

2 Vours 638

638

100

UTILISATION DU MATERIEL "MICROTITER" DANS
LA FIXATION DU COMPLEMENT EN SEROLOGIE DE
LA PERIPNEUMONIE BOVINE

Microbio. : péripneumonie bovine

M.P. DOUTRE (x) et B. TOURE (xx)

L'emploi du matériel "Microtiter" a connu ces dernières années une large diffusion, aussi bien en sérologie virale qu'en sérologie bactérienne (2,3). En France, en pathologie vétérinaire, certains laboratoires utilisent, d'une façon routinière, les techniques de microréactions au cours des travaux de diagnostics ou de recherches que ces organismes poursuivent. C'est ainsi qu'au Service de Pathologie de la Reproduction de l'I.N.R.A. (Tours-L'Orfrasière), les sérologies de la brucellose (9), de la chlamydiose et de la fièvre Q sont exécutées en faisant appel à cette méthode fidèle qui permet de manipuler rapidement de grandes séries d'échantillons, en économisant les réactifs parfois coûteux.

La sérologie de la péripneumonie bovine, tout particulièrement en Australie et en Afrique tropicale, a donné lieu à de nombreux développements au cours des récentes décennies. Les méthodes présentées par les auteurs, trop nombreux pour être cités, ont toutes contribué, peu ou prou, à faciliter le diagnostic de la maladie et à mieux connaître la cinétique des anticorps ou le devenir des substances antigéniques élaborées lors de l'évolution de l'affection. Dans cet ensemble, la fixation du complément (CFT) demeure le test le plus communément pratiqué, il a rendu et continue à rendre de grands services lorsque s'imposent la nécessité de préciser l'extension d'un foyer, de suivre le déroulement d'une épreuve d'immunité (expérience contact de type australien), etc...

Si l'on excepte la réaction d'hémagglutination indirecte décrite par PERREAU (6), celle de fixation du complément selon CAMPBELL et TURNER, de PROVOST (7,8) ou celle de KARST (5) ou de SCUDAMORE (10), la sérologie sur plaques n'a pas encore connu, semble-t-il, une utilisation aussi généralisée que les méthodes mettant en jeu, dans des tubes, des volumes de réactifs plus importants.

(x) : Chef du Service de Bactériologie au Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires (I.S.R.A.).

(xx) : Technicien supérieur, Service de Bactériologie, Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires (I.S.R.A.).

La présente publication a pour but de présenter une technique de micro-réaction de fixation du complément, dérivée du test classique de KOLMER, dont l'exécution est rendue possible par l'emploi du matériel "Microtiter" (x).

MATERIEL ET METHODE

A - MATERIEL :

Il comprend essentiellement (photo 1) :

- des plaques de 8 rangées de 12 cupules en U, en lucite (A),
- des compte-gouttes de 25 à 50 microlitres (μ l.) en polypropylène moulé, à pointe en acier inox (B) pour la répartition des réactifs,
- des compte-gouttes à usage unique (disposable) en plastique de 25 et 50 μ l. (F) pour la répartition des sérums à la dilution du 1/5 (en fait, après nettoyage, rinçage et séchage, ces compte-gouttes peuvent être réutilisés),
- des micro-diluteurs "Multi" de 25 à 50 μ l. (E), encore appelés tulipes,
- le manche pour micro-diluteurs "Multi" (E),
- des buvards spéciaux dits "go-no-go", pour tester les micro-diluteurs de 25 à 50 μ l. (D),
- l'adhésif auto-collant, le distributeur d'adhésif, le rouleau pour appliquer parfaitement l'adhésif et la lame montée pour le couper (G),
- le micro-agiteur AM69 pour 4 plaques (Microtiter) ou le vibreur (dit aussi vibreur) pour 4 plaques microtitration (Luckham Ltd, Burgess Hill, Sussex, England) (photo 2). Appareil essentiel pour la fixation du complément en péripneumonie, l'agitation manuelle dans un plan horizontal étant insuffisante pour la bonne diffusion des réactifs et du couple hémolytique,
- un bain-marie ordinaire (ex. MAMERT),
- le miroir de lecture (C),

... / ...

