

VALEUR PRATIQUE COMPARÉE DES
RÉACTIONS D'AGGLUTINATION DE CONGLUTINATION DIRECTE
D'HÉMAGGLUTINATION POLYOSIDIQUE ET PROTÉINIQUE
POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PESTE

par

R. NÉEL, H. TASLIMI et M. EFTEKHARI

(avec la collaboration technique de R. NIKZADEH)*

Baltazard et ses collaborateurs (1), à l'Institut Pasteur de l'Iran, étudiant la « peste sauvage » du Kurdistan, sont arrivés à la conclusion que l'on est en présence d'un foyer de peste pure du mérion, ou l'infection revêt une allure enzootique permanente, la résistance naturelle de ces rongeurs les protégeant contre l'épizootie vraie et la destruction; l'affection peut aussi s'observer sous une forme latente (2).

Cherchant une réaction de haute sensibilité pour la détection des anticorps chez ces mérions résistants, le D^r Baltazard demandait au D^r Rafyi la collaboration de l'Institut Razi.

Ce travail, qui nous a été confié, consistait donc dans la mise au point d'une réaction qui devait répondre aux deux conditions suivantes :

1° être d'exécution facile, eu égard au nombre élevé des prélèvements à expertiser, tout en n'exigeant qu'un faible volume de sérum et tout en n'entraînant qu'une perte minimale de ce dernier au cours des manipulations, le sang ne pouvant être prélevé que par ponction cardiaque et en très petite quantité;

* Rev. d'Immunologie, 18, 1954, 87-106

2° être spécifique et très sensible, en raison des taux vraisemblablement très bas d'anticorps à déceler. On sait, en effet, que dans la peste, le processus phagocytaire joue un rôle capital dans la défense de l'organisme infecté (3). De plus, Margaret Macmahon (4), expérimentant sur le hamster doré, rongeur lui aussi résistant à l'infection pesteuse, a constaté que, chez les nombreux survivants d'un lot inoculé, 33 sur 48, le taux des agglutinines, recherchées sur 20 sérums entre le 26^e et le 29^e jour après l'inoculation, s'échelonnait de 0 à 1/64, 2 sérums seulement étant positifs à ce dernier taux et 4 négatifs.

Nous avons d'abord choisi et comparé entre elles les réactions d'agglutination, de congélation directe et d'hémagglutination polyosidique. Nous avons écarté la réaction de fixation du complément, Mitin signalant que le sérum de certains rongeurs sauvages possède des propriétés anticomplémentaires (5); si, jusqu'à ces derniers temps, la supériorité de cette réaction était loin d'être évidente, comme le faisait remarquer Politzer (6), les récents travaux de Chen, Quan et Meyer en font maintenant une réaction de choix, avec l'emploi de la fraction IA comme antigène (7), malheureusement sa sensibilité n'est pas supérieure à celle de la réaction d'agglutination.

N'étant pas satisfait par les résultats obtenus, l'un de nous et M. Baltazard avons alors pensé à appliquer la réaction d'hémagglutination protéinique, qui s'est révélée infiniment supérieure aux réactions précédemment étudiées (8).

Nos différents essais expérimentaux ont été pratiqués avec :

1° des immunsérums de lapin à faible teneur relative en anticorps, afin de nous rapprocher autant que possible des conditions d'application pratique de la réaction à choisir; les sérums que nous avons préparés agglutinaient à des taux oscillant de 1/30 à 1/400;

2° des sérums de mérions qui avaient résisté à l'infection par piqûres de puces.

Soulignons que la pseudo-tuberculose n'a jamais été signalée chez les rongeurs sauvages en Iran, tant dans la nature que dans les élevages de l'Institut Pasteur de Téhéran.

Nous remercions le Dr Delsal qui a eu l'amabilité de faire les dosages de N total et protéinique nécessités par ces expériences.



LA RÉACTION D'AGGLUTINATION

La réaction d'agglutination dans la peste a suscité un nombre considérable de travaux (9), mais les chercheurs se sont toujours heurtés d'emblée à un gros écueil, la difficulté de réaliser des émulsions homogènes et stables de *Pasteurella pestis*. Récemment encore, pour cette raison, Amies la délaisse au profit de la précipito-réaction (10). Par contre Chen, tout en soulignant que les travailleurs ont été handicapés par cette instabilité, l'emploie couramment (11), mais il ne donne pour ainsi dire aucun détail sur la technique qu'il utilise (7), les suspensions, préparées à partir d'une souche virulente de *P. pestis* cultivée à 37° et produisant plus de 15 milligrammes/p. 100 de fraction IA, sont lavées plusieurs fois et tuées par le formol.

Devignat (12) propose les 3 solutions suivantes : obtention de suspensions homogènes stabilisées au moins pour plusieurs jours, accélération de la réaction de manière à prendre de vitesse l'agglutination spontanée ou combinaison des deux procédés précédents.

A notre avis, pour opérer avec le maximum de sécurité, l'homogénéité et la stabilité des émulsions sont deux conditions nécessaires, bien que non suffisantes. Leur réalisation dépend de nombreux facteurs.

CHOIX DE LA SOUCHE

Burgess (13) a constaté que l'agglutination spontanée de *P. pestis* en eau salée dépendait pour chaque souche de la teneur en chlorure de sodium et que, le plus souvent, celle-ci se produit pour la majorité des souches virulentes quand le taux en sel est de 1,26 p. 100, tandis que pour les souches de faible virulence ou les souches avirulentes, l'optimum est de 0,84 p. 100. D'autre part, Schutze (14), Watz et ses collaborateurs (15) ont constaté que les réactions sérologiques ne permettent pas de distinguer entre elles les diverses souches de bacilles pesteux, qu'elles soient lisses ou rugueuses, virulentes, ou avirulentes.

Nous avons donc recherché parmi les souches locales (16), de virulence variable, celle qui non seulement donnerait des émulsions homogènes et stables en eau physiologique à 0,9 p. 100, mais

encore qui agglutinerait au taux le plus élevé avec les mêmes sérums expérimentaux. Parallèlement, la spécificité était contrôlée avec des sérums de lapins neufs. Après de nombreux essais, c'est la souche P K R 103, fortement virulente, isolée chez un mérion, qui a été retenue.

