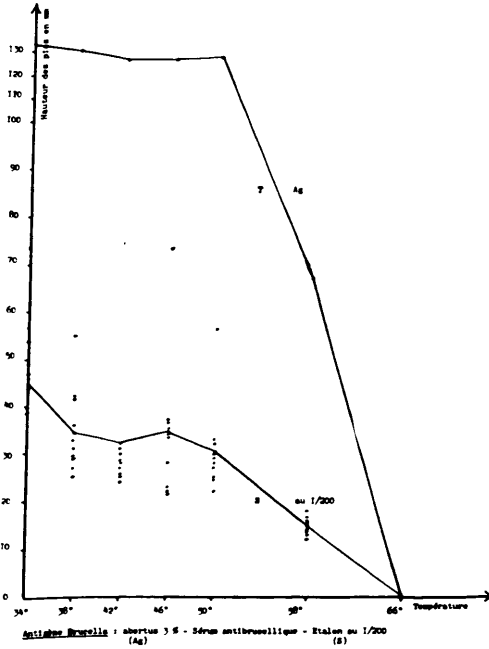
(**) Avec la collaboration technique de M^{me} LIVROZET. En outre, nos remerciements sont acquis au Dr Vét. M. ROUMIANTZEFF de l'I. F. F. A. (Lyon), et au Dr STUJIEVIC de la Cie Technicon, qui nous ont fait bénéficier de leur grande expérience de l'automatisation en sérologie.

(***) Exprimé par la courbe n° 2.



- Tableau n° 2 -

Influence de la température sur la fixation du complément



Courbes n° 1 et n° 2

70, 2/1), l'ensemble sérum + antigène + complément (2 ml/minute), le mélange au couple hémolytique (1,2 + 1,2 ml/minute) et pousse, par des bulles d'air (1,2 ml/minute), le complexe dans le bain-marie, où se développe l'hémolyse pendant 10 minutes.

Le passage dans la cellule photoélectrique (à 660 m μ) permet d'enregistrer les divers degrés d'hémolyse.

2. RÉACTIFS

a) Antigène.

La suspension antigénique brute concentrée, utilisée pour la séro-agglutination, est employée après dilutions convenables pour la réaction de fixation du complément. Indemne d'antiseptiques, elle doit subir un lavage préalable, qui la débarrasse des particules d'agar anti-complémentaires, puis un chauffage à 80° C pendant une heure.

L'antigène contient environ 80×10^9 corps bactériens par ml. La souche ici choisie est *Brucella abortus* 99 de Weybridge, selon les recommandations de l'O. M. S.

Dilué initialement au 1/10, puis en dilutions exprimées en p. 100 (de 0,1875 p. 100 à 10 p. 100) en tampon de Mayer Lévine (*), il est titré contre un sérum positif (d'origine caprine anti-*Br. melitensis* H. 38) par la méthode rationnelle complète en échiquier (Tableau n° 3 — Courbe n° 4). La plus haute dilution d'antigène donnant une réaction positive avec la plus grande dilution de sérum correspond à une unité d'antigène.

On peut considérer que, pour des pics de 0 à 50 mm, la réaction doit s'inscrire à 3 ou 4 croix, de 50 à 100 mm, à 2 croix, et, à partir de 120 mm, à 0 (100 p. 100 d'hémolyse), point vérifié, à la première ligne, pour chaque dilution d'antigène (T).

La même réaction, opérée à l'aide d'un antigène *Br. melitensis* H. 38 (Tableau n° 5 — Courbe n° 6) montre la légère spécificité de

(*) Tampon de Mayer Lévine (KABAT et MAYER, *Immunochemistry*, 1961, p. 149)

— Chlorure de sodium.....	85	g
— Véronal sodique.....	3,75	g
— Véronal.....	5,75	g
— Chlorure de magnésium 6 H ₂ O.....	1	g
— Chlorure de calcium 2 H ₂ O.....	0,20	g
— Eau distillée q. s. p.	2.000	ml
à diluer au 1/5		
pH : 7,4		