(x) : Cooke Engineering Company, Medical Research Division, 735 North Saint Asaph Street, Alexandria, Virginia 22314. Représenté en France par Poly-Labo, Paul Block et Cie, 305 Route de Colmar, 67023 Strasbourg Cédex.

- des portoirs divers peuvent être ajoutés (B),
- un frigidaire ou une chambre froide à t 4°C.

Deux remarques s'imposent :

- l'utilisation du matériel (micro-diluteurs) et son entretien (lavage des plaques) obéissent à des règles strictes, annoncées par le fabricant, qui doivent être impérativement respectées,
- le prix de revient peut apparaître élevé, mais la multiplicité des titrages réalisables, pour de nombreuses affections, lui donne en fait le caractère d'un équipement de base de tout laboratoire moderne.

Produits biologiques et réactif :

- sérums à tester : les prises de sang doivent être effectuées le plus stérilement possible pour diminuer au maximum le nombre des sérums anticomplémentaires (VEINOTUBES, VACUTAINERS, matériel PPELVEX-COOPER). Les sérums sont séparés au Laboratoire par centrifugation,
- tampon véronal-calcium-magnésium (B.D.MERIEUX, OXOID) ,
- antigène : préparé selon la technique de CAMPBELL et TURNER (1) par le Service de Microbiologie de l'I.E.M.V.T. (x),
- complément : lyophilisé (Institut Pasteur, B.D. MERIEUX) ou frais mais de bon titre.,
- sérum hémolytique de lapin anti-hématies de mouton (Institut Pasteur~
- hématies de mouton : le protocole suivant est préconisé (4) : utiliser toujours la même brebis ; avec une seringue de 50 ml., contenant 25 ml. de solution d'Alsever, récolter stérilement 25 ml. de sang ; mettre les 50 ml. dans un ballon stérile. Attendre au moins 3 jours avant d'utiliser les hématies, les laver alors 3 fois par centrifugations successives en tampon.

On utilise dans la réaction une suspension à environ 3 pour 100. Pour plus de précision, il est recommandé de standardiser la suspension en procédant aux opérations qui suivent :

- à partir de 5 ml. de culot d'hématies, après lavage, préparer 50 ml. de suspension d'hématies,
- utiliser le spectrophotomètre (au laboratoire de Dakar : BECKMAN,

.../...

(x) : L'antigène préparé à partir du surnageant du produit préparé par le Service de Bactériologie de l'I.E.M.V.T. (lot ancien) est tout particulièrement recommandé.

model 25, USA) à 540 mμ de longueur d'onde, étalonner le 0 avec une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) au 1 p.1000,

- mesurer l'absorbance de :

suspension d'hématies 0,1 ml.

solution Na₂CO₃ 4,8 ml.

L'absorbance finale doit être de 135 ± 5.

Le volume V de la suspension d'hématies à préparer pour obtenir 135 est ainsi calculé :

$$V = \frac{\text{absorbance lue}}{135} \times \text{volume de la suspension à titrer.}$$

Lorsque la suspension définitive d'hématies est obtenue, vérifier que :

suspension définitive d'hématies 0,1 ml.

solution Na₂CO₃ 4,8 ml.

ont une absorbance de 135 ± 5. Faire deux lectures.

Conserver à la température du frigidaire cette suspension d'hématies.

B - METHODE

Dans un but de clarté, pour exposer une méthode bien plus facile à exécuter qu'à décrire, la façon de disposer les plaques de microtitration face à l'opérateur a été qualifiée :

- d'"horizontale", lorsque la longueur est placée de gauche à droite.

Ainsi une plaque comporte 8 rangées "horizontales" de 2 cupules allant de A à H ou 12 rangées "verticales", de 8 cupules allant de I à L.