MILIEU DE CULTURE

Le milieu de culture influe sur la stabilité des émulsions et sur leur valeur antigénique, toutes les autres conditions restant identiques.

Nous avons essayé les 3 milieux suivants :

a) La gélose Uclaf, préconisée par Girard pour le démarrage des cultures du bacille pesteux (17) :

Peptone Uclaf no 17	30 g
Chlorure de sodium	5 g
Bacto-agar	15 g
Eau distillée	1 l

pH 7,4. Stérilisation 20 minutes à 115°

b) La gélose nutritive à l'extrait de viande :

Extrait de viande Lab Lemco	3 g
Bacto-peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Bacto-agar	15 g
Eau distillée	1 l

pH 7,4. Stérilisation 20 minutes à 115°.

c) La gélose C A L, aux « Bacto Casamino-acids » avec dialysat de levure :

Bacto Casamino-acids	27 g
Chlorure de sodium	1,25 g
Dialysat de levure	50 ml
Bacto-agar	15 ou 25 g
Eau distillée	1 l

pH 7,4. Stérilisation 20 minutes à 115°.

Rockenmacher et ses collaborateurs (18) viennent, en effet, de montrer que le meilleur milieu synthétique pour la culture du bacille pesteux est un milieu dans la composition duquel rentrent notamment des acides aminés, en même nombre et dans les mêmes proportions que dans la caséine. Bien que de composition différente

dans le nombre et la teneur en acides aminés, un hydrolysate de caséine préparé suivant la technique de Mueller et Johnson (19) est employé depuis quelques années par Sockhey et ses collaborateurs (20) et a servi de base aux recherches de Yaoi et ses collaborateurs (21) et de Seal (22). Nous avons réalisé pratiquement un tel milieu en ayant recours aux « Bacto-Casamino-acids » et en y incorporant, pour en augmenter la valeur, du dialysat de levure, méthode générale préconisée depuis longtemps par le Comité technique de la société Bactériologistes américains (23) et dont l'action favorisante dans le cas du bacille pesteux vient d'être vérifiée (21).

Le dialysat de levure a été préparé suivant la technique décrite par Wadsworth (24) : 500 grammes de levure de bière (Fleishmann, pur dry 1019) sont dissous dans 800 millilitres d'eau et mis à dialyser dans les tubes de cellophane de 0,089 mm d'épaisseur, plongés dans un récipient contenant 2 litres d'eau, pendant 7 heures à 78°-80° ; conservation longue à + 4° après addition de 0,5 p. 100 de chloroforme. La quantité de chlorure de sodium ajoutée a été calculée pour obtenir une concentration finale de 0,5 p. 100. Etant donné les conditions d'utilisation et l'emploi du dialysat de levure, nous n'avons pas ajouté au milieu de substance réductrice ;

N. B. - Un milieu de composition vraisemblablement très voisine est utilisé par Amies (25) pour la production abondante d'antigène d'enveloppe. De même des essais préalables nous ont montré que, dans les conditions expérimentales identiques, le rendement en N protéinique sur ce milieu était 2,5 fois plus élevé que sur gélose nutritive. D'un autre côté, l'activité hémagglutinante polysidique du liquide surnageant d'une culture de 10 jours sur milieu CAL liquide était bien supérieure à celle du liquide surnageant en eau peptonée Uclaf.

Les émulsions préparées à partir de gélose CAL sont des plus instables, et en 72 heures, tous les germes sont réunis en amas au fond des tubes de conservation. D'énormes agglutinants indissociables se sont formés.

Avec la gélose Uclaf, les émulsions sont stables même après 2 mois de conservation, mais leur valeur antigénique est moyenne et elle baisse si l'on conserve la souche sur ce milieu.

La gélose nutritive à l'extrait de viande nous a fourni les meilleurs résultats : émulsions homogènes et stables, donnant les taux d'agglutination les plus élevés ; si les germes à la longue se déposent au fond du tube de conservation, la réémulsion du culot est immédiate et la suspension homogène.

CONDITIONS DE CULTURE

Les émulsions après culture à 26° étant instables (14), nous avons adopté la température de 37°, qui permet la formation de l'antigène d'enveloppe (14,26).

Nous avons limité la durée du séjour à l'étuve à 37° à 24 heures, la culture étant suffisamment développée dans ce laps de temps, une augmentation de cette durée entraînant une forte mortalité puisque d'après Otten (27), on trouve les 2/3 de bacilles morts dans une culture sur gélose après 3 jours.

PRÉPARATION DES ÉMULSIONS

A la technique de Watz et ses collaborateurs (15), nous avons préféré la classique émulsion pratiquée à l'anse de platine sur la paroi de verre, comme le fait notamment Bhatnagar (26). Cette façon de procéder nous a donné toute satisfaction à la condition de laisser reposer la suspension pendant 24 heures, afin de pouvoir en éliminer, après décantation soigneuse, les quelques amas microbiens impossibles à éviter.

Nous n'avons pas pu expérimenter la technique de Devignat par barbotage d'air en milieu liquide (12).

CONSERVATION DES ÉMULSIONS

C'est un problème délicat qui n'est pas complètement résolu. L'emploi du phénol ne nous semble pas indiqué (28, 14), ce produit devant lyser partiellement les germes. Les émulsions alcooliques sont de valeur inférieure.

La plupart des auteurs (7,9) emploient les formol à des taux variant de 0,05 à 0,25 p. 100, mais les concentrations faibles nous semblent préférables : 0,05 à 0,1 p. 100. Si le formol a l'avantage de protéger contre les contaminations, il entraîne assez rapidement une baisse dans la valeur antigénique des émulsions, qui doivent être utilisées dans les quelques jours qui suivent leur préparation. Nous préférons ajouter le formol avant l'exécution de la réaction.