TABLEAU N° 3 et COURBE N° 4

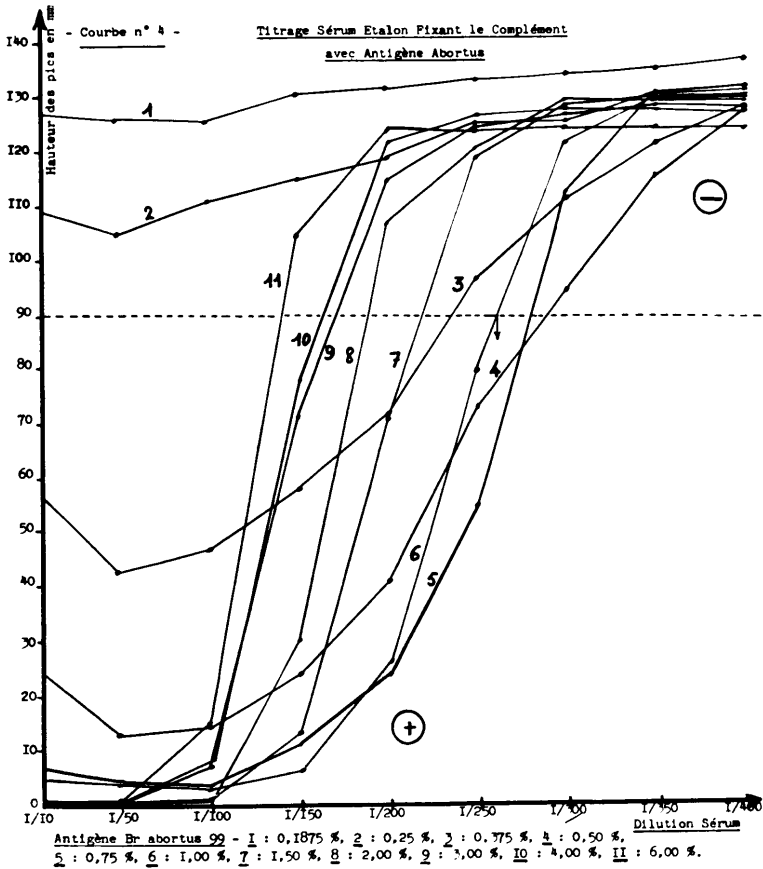
Réaction de fixation du complément rationnelle complète en échiquier montée pour la recherche de la concentration optimale d'antigène *Br. abortus* (la hauteur des pics d'hémolyse est exprimée en mm)

Conditions techniques : GR lot 3704 DO : 0,32

SH lot 7850 1/500

C' lot 4701 1,2 %

Antigène <i>Br. abortus</i> 99 Sérum étalon chèvre anti- <i>Br. meliten-</i> <i>sis</i> H 38	6 %	4 %	3 %	2 %	1,5 %	1 %	0,75 %	0,5 %	0,375 %	0,25 %	0,187 5 %
	T : 125	T : 128	T : 129	T : 129	T : 131	T : 131	T : 133	T : 134	T : 140	T : 140	T : 142
1/10	0	0	0	0	0	4	7	24	56	149	127
1/50	0	0	0	0	0	3	3	13	43	105	126
1/100	17	8	7	0	0	2	3	16	47	111	126
1/150	105	78	71	30	13	6	11	24	58	115	131
1/200	124	122	117	107	71	26	24	41	72	119	132
1/250	124	127	127	121	119	80	55	73	97	125	134
1/300	125	128	128	130	129	122	113	95	112	126	135
1/350	125	128	129	130	130	130	131	116	122	131	136
1/400	125	128	129	130	130	131	133	129	130	133	138
1/500							140	139	138	138	138
1/1 000							140	140	140	140	140



l'antigène d'espèce : ainsi, à concentration antigénique égale (1,5 p. 100), le titre apparent du sérum est plus élevé avec l'antigène *Br. melitensis*, qu'avec l'antigène *Br. abortus*.

b) Complément et couple hémolytique.