- de "verticale", lorsque la largeur de la plaque se trouve de gauche à droite. Alors une plaque comporte 12 rangées "horizontales" de 8 cupules allant de I à L, ou 8 rangées "verticales" de H à A (fig. I).

1 - Titration du système hémolytique : Le titrage d'un sérum hémolytique s'est révélé très difficile à réaliser en microtitrer. Après différents essais, le sérum hémolytique de l'Institut Pasteur de Paris est employé à la dilution de 1 p.1000

.../...

pour une suspension d'hématies de mouton présentant une absorbance de 135 ± 5 . La sensibilisation des hématies est effectuée en mélangeant à volumes égaux sérum hémolytique au 1 p.1000 et suspension d'hématies à 135 ± 5 d'absorbance. Bien agiter. Dans toutes les réactions le couple hémolytique est ajouté sous un volume de 25 μ l.

2 - Titration du complément (photo 3 et fig.2)

Le protocole proposé permet d'économiser au maximum le complément (4):

- préparer 3 tubes à hémolyse contenant 0,8 ml de tampon,
- ajouter 0,2 ml de complément frais ou reconstitué dans le 1er tube, on obtient 1 ml de solution au 1/5,
- prélever 0,2 ml de la solution au 1/5, ajouter dans le second tube, on obtient 1 ml de solution au 1/25,
- prélever 0,4 ml de la solution au 1/5, ajouter dans le troisième tube, on obtient 1,2 ml de solution au 1/15,
- ajouter 1,2 ml de tampon au 0,4 ml restant de la solution au 1/5, on obtient 1,6 ml de solution au 1/20.

Dilution du complément :

La plaque est tenue de façon verticale.

- partager la plaque en 3 zones en traçant au crayon feutre 2 lignes entre les rangées 4 et 5 et 8 et 9 (fig.1 et photo 3),
- distribuer 50 μ l de tampon dans toutes les cupules sauf celles de la rangée "verticale" H,
- distribuer 50 μ l de complément dans les deux premières rangées "verticales" H et G :
 - au 1/15 dans les cupules G9, G10, G11, G12 et H9, H10, H11, H12,
 - au 1/20 dans les cupules G5, G6, G7, G8 et H5, H6, H7, H8,
 - au 1/25 dans les cupules G1, G2, G3, G4 et H1, H2, H3, H4,
- diluer avec les microdiluteurs de 50 μ l, montés sur le manche, de la rangée G à la rangée A, en passant par les rangées "verticales" intermédiaires" F, E, D.....A.

Ainsi de gauche à droite, dans la zone 1, le complément se trouve réparti à des dilutions multiples du 1/15 (1/30, 1/60....1/1280) sous un volume de 50 μ l, à raison de 4 cupules pour chaque dilution; dans la zone 2, à des dilutions multiples du 1/20 (1/40, 1/80.....1/2560); dans la zone 3, à des dilutions multiples du 1/25 (1/50, 1/100..... 1/3200).

Titration :

- ajouter dans chaque cupule : 25 μ l. de tampon,
25 μ l. d'antigène titré (1/20, voir plus loin),
- recouvrir la plaque d'adhésif auto-collant,
- placer quelques secondes sur le vibreur,
- incuber 1 h. à 37°C. au bain-marie,
- ajouter 25 μ l. de système hémolytique par cupule,
- recouvrir la plaque d'adhésif auto-collant,
- placer quelques secondes sur le vibreur,
- incuber 1h à 37°C au bain-marie,
- lire 2 à 3 h après au miroir de lecture.

Le titre du complément correspond à la dilution maximum dans les 4 cupules où l'hémolyse est totale (ex. : titre au 1/80 : cupules F5, F6, F7, F8; au 1/100 : F9, F10, F11, F12; au 1/60 : cupules F1, F2, F3, F4, etc...).

On utilise, pour la réaction, le complément à 2 unités. Par exemple, si le titre est le 1/80, utiliser le 1/40.

3 - Titration de l'antigène (fig.31)

La plaque est tenue de façon horizontale.

Disposer d'un sérum étalon décomplémenté de titre connu (ex.1/640).