Nous pensons, avec Bhatnagar (26) et Favarel (29) que ce sont encore les suspensions vivantes, stockées à + 4°, qui se conservent le mieux et qui peuvent être gradées une quinzaine de jours sans modification appréciable de leur sensibilité.

MÉTHODE D'AGGLUTINATION

L'inoculation à 37° pendant 18 à 24 heures ou le séjour à l'éluve à 37° pendant 2 heures, suivi de l'exposition à la température du laboratoire pendant 18 à 24 heures sont les procédés généralement adoptés.

Après des essais comparatifs, nous avons préféré la technique par centrifugation de Gaethgen, appliquée notamment à la morve par Pfeiler (30) et aux salmonelloses par J. Grabar et Bonnefoi (31).

On centrifuge pendant 5 minutes à 3000 tours/minute avec une centrifugeuse de rayon 12 centimètres. La lecture de la réaction est facilitée par l'emploi de tubes de 10-11 millimètres de diamètre, qui permettent une resuspension facile du culot microbien.

Cette méthode a l'avantage de la rapidité, tout en conservant la spécificité et la précision des techniques d'agglutination lente. Les résultats sont superposables, voire supérieurs, à ceux fournis par ces dernières techniques; la lecture en est plus facile. Les agglutinats sont stables, sauf dans les tubes fortement positifs, où les gros agglutinats qui se forment se dissocient, par agitation répétée, en agglutinats plus petits et stables.

TECHNIQUE RÉSUMÉE

La souche de *P. pestis* choisie est repiquée, après vérification de son pouvoir agglutinant, sur gélose nutritive inclinée et conservée pendant 3 à 4 mois, après capuchonnage, à + 4°.

Pour la préparation des émulsions, ensemercer directement et largement les tubes de gélose nutritive nécessaires et les placer à 37° pendant 24 heures.

Émulsionner en eau physiologique à l'anse de platine et placer 24 heures à + 4°. Décanter alors avec précaution le liquide surnageant. Ajuster à 1 milliard de germes par centimètre cube. Vérifier la valeur de la suspension avec un sérum positif de taux connu. Conserver à + 4°. Utiliser dans les 2 semaines qui suivent la préparation et forinoler si l'on veut à 0,1 p. 100 au moment de l'emploi.

Exécuter la réaction en répartissant sous un même volume de 0,5 cm³ le sérum dilué et l'émulsion de bacilles dans des tubes de 10-11 millimètres de diamètre.

Centrifuger à 3000 tours-minute, pendant 5 minutes, avec une centrifugeuse de rayon 12 centimètres.

Lecture par agitation immédiate et notation de ++++ à + suivant le degré de positivité.

VALEUR DE LA RÉACTION

En observant certaines précautions, notamment dans le choix de la souche et celui du milieu de culture, on peut obtenir des émulsions homogènes et stables, mais la conservation limitée des suspensions diminue la portée pratique de la réaction. D'autre part, on n'est pas à l'abri d'une baisse possible dans la valeur antigénique de la souche, d'où nécessité de contrôler chaque fois les émulsions préparées.

La réaction est considérée comme très spécifique, tout au moins chez certaines espèces animales, car ayant eu à tester, pour l'exécution de la réaction de conglutination directe, des sérums de bœuf et de cobaye, nous avons noté l'existence d'agglutinines naturelles au taux de 1/2 pour le sérum inactivé de bœuf et de 1/4 pour le sérum frais de cobaye (1/10 pour A. Berlin (37)).

Son emploi reste cependant limité à quelques indications expérimentales car l'apparition tardive des agglutinines et leur faible n'en font pas une réaction d'utilisation courante en pathologie ou épidémiologie, en dehors de l'éventualité rare d'un diagnostic rétrospectif.

..

LA RÉACTION DE CONGLUTINATION DIRECTE

Le phénomène de la conglutination, découvert par Ehrlich et Sachs, mais dont le mécanisme a été élucidé par Bordet et Gay, a fait l'objet d'études très poussées de la part de Streng.

Cet auteur en a déduit 2 réactions de principe différent et pouvant servir au diagnostic des maladies infectieuses :

1° l'une identique à celle de Bordet et Gengou, dans laquelle le système hémolytique est remplacé par un système conglutinant (32) ou réaction de fixation du complément avec conglutination. Nous l'appellerons, pour la commodité de l'exposé, réaction de conglutination

indirecte ; Hole et Coombs viennent récemment d'attirer à nouveau l'attention sur cette méthode à propos du diagnostic de la morve (33) ;

2° l'autre, plus simple, dans laquelle les germes spécifiques jouent le rôle d'antigène, à l'exclusion des globules rouges (34) ou réaction de congglutination directe (33).

Bier vient enfin d'en écrire une troisième variante, combinaison de l'hémagglutination et de la congglutination (35).

Pour les raisons exposées dans l'introduction, nous n'avons retenu que la réaction de congglutination directe, à laquelle de nombreux travaux ont été consacrés entre 1909 et 1924 et qui parait depuis être tombée dans l'oubli (36, 33).

Or, dans le cas du bacille pesteux, elle n'a fait l'objet, à notre connaissance, que d'un seul mais important travail, celui de A. Berlin, en 1930 (37), qui semble être passé complètement inaperçu (9,36,33,38). La réaction, pratiquée suivant la technique de Streng, sans adoption des modifications proposées par la suite, est d'après Berlin extrêmement sensible, nettement supérieure à l'agglutination et d'un intérêt indiscutables. Elle était donc susceptible de nous rendre de très grands services.

TECHNIQUE

Nous avons suivi la technique de Berlin, mais en accélérant le phénomène par l'emploi de la centrifugation.

Les éléments de la réaction. - Les sérums à tester doivent être inactivés par chauffage à 56° pendant 1/2 heure.

Le complément, sérum frais de cobaye, inutilisable dans la réaction de congglutination indirecte, est facile à se procurer. Il est recueilli et conservé en suivant les mêmes règles et en observant les mêmes précautions que pour les réactions de fixation du complément. Nous l'avons cependant toujours employé frais dans nos expériences.