Un lot de complément lyophilisé, aussi important et homogène que possible, est conservé à + 4° C. Sa stabilité est telle que l'on peut prévoir seulement trois dilutions pour le titrage de départ 0,8 p. 100, 1 p. 100 et 1,2 p. 100 (Enregistrement n° 7).

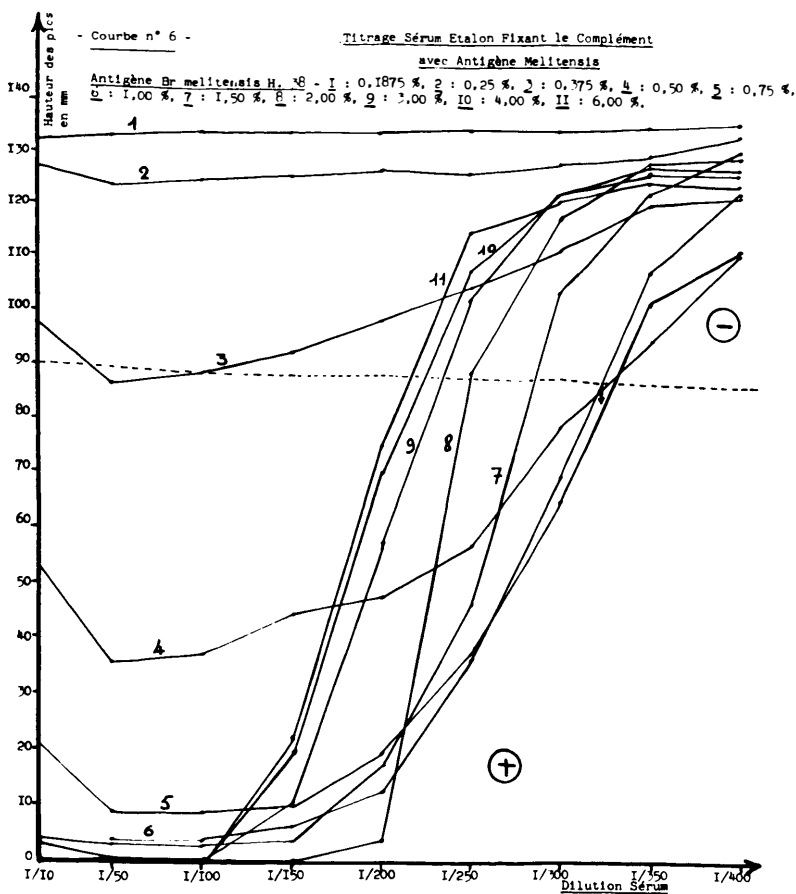
Le choix porte sur la concentration la plus faible provoquant encore 100 p. 100 d'hémolyse.

TABLEAU N° 5 et COURBE N° 6

Réaction de fixation du complément rationnelle complète en échiquier montée pour la recherche de la concentration optimale d'antigène *Br. melitensis* (la hauteur des pics d'hémolyse est exprimée en mm)

Conditions techniques identiques

Sérum ' étalon chèvre anti- <i>Br. melitensis</i> H 38	Antigène <i>Br. melitensis</i> H 38										
	6 %	4 %	3 %	2 %	1,5 %	1 %	0,75 %	0,5 %	0,375 %	0,25 %	0,187 5 %
	T : 127	T : 131	T : 132	T : 134	T : 134	T : 135	T : 135	T : 135	T : 140	T : 139	T : 140
1/10	0	0	4	3	4	9	21	53	97	127	132
1/50	0	0	0	0	3	4	9	36	87	124	133
1/100	0	0	0	0	3	4	9	38	90	126	135
1/150	23	20	11	0	4	6	11	46	94	127	135
1/200	77	72	59	4	18	13	20	49	100	128	135
1/250	117	110	108	91	48	38	38	59	107	128	136
1/300	123	124	124	120	106	71	67	81	114	130	136
1/350	127	129	130	130	127	111	105	98	123	132	137
1/400	127	129	130	132	133	126	115	115	125	136	138
1/500							132	130	134	136	138
1/1.000							132	139	140	140	140