Préparer la dilution 1/5 de ce sérum décomplémenté.

- distribuer 25 μ l. de tampon dans toutes les cupules, sauf celles de la rangée "verticale" 1,
- distribuer 25 μ l. de sérum étalon au 1/5 dans les deux premières rangées "verticales" 1 et 2,
- diluer avec 8 microdiluteurs de 25 μ l, montés sur le manche, de la rangée "verticale" 2 à la rangée 12, en passant par les rangées "verticales" intermédiaires 3, 4, 5.....12.

La rangée verticale 1 contient donc 25 μ l. de sérum étalon à la dilution du 1/5; la rangée 2, 25 μ l. à la dilution du 1/10, etc...; la rangée verticale 12, 25 μ l. à la dilution du 1/10240.

Préparer 8 dilutions d'antigène situées de part et d'autre d'une dilution supposée optimum, ex. : 1/5, 1/10, 1/20.....1/640.

- répartir 25 μ l. par cupule de l'antigène au 1/640 dans la rangée "horizontale" H; 25 μ l. par cupule de l'antigène au 1/320 dans la rangée "horizontale" G, etc... 25 μ l. par cupule de l'antigène au 1/5 dans la rangée horizontale A,
- ajouter le complément à un titre moyen (2U) sous un volume de 50 μ l. par cupule,
- recouvrir la plaque d'adhésif auto-collant,
- placer quelques secondes sur le vibreur,
- incuber 1 h. à 37°C au bain-marie,
- ajouter 25 μ l. de système hémolytique par cupule,
- recouvrir la plaque d'adhésif auto-collant,
- placer quelques secondes sur le vibreur,
- incuber 1 h. à 37°C au bain-marie,
- lire 2 à 3 h. après au miroir de lecture.

Le titre de l'antigène correspond à la plus forte dilution donnant le titre exact du sérum étalon, sans hémolyse dans les premières cupules de la rangée horizontale.

La figure 3 représente un titrage d'antigène réalisé comme ci-dessus, les rangées A et B révèlent un excès d'antigène, les rangées D, E, F, G un manque d'antigène croissant, avec hémolyse dans les premières cupules. Le titre exact correspond à la ligne D, soit à la dilution du 1/20 de l'antigène. L'antigène utilisé à une dilution supérieure dans la réalisation de la réaction entraînerait la formation d'un "faux phénomène de zone" pour les basses dilutions du sérum. La courbe classique a été surimposée sur la figure. L'utilisation de dilutions plus serrées de l'antigène, trop proches du 1/20, n'aurait pas permis la mise en évidence des différentes zones (excès d'antigène, optimum, manque d'antigène).

4 - Exécution de la réaction

Deux solutions sont proposées :

- exécution de la réaction avec un seul témoin sérum (à la dilution du 1/10). Dans ce cas, la recherche des anticorps se poursuit jusqu'à la dilution 1/5120.
- exécution de la réaction avec un témoin sérum pour chaque dilution. Dans ce cas, la recherche des anticorps ne dépasse pas la dilution 1/160 (à moins que l'on accepte de placer des plaques bout à bout).

En effet, en péripneumonie bovine et dans les conditions de récolte des prélèvements en brousse, il arrive souvent qu'un sérum, anticomplémentaire aux basses dilutions (1/10, 1/20), soit positif et non anticomplémentaire aux dilutions supérieures.

a) Exécution de la réaction avec un seul témoin sérum (à la dilution du 1/10) (fig.4) :