Les suspensions microbiennes sont celles qui nous sont servi pour la réaction d'agglutination. Nous avons préféré recourir à des émulsions vivantes et fraîchement préparées, bien que d'après Brocq-Roussen et Roussel, les microbes tués par la chaleur ou le formol puissent aussi être utilisés (38).

La congglutinine est introduite sous forme de sérum de bœuf. Les prélèvements sont faits chez des animaux adultes et sains. Après inactivation, elle est conservée par congélation à - 20° (33).

N. B. - La présence de citrate de soude ou de quelques sels neutres entrave la réaction d'après Streng et Ryti (39).

Titrages préalables. - Une congulutatin naturelle des bacilles pesteux se produit quand on met en présence de faibles dilutions de sérum frais de cobaye et de sérum inactivé de bœuf; elle entraîne donc, tout au moins théoriquement, la recherche de son taux limite pour le calcul des quantités de ces éléments à introduire dans la réaction. Cette opération n'est pas indispensable car les doses optima de complément et de congulutinine sont très inférieures aux doses qui provoquent la réaction naturelle.

Par contre, il est nécessaire de déterminer avec exactitude, en présence d'un sérum positif, les doses optima de complément et de congulutinine qui doivent être introduites dans la réaction, suivant la méthode des dilutions décroissantes. En accord avec Berlin, la concentration finale oscille, pour le complément entre 1/50 et 1/200 et pour la congulutinine entre 1/20 et 1/100.

Réaction proprement dite. - Le tableau 1 donne le schéma d'exécution de la réaction.

Les divers éléments seront introduits dans l'ordre indiqué (Streng). L'émulsion de bacilles pesteux sera ajustée de façon à obtenir une concentration finale de 500 millions de germes environ. Dans l'exemple donné, les doses optima de complément et de congulutinine ont été après titrage trouvées respectivement égales à 1/200 et 1/50. Prendre des tubes de 10 à 11 millimètres de diamètre.

TABLEAU 1

Réaction de congulation directe

Éléments de la réaction	Ré- action	Té- moin
Sérum à tester, inactivé, à dilutions croissantes	0,5	
Eau physiologique		0,5
Sérum frais de cobaye, dilué au 1/20 (complément)	0,1	0,1
Émulsion de P. pestis	0,3	0,3
Sérum de bœuf, inactivé et dilué au 1/5 (congulutinine)	0,1	0,1

Placer pendant 3/4 d'heure au bain-marie à 37°.

Centrifuger pendant 5 minutes à 3000 t/m dans une centrifugeuse de 12 centimètres de rayon.

Lecture par agitation et notation identiques à celles de la réaction d'agglutination.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus avec des sérums expérimentaux de lapin (L) et de mériion (M) sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II

Valeur comparée des réactions de congglutination et d'agglutination

Sérums	Congglutination directe				
	1/5	1/10	1/25	1/50	1/100
M 1.	++++	+++	+++	++	
M 2.	++++	+++	+		
M 3.	+++	++++	+++	++	
	1/200	1/300	1/400	1/500	1/600
L 1.	++++	+++	+++	++	+
	Agglutination				
	1/5	1/10	1/25	1/50	1/100
M 1.	++++	+++	++		
M 2.	+				
M 3.	+++	++	+		
	1/200	1/300	1/400	1/500	1/600
L 1.	+++	++			

En général, les taux de positivité de la congglutination sont 2 à 3 fois supérieurs à ceux de l'agglutination.

Signalons que Berlin a observé une réaction de congglutination positive au 1/2 560, alors que la réaction d'agglutination était négative et qu'il a obtenu des taux jusqu'à 20 fois supérieurs à l'agglutination avec la congglutination directe. Nous n'avons pas constaté de résultats de cet ordre de grandeur.

VALEUR DE LA RÉACTION

Les réactions d'agglutination et de congglutination directe ne fournissent pas de résultats superposables, puisque le principe en est

différent, recherche d'un côté des agglutinines et de l'autre des sensibilisatrices, mais les objections concernant la préparation et la valeur de l'antigène sont identiques puisqu'on utilise, dans les 2 cas, les mêmes suspensions bacillaires.

La réaction de congglutination est d'exécution plus délicate et plus longue.

L'existence d'une congglutination naturelle avec le sérum de cobaye n'a pas été retrouvée avec les sérums de lapin et de mériion, mais le nombre des animaux testés a été faible (10).

Bien que la réaction de congglutination directe semble avoir une réelle valeur, nous n'avons pas poussé plus avant ces recherches en raison de la mise au point de la réaction d'hémagglutination protéinique qui nous donne de meilleurs résultats.



LA RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION POLYOSIDIQUE

La réaction d'hémagglutination de Keogh, sensibilisation des hématies par des antigènes bactériens de nature polyosidique et agglutination par les immunsérums correspondants, a été d'emblée étendue à de nombreuses espèces microbiennes par les promoteurs de la méthode: Keogh, North et Warburton (40). En plus de son application pratique au sérodiagnostic de la tuberculose par Middlebrook et Dubos (41), la réaction est susceptible d'être employée pour le diagnostic des salmonelloses (42), des brucelloses (43) et de la tularémie (44).

Amies a essayé la réaction dans la peste en employant pour la sensibilisation des globules, l'antigène d'enveloppe purifié qu'il prépare par sa méthode au thyocyanate (10); il conclut (45) qu'elle est de lecture facile, mais de réalisation plus longue que celle de précipitation, mais qu'elle peut, néanmoins, être utilisée pour confirmer rétrospectivement un diagnostic de peste. Chen (11), se servant comme substance sensibilisante du liquide surnageant d'une culture de bacille pesteux, âgée de 10 jours, sur milieu liquide (« hormone broth »), obtient des résultats qui sont dans l'ensemble inférieurs à ceux de l'agglutination et de la déviation du complément, tout au moins pour les sérums expérimentaux de lapin. Il échoue avec la fraction IA (46), bien que celle-ci présente une réaction de Molich fortement positive.

Nous avons essayé cette méthode, malgré le peu d'avantage qu'elle semblait offrir d'après les travaux précédents.