Courbe n° 6

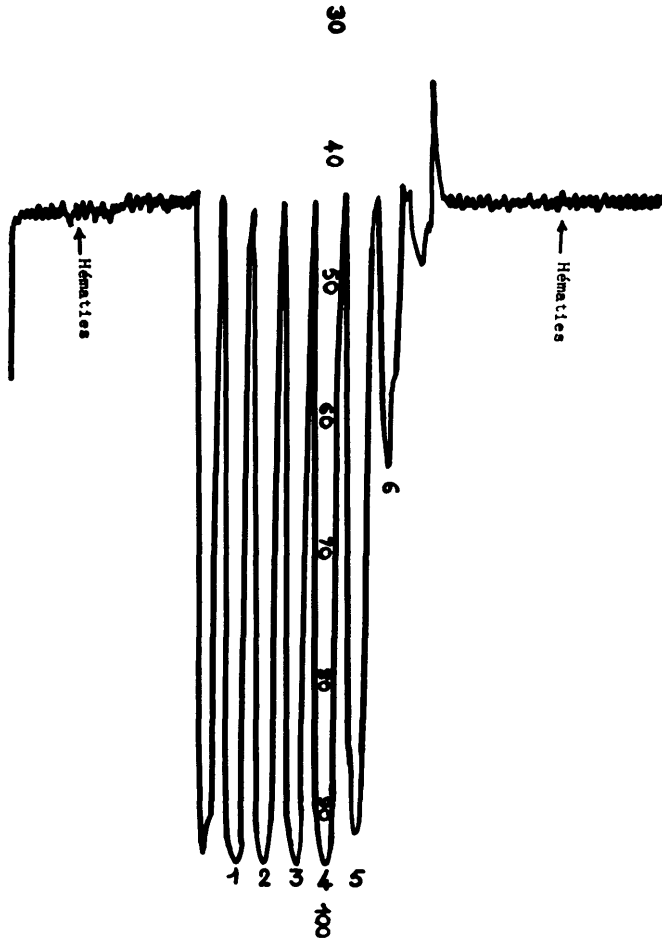
Durant la journée, il est recommandé, par mesure de sécurité, de lancer dans le circuit, à une ou deux reprises, la dilution de complément employée, pour vérification du 100 p. 100 d'hémolyse.

Toutefois, en pratique, la baisse d'activité du complément pendant 8 heures est négligeable.

Les globules rouges de mouton sont utilisés en tampon pour une densité optique (D. O.) de 0,30, et le sérum hémolytique de l'Institut Pasteur, en léger excès, à 1/500 ou 1/1.000 (Enregistrement n° 8).