- diluer les sérums au 1/5 dans du tampon et décomplémenter cette dilution (30 mn à 58-60°C),
- la plaque est tenue de façon "horizontale" (les sérum étant supposés fortement positifs, 7 sérums + 1 sérum positif de référence sont étudiés par plaque, jusqu'à la dilution du 1/5120, dans le cas contraire, la plaque peut être tenue de façon "verticale" et permet de traiter 11 sérums + 1 sérum positif de référence, jusqu'à la dilution du 1/320),
- distribuer (à l'aide des compte-gouttes en plastique "disposable") pour chaque sérum 25 µl. de la dilution au 1/5 dans la première cupule (ex. : A1), dans la seconde cupule (A2) et dans la dernière (A3) (témoin sérum anticomplémentaire) d'une même rangée "horizontale",
- le second sérum se place en B1, B2, B12, etc...
- ne pas oublier le ou les sérum de référence,
- ajouter 25 µl. de tampon dans chaque cupule, sauf celles de la rangée "verticale" 1,
- diluer avec 8 microdiluteurs de 25 µl., montés sur manche, de la rangée "verticale" 2 à la rangée 11, en passant par les rangées "verticales" intermédiaires 3, 4, 5....11. (il est évident que si la plaque avait été tenue de façon "verticale", 12 microdiluteurs auraient été employés de la rangée "verticale" G à la rangée B, la rangée A contenant les témoins sérum> ,
- ajouter 25 µl. d'antigène titré (1/20) dans toutes les cupules, sauf celles appartenant à la dernière rangée "verticale" 12,
- distribuer 50 µl. de complément au titre choisi (2U) dans toutes les cupules. Cette opération doit être faite en fin de journée ouvrable, le complément non fixé risquant d'être détruit le lendemain matin, malgré la mise à +4°C, s'il a été distribué trop tôt.
- recouvrir la plaque d'adhésif auto-collant,
- placer la plaque quelques secondes sur le vibreur,
- laisser incuber une nuit à +4°C,
- le lendemain matin, ajouter? 25 µl. de système hémolytique par cupule,
- placer quelques secondes la plaque sur le vibreur,

- incuber 30 mn. au bain-marie à 37°C ,
- lire 2 à 3 heures après au miroir de lecture. Bien observer le comportement des témoins sérums au 1/10 (rangée "verticale" 12).

b) Exécution de la réaction avec un témoin sérum pour chaque dilution
(photo 4 et fig.5) :

Bans ce cas, la plaque est tenue obligatoirement de façon "horizontale".

- distribuer (compte-gouttes en plastique "disposable"), pour chaque sérum, 25 µl de la dilution au 1/5 dans les 4 premières cupules (ex. : A1, A2, A3, A4) d'une même rangée "horizontale",
 - le second sérum se place en B1, B2, B3, B4, etc...
 - ne pas oublier le ou les sérums de référence,
 - ajouter 25 µl de tampon dans chaque cupule, sauf celles de la rangée "verticale" 1 et 2,
 - diluer avec 8 microdiluteurs de 25 µl, montés sur manche, de la rangée "verticale" 3 à la rangée "verticale" 11, en passant par les rangées "verticales" intermédiaires 5, 7, 9. Rincer et sécher à la flamme les microdiluteurs, puis effectuer une nouvelle série de dilutions de la rangée "verticale" 4 à la rangée "verticale" 12, en passant par les rangées "verticales" intermédiaires 6, 8, 10,
 - ajouter 25 µl d'antigène au titre choisi (1/20) dans toutes les cupules des rangées "verticales" impaires,
 - ajouter 25 µl de tampon dans toutes les cupules des rangées "verticales" paires,
 - distribuer 50 µl de complément au titre choisi (2U) dans toutes les cupules.
- la suite des manipulations comme ci--dessus (a).

INTERPRETATION DES RESULTATS

L'interprétation des résultats est identique à celle déjà connue de la fixation du complément en tubes, selon la méthode de Kolmer, à savoir : est considéré comme positif tout sérum ++++ au 1/80 et douteux, tout sérum ++++ au 1/40.

CONCLUSIONS
AVANTAGES ET INCONVENIENTS
DE LA METHODE

Les avantages apparaissent évidents : rapidité d'exécution de réactions grâce à la réalisation automatique des dilutions, d'où possibilité de traiter en un temps minimum un nombre de sérums élevé, d'autant plus élevé, que l'on s'attache à quelques dilutions bien déterminées, les plaques pouvant être fractionnées selon la volonté de l'opérateur, Les manipulations sont faciles à réaliser et un technicien ordinaire acquiert très rapidement le "coup de main" que réclame l'emploi du matériel "microtiter" (pipettes, microdiluteurs, etc.,) La standardisation diminue les risques d'erreur. La méthode est sensible et fidèle.