TECHNIQUE

Nous avons suivi la technique du séro-diagnostic de la tuberculose, d'après l'étude critique de Gernez-Rieux et Taquet (47), mais en remplaçant après essais préalables le séjour à l'étuve à 37°, puis à la température du laboratoire par la centrifugation, comme pour l'agglutination. Elle doit être modérée, 800 tours/minute environ, pour éviter des tubes témoins ou négatifs partiellement positifs. Entre temps, nous avons vu que ce procédé a été utilisé avec succès dans l'hémagglutination de la tuberculose par Suchet (48), mais avec une force centrifuge que nous estimons trop forte.

Hématies : après prélèvement, les hématies de mouton sont conservées en solution d'Alsever modifiée (8).

Solution sensibilisante : culture de bacilles pesteux (PKR 103) à 37°, pendant 10 jours en milieu C A L liquide (voir réaction d'agglutination). Centrifuger à fond. Amener à pH 7,2, et employer immédiatement ou conserver à + 4° après destruction des germes qui restent par chauffage à 56° pendant 1/2 heure.

Immunsérums : inactivation et saturation avec des hématies de mouton : ajouter à un volume de sérum dilué au 1/10 un volume d'hématies et laisser en contact 1/2 heure à la température du laboratoire. Centrifuger et recommencer si la saturation n'est pas complète.

Préparation des hématies : séparation du liquide conservateur et triple lavage en eau physiologique. Garder en culot après le 3^e lavage.

Sensibilisation : faire une suspension à 0,5 p. 100 dans la solution sensibilisante et laisser en contact 1 heure 1/2 au bain-marie à 37° en agitant tous les quarts d'heure. Laver 3 fois à l'eau physiologique (centrifugation 1500 tours-minute pendant 3 minutes) et remettre en suspension sous le volume initial en eau physiologique.

Réaction : répartir immunsérums et suspension globulaire à raison de 0,5 cm par tube, de diamètre 10-11 millimètres :

- témoin sérum + hématies normales ;
- témoin eau physiologique + hématies sensibilisées.

Placer 10 minutes au bain-marie à 37°.

Centrifuger 5 minutes à 800 tours-minute.

Lecture immédiate par agitation des tubes. Notation de ++++ à + suivant la grosseur des agglutinats et l'aspect du liquide de suspension.

SOLUTIONS SENSIBILISANTES

Nous avons essayé dans la sensibilisation des hématies les préparations suivantes :

a) la partie surnageante d'une suspension concentrée de bacilles pesteux du type vaccinal tués, suivant le procédé employé par Le Minor et collaborateurs pour les Salmonella et les Escherichia (42). L'émulsion était stérilisée, non par chauffage pendant 1/4 d'heure (49), mais par chauffage pendant 1/2 heure à 56°, tous les germes n'étant pas tués dans le délai de 1/4 d'heure (50);

b) le lysat, par congélation à -20° et décongélation à + 37° successives (5 fois), méthode déjà appliquée à P. pestis par Girard en vue d'apprécier le pouvoir toxique des souches (51);

c) le précipité redissout d'un lysat sodique traité par l'acide trichloracétique;

Les cultures de 48 heures à 37° sur milieu C A L gélosé sont récoltées et lavées à l'eau physiologique. Le culot microbien, remis en eau physiologique, est soumis à l'action de la soude, sous agitation, pendant 2 heures à 37° à pH 9,0 (Beckmann). En raison de la baisse importante du pH au cours de l'opération, il est nécessaire de le rajuster plusieurs fois. Après centrifugation, la partie surnageante est précipitée par l'acide trichloracétique à pH 4,0. Le précipité, recueilli par centrifugation, est redissous en solution salée tamponnée à pH 7,2, de façon à titrer 50 milligrammes par millilitre de N protéinique. La réaction de Molisch est faiblement positive. La partie surnageante n'a aucune action hémagglutinante.

d) le liquide surnageant d'une culture de 10 jours à 37° de bacilles pesteux en milieu liquide selon le procédé de Chen (11) (voir plus haut, technique);

e) une solution en eau physiologique, titrée à 50 milligrammes par millilitre de N de fraction IA.

Le tableau III résume les résultats obtenus au cours de nos différents essais.

TABLEAU III

Valeur comparative des préparations sensibilisantes essayées

Substance sensibilisante	1/25	1/50	1/100	1/200	1/300	1/400
Surnageant de type vaccinal tué	3	3	1			
Lysat congélation-décongélation	4	3	2			
Lysat soude-ac. trichloracétique	3	4	3	2		
Surnageant milieu CAL liquide	4	4	3	2	1	
Solution de fraction IA.						
Agglutination	3	4	4	3	2	1
4, 3, 2, 1 : indiquent l'intensité de la Réaction : respectivement ++++, +++, ++, +.						

Le procédé le meilleur et le plus simple est celui de Chen, mais malgré tout, la réaction reste inférieure à celle d'agglutination. Nous avons utilisé un milieu à base d'hydrolysate de caséine ; c'est à partir d'un milieu similaire que SEAL (54) a isolé sa fraction polysaccharidique d'enveloppe de *P. pestis*. Notons, en accord avec Chen, que la fraction IA, malgré une réaction de Molisch fortement positive, n'a aucune activité.

VALEUR DE LA RÉACTION

Si, avec une bonne substance sensibilisante, on obtient des résultats encourageants, quoique inférieurs à ceux fournis par l'agglutination, il faut tenir compte des inconvénients suivants :

a) la préparation des hématies est une opération relativement longue et délicate. Il arrive, en effet, que malgré les précautions prises, il y ait hémolyse partielle des hématies. La réémulsion homogène des hématies au cours des lavages est parfois difficile ;

b) malgré la saturation des sérums, les sérums normaux peuvent donner des réactions positives jusqu'au 1/20, exceptionnellement 1/40 ;

c) la lecture en est quelquefois malaisée et les réactions positives faibles sont parfois difficiles à apprécier, les témoins pouvant être douteux.