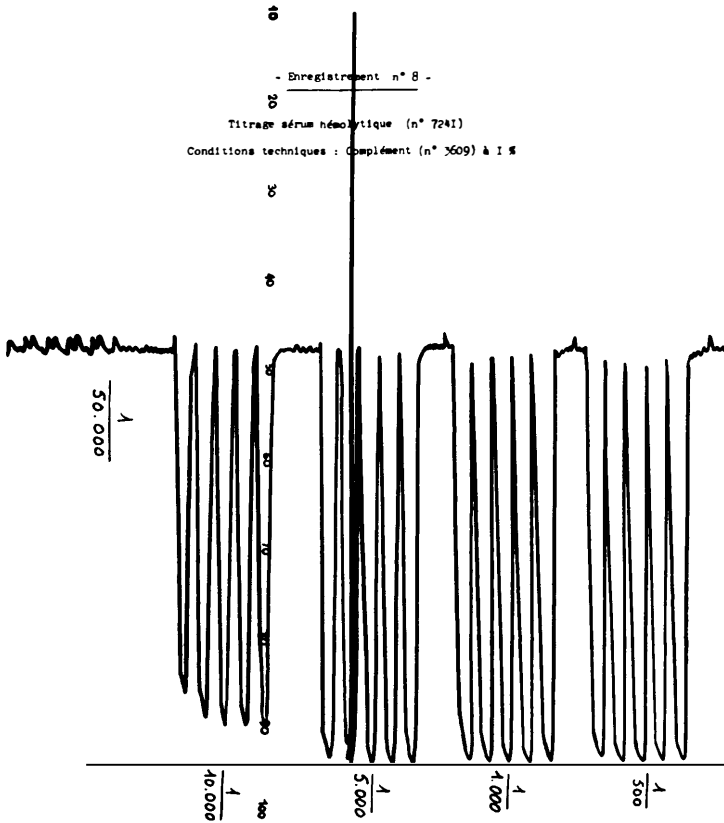
- Enregistrement n° 7 -

Titration du Complément



n° 1 : 1,8 %
 n° 2 : 1,6 %
 n° 3 : 1,4 %
 n° 4 : 1,2 %
 n° 5 : 1 %
 n° 6 : 0,8 %

Enregistrement n° 7



c) *Sérum étalon.*

Il s'est très rapidement révélé que l'emploi d'un sérum positif étalon, stable, procurait une garantie indispensable dans l'interprétation des titrages : aussi l'emploi d'un sérum positif lyophilisé fut-il systématique. Il provoque l'apparition d'un pic d'hémolyse compris entre 41 et 116 mm, à la dilution 1/200, qui correspond à une dilution finale du sérum au 1/800 dans l'appareil.

Or, dans la technique classique en tubes, cette dilution entraîne une fixation à une ou deux croix. Ce parallélisme, essentiel pour l'interprétation des résultats enregistrés, a été vérifié 1.500 fois, pendant 9 mois, avec 3 lots d'antigènes. Les limites observées sont comprises entre 41 mm et 116 mm, pour une moyenne de 85 mm (Schéma n° 9).

D'ailleurs, avec la ligne de base fournie par le témoin globules rouges (absence d'hémolyse) et le 100 p. 100 d'hémolyse, la dilution à 1/200 du sérum étalon demeure le seul témoin à vérifier plusieurs fois, au cours d'une série de réactions étalées sur une journée.

En effet, une défaillance du complément, de l'antigène ou du couple hémolytique retentirait immédiatement sur la valeur du pic d'hémolyse donné par ce sérum témoin.

3. RÉACTION

Le montage en *réaction rapide*, décrit ci-dessus, permet une réaction de fixation du complément *rapide*, mais seulement *qualitative*. Elle ne saurait devenir quantitative qu'à la condition de lancer plusieurs dilutions dans les godets du plateau échantillons, mais elle se dépouillerait alors de son automaticité complète, pour devenir seulement semi-automatique.

Dans la pratique du diagnostic courant, il suffit de ne passer que les sérums purs, amenés à une dilution au 1/4 en raison des débits des divers réactifs, d'une part comme sérums en réaction, puis d'autre part comme sérums en témoins, pour vérification de l'absence du pouvoir anti-complémentaire. Les sérums provoquant un pic égal ou inférieur à celui obtenu avec le sérum étalon au 1/200 sont considérés comme positifs.

Un montage différent, en *réaction cinétique*, autorise une notation *quantitative*, qui tend à relier le phénomène de fixation du complément, donc d'inhibition de l'hémolyse, à une réaction de type enzymatique : la tangente de la droite de réaction (hémolyse en fonction de la puissance du sérum) est alors proportionnelle au pouvoir d'inhibition de l'hémolyse du sérum. Cette parenté, déjà suggérée par VARGUES (7), se révèle extrêmement féconde et permet des mesures précises de l'activité hémolytique de ce système, impossibles dans les réactions classiques en tubes.

4. DISCUSSION

L'automation de la réaction rapide de fixation du complément dans la Brucellose permet une meilleure reproductibilité de cette réaction. Elle exige des réactifs bien titrés (5 et 6), mais, par sa rapidité et sa sûreté, elle mérite une large diffusion.