Au chapitre des inconvénients, le coût du matériel ne doit pas être retenu, l'amortissement étant assuré par la multiplicité des usages auxquels il se prête (ex. : en péripneumonie bovine, exécution de la réaction d'hémagglutination indirecte utilisant cm-me antigène les hématies de mouton formolées sensibilisées par le galactane de Mycoplasma mycoides). Par contre, au passif, on doit admettre que ce type de microréaction, qui réclame le confort, le calme et l'équipement général d'un laboratoire, ne peut être pratiqué sur le terrain.

Laboratoire national de l'Elevage
et de Recherches vétérinaires

(I.S.R.A.)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) CAMPBELL, (A.D.), TURNER (A.W.).- Studies on contagious pleuropneumonia of cattle. An improved complement-fixation test.- The Austr.vet.J., 1953, 29 (6) : 154-163.
- (2) CONRATH, (T.B.).- Handbcook of microtiter procedures, Dynatech Corpor., Cambridge, Mass., 1972, 475 p.
- (3) ELLIS (E.M.).- Microtiter serologic techniques for diagnostic bacteriology. Proceedings 77th Annual Meet. of the U.S. Anim. Hlth Ass., 1973 (publié 1974) 77 : 563-581.
- (4) FENSTERBANK (R.).- Com.pers., 1975.
- (5) KARST (O.).- Contagious bovine pleuropneumonia : a plate complement fixation test employed at the Federal Department of Veterinary Research, Vom.- Bull.Epiz.Dis.Afr., 1970, 18 (1) : 5-11.
- (6) PERREAU (P.), PROVOST (A.), REGNOULT (R.), @RUE (J.).- Valeur de la réaction d'hémagglutination indirecte dans la péripneumonie bovine. Rev.Elev.Méd.vét.Pays trop,, 1964, 17 (1) : S-14.
- (7) PROVOST (A.).- Adaptation sur plaques de la réaction de fixation du complément : application à la décentralisation du diagnostic.- Rapport à la IVème Réunion Groupe Experts FAO/OIE/OUA sur la péripneumonie bovine contagieuse, Paris, 15-20, 1971, 14 p.
- (8) PROVOST (A.).- Recherches immunologiques sur la péripneumonie. XIV. Description de deux techniques applicables sur le terrain pour le diagnostic de la maladie.- Rev.Elev.Méd.vét.Pays trop., 1972, 25 (4) : 475-496.
- (9) RENOUX (G.), PLOMMET (M.), PHILIPPON.- Microréactions d'agglutination et de fixation du complément pour le diagnostic des brucelloses.- Ann. Rech.vét., 1971, 2 (2) : 263-269.
- (10) SCUDAMORE (J.M.).- Evaluation of the field CFT in the diagnostic and control of CBPP.- Trop.anim.Hlth & Prod., 1975, 7 (2) : 73-79.

RESUME

Le matériel "Microtiter" est employé à la réalisation d'une microréaction de fixation du complément. Les accessoires, les réactifs, les différents temps de la méthode font l'objet d'une description détaillée.

Cette microtechnique sensible et fidèle, très standardisée, d'exécution rapide et aisée, ne peut être employée que dans le cadre d'un laboratoire normalement équipé et non dans les conditions difficiles du milieu rural.

SUMMARY

Use of "Microtiter" system in complement fixation test in contagious bovine pleuropneumonia.

"Microtiter" system is used in a complement fixation microtechnique. The accessories, the reagents and the various stages of the technical process are described in details. The sensitive and constant microtechnique can be easily performed and allows serial serological diagnosis only in the limits of the activities of a normally equipped laboratory. Application in the field is beyond possibilities.