La spécificité réelle de la réaction mérite aussi d'être discutée ;

elle semble n'être qu'une réaction de para-immunité. Le rôle des polysaccharides dans l'immunisation antipesteuse n'est pas encore parfaitement précisé; parmi les fractions purifiées, immunisantes et antigéniques isolées à partir de *P. pestis*, les unes renferment encore des polysaccharides: fraction IA (46), antigène d'Amies (10), les autres n'en renferment pas, fraction IB. SEAL admet que le polysaccharide est lié à la présence de la protéine spécifique qu'il considère comme le support de l'immunité des souches virulentes ou avirulentes protectrices (52). Il serait des plus intéressant de rechercher l'activité hémagglutinante du polyoside isolé par SEAL.

Étant donné que le support responsable de l'immunité antipesteuse est de nature protéinique, c'est dans ce sens que nous avons orienté nos recherches.

*
* *

LA RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION PROTÉINIQUE

Boyden, grâce à un tannage préalable des hématies, est parvenu à fixer sur celles-ci des antigènes de nature protéinique et à les rendre agglutinables par les antisérums correspondants (53). Il a décrit une nouvelle méthode de sérodiagnostic de la tuberculose (53), plus sensible que la classique réaction de Middlebrook et Dubos (41), basée, on le sait, sur l'adsorption de substances de nature polyosidique par des hématies normales. Grabar, Boyden et leurs collaborateurs (54) ont fait l'étude comparée de ces 2 réactions dans la tuberculose. Entre temps, Lévy et Corbeel (55) ont appliqué cette technique au titrage des anticorps anti-ACTH.

Or, tous les travaux modernes ont montré que les fractions purifiées, antigéniques et immunisantes de *P. pestis* sont des protéines, parfois associées à des polysaccharides, selon le procédé adopté pour l'extraction et la purification (46,10,52). Comme le Pr. K. Meyer, lors de sa venue à Téhéran, avait bien voulu laisser à l'Institut Pasteur un lot important d'un antigène pesteux purifié, fraction IA (46), l'un de nous et M. Baltazard ont essayé cette nouvelle technique et mis au point une réaction d'hémagglutination protéinique dans la peste (8).

TECHNIQUE DE LA RÉACTION

La technique, dérivée de celle de Boyden, présente 2 modifications importantes: la suppression de la saturation des sérums, par

uite de l'action inhibitrice du tannage et de la sensibilisation sur l'agglutination naturelle des hématies de mouton et la lecture par formation d'agglutinats, au lieu de celle du type virus (53,56), par suite de l'emploi d'un antigène purifié et de l'introduction de la centrifugation comme mode d'agglutination.

Tous les détails concernant l'exécution de la réaction et son mode de lecture ont été exposés dans un autre mémoire (8).

RÉSULTATS

Les résultats obtenus avec des sérums expérimentaux de lapin ou L (inoculation à la seringue) et de mérion ou M (piqûre de puces infectées) sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Valeur comparée des réactions d'hémagglutination protéinique et d'agglutination

Sérums	Hémagglutination protéinique				
	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
L 1.	++++	++++	+++	++	+
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/300
M 1.	++++	+++	++		
M 2.	++++	++++	+++	++	+
M 3.	+++	++			
Sérum	Agglutination				

Les titres obtenus par hémagglutination protéinique sont donc au moins 5 fois supérieurs à ceux fournis par l'agglutination.

La réaction paraît très spécifique : jusqu'à présent 70 sérums divers ont été testés (homme : 2 ; lapin : 8 ; cobaye : 2, et mérion : 68) et ont toujours donné des résultats négatifs aux dilutions de 1/2 à 1/5, imposées par les difficultés du prélèvement dans certains cas (mérions).

La réaction est précoce et sensible : chez un lapin n'ayant reçu qu'une seule injection intraveineuse de 250 millions de germes, souche vaccinale EV, l'évolution de la réaction est schématisée dans le tableau V.

Avec un deuxième lapin, inoculé dans les mêmes conditions, la réaction a débuté le 4^e jour au taux de 1/8 et la positivité maximum a été de 1/3200 le 15^e jour.

De tel résultats ne s'observent pas dans les mêmes conditions expérimentales avec les autres types de réaction. L'obtention de sérums riches en anticorps a fait l'objet de nombreux travaux (9) et ce n'est qu'avec des sérums d'animaux hyperimmunisés que l'on atteint ou dépasse cet ordre de grandeur.

Mais, comme nous le rappelait le Dr G. Girard, les agglutinines ne se voient à un titre appréciable que si le bacille pesteux est passé dans le sang. Chez un lapin ayant reçu la même dose de germes que dans l'expérience précédente (250 millions, souche vaccinale EV), mais cette fois-ci par voie sous-cutanée ; l'évolution de la réaction est schématisée dans le tableau VI.

TABLEAU V

Évolution de la réaction à la suite d'une seule injection intraveineuse à un lapin (250 millions de germes, souche EV)

Sérum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$
1 ^{er} jour												
3 ^e jour	2	1										
5 ^e jour	4	3	2	1								
8 ^e jour	nf	nf	3	4	4	4	2	1				
12 ^e jour	nf	nf	nf	nf	3	4	4	4	3	2	1	
15 ^e jour	nf	nf	nf	nf	3	4	4	4	4	3	2	1
24 ^e jour	nf	nf	nf	nf	3	4	4	4	4	3	1	
30 ^e jour	nf	nf	nf	nf	4	4	4	4	2	1		
40 ^e jour	nf	nf	nf	nf	4	4	3	2	1			
50 ^e jour	nf	nf	nf	nf	4	3	2	1				
60 ^e jour	nf	nf	nf	4	3	2	1					

nf : non fait, 4, 3, 2, 1 : indiquent l'intensité de la Réaction : respectivement + + + +, + + +, + +, +.