De plus, le schéma cinétique de cette réaction permet une comparaison très précise entre divers antigènes.

Par ailleurs, l'étude comparative de 1.500 sérums, provenant

d'animaux vaccinés ou infectés, d'une part en réactions automatique rapide avec dilutions, d'autre part en réactions manuelles classiques en tubes (*), laisse ressortir la concordance totale des deux méthodes.

Il semble en outre possible d'en déduire :

— la *supériorité de la réaction automatique* sur la réaction manuelle, tenant surtout à la *précision chiffrée de la lecture* en densités optiques à 660 m μ (D. O.) de celle-là, par rapport à l'empirisme de la notation en croix (+) de celle-ci : ainsi, une réaction + à 1 p. 1.000 correspond à 0,5 à 0,15 D. O. à 1/200. En outre, la *correspondance* est régulière entre l'une et l'autre : ainsi le sérum pur en technique manuelle équivaut à un sérum à 1/4 en technique automatisée, d'où meilleure précision, là encore. Enfin, la séparation fondamentale des sérums négatifs (-) et non négatifs (+ à + +) s'effectue, en technique automatique, selon une *démarcation linéaire* d'une grande précision, inconnue en technique manuelle de fixation du complément et en séro-agglutination lente (schéma n° 9) ;

— la *nécessité de définir des unités particulières* en technique automatisée, afin de lui conférer sa pleine autonomie et d'en développer toute la précision et les nuances. En particulier, la *définition internationale, en unités d'hémolyse annulées, d'un sérum étalon*, d'un intérêt supérieur au titrage du complément lui-même, permet de cadrer immédiatement la série de réactions en cours ;

— toutefois, *l'impossibilité d'établir un tableau de concordance quantitative* entre la réaction de fixation du complément et la séro-agglutination lente, puisque ces deux réactions sérologiques se séparent par une différence *qualitative et cinétique* d'une grande netteté : plus tardive, plus fidèle, plus prolongée, la positivité de la réaction d'hémolyse est également beaucoup plus sensible à l'infection spontanée ou expérimentale qu'à la vaccination (12). Aussi, dans un sérum donné, ne saurait être établie une concordance entre le taux d'agglutinines et le taux de sensibilisatrices, celles-ci présentant une valeur certes supérieure, mais offrant l'inconvénient majeur de ne pas être de recherche réglementaire, du moins encore à l'heure actuelle.