TABLEAU VI

Évolution de la réaction à la suite d'une seule injection sous-cutanée à un lapin (250 millions de germes, souche EV)

Sérum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$
1 ^{er} jour								
4 ^e jour								
6 ^e jour	4	3	2	1				
8 ^e jour	nf	nf	nf	4	3	2	1	
12 ^e jour	nf	nf	nf	4	3	2	2	1
15 ^e jour	nf	nf	nf	4	3	2	1	

nf : non fait, 4, 3, 2, 1 : indiquent l'intensité de la Réaction : respectivement + + + +, + + +, + +, +.

Chez un deuxième animal, les hémagglutinines sont apparues le 6^e jour au taux de 1/4, au 8^e jour elles s'élevaient à 1/100, malheureusement l'animal est mort peu après.

On voit donc que, par voie sous-cutanée, le délai d'apparition des anticorps est légèrement retardé et que le taux maximum est inférieur à celui obtenu par voie intraveineuse. Malgré cela, les taux obtenus sont néanmoins très élevés.

Des expériences sont en cours pour rechercher toutes les indications pratiques de la réaction et paraîtront par la suite.

VALEUR DE LA RÉACTION

Les diverses réactions sérologiques utilisées jusqu'à présent dans la peste ne donnent pas des résultats supérieurs en ordre de grandeur à ceux de la réaction d'agglutination, d'où la supériorité de l'hémagglutination protéinique.

Faisant appel au même antigène que la nouvelle méthode de fixation du complément de Chen et collaborateurs (7), elle présente les mêmes avantages, notamment spécificité et régularité dans les résultats, et comporte les mêmes indications. Mais sa plus grande sensibilité en fait une réaction qui est susceptible d'être appliquée également aux tests de clinique, d'épidémiologie et d'épizootologie.

Elle est enfin d'exécution facile, quoiqu'un peu longue, les incidents techniques étant exceptionnels. De plus, les hématies sensibilisées ne sont plus sensibles à l'hémolyse, à l'agglutination et à la congélation naturelles, comme nous l'avons montré dans une autre note (57), ce qui contribue à renforcer la spécificité de la réaction.

*
**

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

La valeur pratique des 4 réactions que nous venons de mettre en valeur par le tableau VII, qui est le résultat de l'expérience expérimentale de lapin, les titres obtenus



TABLEAU VII
Valeur comparative respective des réactions étudiées

Réaction	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$
Agglutination	4	3	1			
Conglutination directe	4	4	2	1		
Hémagglutination polyosidique	4	2				
Hémagglutination protéinique	4	4	4	3	2	1
4, 3, 2, 1: indiquent l'intensité de la Réaction: respectivement + + + +, + + +, + +, +.						

1° L'agglutination, malgré l'emploi d'émulsions homogènes et stables, mais de conservation limitée, est, on le sait, une réaction de faible sensibilité, ce qui limite pratiquement son emploi.

2° La conglutination directe est susceptible des mêmes critiques quant à l'antigène qui est identique; si sa sensibilité est plus grande, elle est d'exécution plus longue et plus délicate et de nouvelles recherches sont nécessaires pour en confirmer la valeur.

3° L'hémagglutination polyosidique est nettement inférieure aux réactions précédentes; elle ne présente actuellement qu'un intérêt expérimental et n'est pas d'ailleurs une véritable réaction d'immunité.

4° L'hémagglutination protéinique est à la fois la plus sensible et la plus précoce des réactions sérologiques de la peste. D'exécution facile, l'emploi d'un antigène purifié en assure la spécificité, la sensibilité et en fait toujours une réaction comparable à elle-même. Sa sensibilité est renforcée par l'emploi de la centrifugation.

De ce fait, elle semble applicable à tous les tests de laboratoire et également aux tests cliniques, épidémiologiques et épizootologiques.

Rappelons qu'au cours des opérations de tannage et de sensibilisation, les hématies perdent leur aptitude à l'hémolyse, à l'agglutination et à la conglutination naturelles, ce qui contribue à en assurer la spécificité.

(*Institut d'État des sérums et vaccins d'Hessareck. Institut Razi et Institut Pasteur de l'Iran.*)

BIBLIOGRAPHIE

1. Baltazard (M.), Bahmanyar (M.), Mofidi (Ch.) et Seydian (B.).- Bull. Org. mond. Santé, 1952 (5) 441.
2. Baltazard (M.), et Mofidi (Ch.). - C. R. Acad. Sci., 1950 (231) 731.
3. Meyer (K.F.). - Immunol., 1950 (64) 139.
4. McMahon (Margaret). - Publ. Health Rep., 1944 (59) 234.
5. Mitin (S.) - Rev. Microbiol. Saratov., 1937 (16) 40.
6. Pollitzer (R.). - Bull. Org. mond. Santé 1952 (5) 127.
7. Chen (T.), Quan (S.) et Meyer (K. F.). - J. Immunol., 1953 (68) 147.
8. Néel (R.) et Baltazard (M.). - Ann. Inst. Pasteur, 1954 (86)
9. Wu Lien-Teh, Chun (J.), Pollitzer (R.) et Yu (C.). - Plague. A manual for medical and public health workers, 1936 et Pollitzer (R.). - Loc. cit., n° 6.
10. Amies (C.). - Brit. J. exp. Path., 1951 (32) 259.
11. Chen (T.). - J. Immunol., 1952 (69).
12. Devignat (R.). - Rev. Immunol. Théor. antim., 1951 (15) 173.
13. Burgess (A.). - J. Hyg., 1930 (30) 165.
14. Schutze (H.). - Brit. J. exp. Path., 1939 (20) 235 .
15. Watz (R.), Wagle (P.) et Puduval (T.). - Ind. J. med. Res., 1939 (27) 373.
16. Baltazard (M.) et Aslani (P.). - Ann. Inst. Pasteur, 1952 (83) 241.
17. Girard (G.). - Bull. Soc. Path. Exot. 1944 (37) 328.
18. Rockenmacher (M.), James (H.) et Elberg (S.). - J. Bact., 1952 (63) 785.
19. Mueller (J.) et Johnson (E.). - J. Immunol., 1941 (40) 33.
20. Sokhey (S.), Habbu (M.) et Bharucha (K.). - Bull. Org. mond. Santé, 1950 (3) 25.
21. Yaol (H.), Yoshino (K.) et Ikegami (M.) - Analysé dans le Bull. Inst. Pasteur, 1953 (51) 288. Japan med. J., 1950 (3) 11.
22. Seal (S.) - J. Immunol., 1951 (67) 93 et Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951 (77) 675.
23. Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria. - Leaflet 11, 10^e éd.
24. Wadsworth (A.) - Standard Methods of the division of laboratories and Research of the New York State department of Health. 3^e éd., 1947.
25. South African Institute for Medical Research. - Annual Report for the Year ended 3¹st December 1951. Plague, 27.
26. Bhatnagar (S.). - Ind. J. Med. Res., 1940 (28) 17.
27. Otten (L.). - Ind. J. Med. Res., 1936 (24) 17.
28. Greval (S.) et Dalal (N.). - Ind. J. Med. Res., 1933 (21) 283.
29. Favarel (R.). - Bull. Soc. Path. Exot., 1949 (42) 335.
30. Peeiler. - Analysé dans le Bull. Inst. Pasteur, 1909 (7) 235. Arch. f;