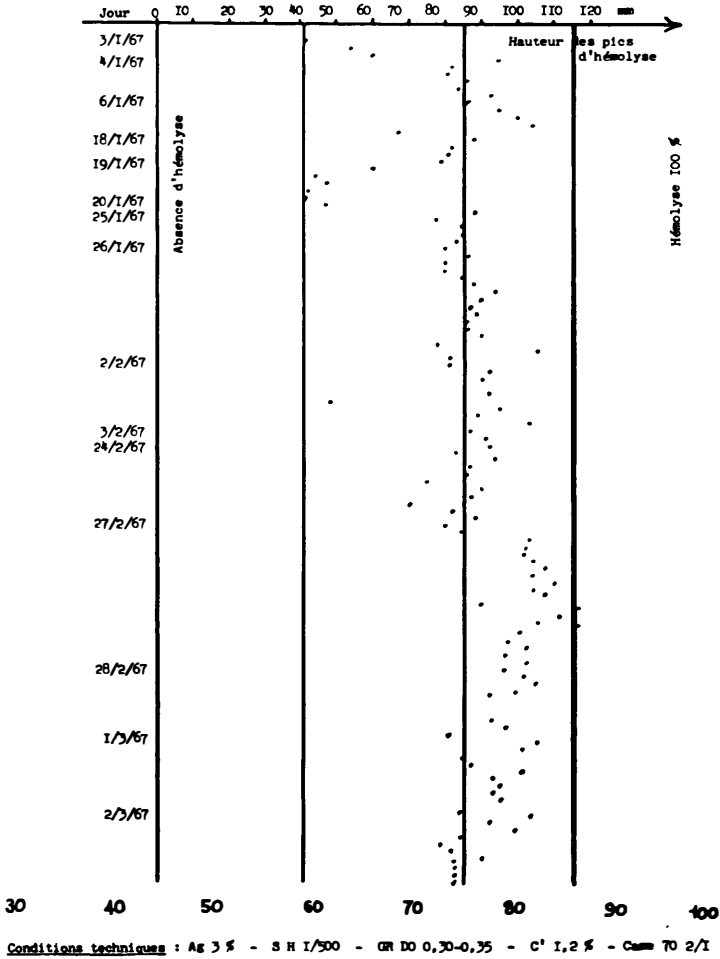
5. CONCLUSION

La réaction de fixation du complément automatique rapide est applicable au dépistage courant de la Brucellose.

Réalisée comparativement avec les méthodes manuelles classiques

(*) Méthode prescrite dans l'arrêté ministériel du 3 juin 1966 (Annexe)

- Schéma n° 9 -

Variations du sérum étalon au I/200
(entre 41 mm et 116 mm)

sur 1.500 sérums bovins, ovins, caprins et humains, elle s'est caractérisée par une très grande *précision*, une bonne *reproductibilité* et une *rapidité* qui, à elle seule, représente un atout majeur.

Toutefois, l'usage d'un *sérum étalon* fixant le complément semble indispensable dans la pratique de la réaction.

(Institut Mérieux
et Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon).

BIBLIOGRAPHIE

1. FAGARD (P.), PINCKERS (F.), et DEDEYSER. — De l'importance de la fixation du complément pour l'interprétation sérologique post-vaccinale au B. 19 et post-infectieuse de la Brucellose. *Bull. Off. Intern. Epizooties*, 1959, **51**, 862.
 2. GOYON (M.). — Déviation du complément dans la Brucellose. Existence de phénomène de Zone. *Rec. Med. Vet.*, 1966, **142**, 587.
 3. JONES (L. M.), HENDRICKS (J. B.) et BERMAN (D.). — The standardisation and use of the complement fixation test for the diagnosis of bovine Brucellosis. *Ann. J. Vet. Res.*, 1963, **24**, 1143.
 4. JOUBERT (L.), ROUMIANTZEFF (M.) et VALETTE (L.). — L'automatisme en sérologie spécifique — Application au dépistage de la Brucellose. *Rev. Med. Vet.*, 1967, **118**, 307.
 5. RENOUX (G.). — Etalonnage des antigènes pour le diagnostic biologique de la Brucellose. *Progr. Immunob. Standard* 1964, Karger Bâle, Vol. 1, p. 176.
 6. ULBRICK (F.) et SCHEIBNER (E.). — Standardisation of the Brucellosis complement fixation test. *Proceed. 8th intern. Congress of Microb. Stand.* Berne, 1962, Karger Bâle.
 7. VARGUES (R.). — Recherches sur la cinétique des réactions de fixation du complément. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **108**, 196.
 8. VARGUES (R.) et AUDRAN (R.). — Calcul du coefficient de vitesse de l'inactivation du Complément par les substances anticomplémentaires. *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **111**, 36 (Supplément n° 5).
 9. VARGUES (R.) et GONTHIER (F.). — Obtention automatique des courbes de titrage du Complément. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **108**, 526.
 10. VARGUES (R.), STUDIEVIC (C.), MORAUD (B.) et GONTHIER (F.). — Effet de la température sur la vitesse de la réaction de fixation du complément. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **109**, 39.
 11. VARGUES (R.), STUDIEVIC (C.) et RIPAUT (C.). — L'automatisation de la réaction de Bordet-Wassermann. *Ann. Biol. Clin.*, 1965, **23**, 623.
 12. WISNIOUSKI (J.). — The role of the complement fixation test in the serological diagnosis of Brucellosis in cattle. *Brit. Vet. J.*, 1964, **120**, 15.
-