Wiss. u. prakt. Tierheilk, (34).

31. Grabar (J.) et Bonnefoi (A.). - Ann. Inst. Pasteur, 1946 (72) 745.
 32. Streng (O.) - Finska Laksallsk. Handl., 1910 (52) 95 et Beitr. path. Anat., 1911 (51) 279.
 33. Hole (N.) et Coombs (R.) - J. Hyg., 1947 (45) 480 490 et 497.
 34. Streng (O.) - Zbl. Bakt. I. Orig. 1910 (50) 47.
 35. Bier (O.) - Ann. Inst. Pasteur, 1951 (81) 650.
 36. Bordet (J.) - Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. 2^e éd., Paris 1939.
 37. Berlin (A.) - Rev. Microb. Saratov., 1930 (9) 10.
 38. Brocq-Rousseu (D.) et Roussel (G.). - Le sérum normal. Propriétés physiologiques Paris, 1939.
 39. Streng (O.) et Ryli (E.) - Analysé dans : Brocq-Rousseu (D.) et Roussel (G.), Loc. cit., n° 38. Acta Soc. Med. Fennic. Duod., 1923.
 40. Keogh (E.), North (E.) et Warburton (M.) - Nature, 1947 (160) 63 et 1948 (161) 687.
 41. Middlebrook (G.) et Dubos (R.) - J. exp. Med., 1948 (88) 521.
 42. Le Minor (L. et S.) et Grabar (J.). - Ann. Inst. Pasteur, 1953 (83) 62.
 43. Carrère (L.) et Roux (J.) - Ann. Inst. Pasteur, 1952 (83) 80.
 44. Alexander (M.), Wright (G.) et Baldwin (A.) - J. exp. Med., 1950 (91) 561.
 45. South African Institute For Medical Research. - Annual Report for the Year ended 31st December 1950. Plague, 27.
 46. Baker (E.), Sommer (H.), Foster (L.), Meyer (E.) et Meyer (K. F.) - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1947 (64) 139 et J. Immunol., 1952 (66) 131.
 47. Gernez-Rieux (Ch.) et Taquet (A.) - Ann. Inst. Pasteur Lille, 1950 (3) 1 et 1951 (4) 17.
 48. Suchet (A.) - Ann. Biol. Clin., 1952 (10) 412.
 49. Sokhey (S.) et Maurice (H.) - Bull. Off. Inst. Hyg. Publ., 1937 (29) 505.
 50. Girard (G.), Néel (R.) et Chevalier (A.) - Ann. Inst. Pasteur, 1946 (72) 862.
 51. Girard (G.) - Ann. Inst. Pasteur, 1941 (67) 365
 52. Seal (S.) - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951 (77) 675 et J. Immunol., 1951 (67) 93.
 53. Boyden (S.) - J. exp. Med., 1951 (93) 107.
 54. Grabar (P.), Boyden (S.), Taquet (A.) et Borduas (A.) - C. R. Acad. Sci., 1952 (234) 899.
 55. Lévy (F.) et Corebeel (L.) - C. R. Soc. Biol., 1952 (146) 412.
 56. Borduas (A.) et Grabar (P.) - Ann. Inst. Pasteur, 1953 (84) 903.
 57. Néel (R.) et Taslimi (H.) - Ann. Biol. Clin. 1954 (12) 98.
-

STATISTIQUES

A. LIVRAISON DES VACCINS & SERUMS

Produits	1954-55 (1333)
A) <i>Vaccins à usage vétérinaire (doses)</i>	
Anticharbonneux	14.375.260
Charbon-Claveleux (D. C. C.)	1.577.650
Anticlaveleux adsorbé sur gel d'alumine	709.700
Antisymptomatique	969.150
Antipasteurellique	512.150
Anticharbonneux-Tétanique	24.000
Antientérotoxémie	1.319.100
Antipestique	27.800
Antivariole aviaire	177.700
Antinewcastle	802.550
Antibrucellique	2.120
Antisalmonellique	15.000
Antipleuro-pneumonie de chèvre	1.220
Anatoxine tétanique (vétérinaire)	100
Antigène brucellique (ml)	1.830
Antigène pullorum	1.700
Antigène salmonellique	770
B) <i>Sérums à usage vétérinaire (ml)</i>	
Sérum normal	19.000
C) <i>Anatoxines, sérums & vaccins humains (Doses)</i>	
Anatoxine diphtérique adsorbée sur phosphate d'alumine	476.738
Anatoxine tétanique simple	7.015
Vaccin mixte antidiphtérique et antitétanique (A. P. T.)	294.633
Vaccin anticoquelucheux	14.588
Sérum antidiphtérique purifié et concentré (Amp. de 10000 à 40000 U. A.)	77.328
Sérum antitétanique purifié et concentré (Amp. de 3000 à 10000 U. A.)	21.590
Sérum anticharbonneux (Amp.)	3.570
D) <i>Produits biologiques divers (ml)</i>	
Tuberculine	1.315
Malléine	15
Réactif de Schick	550
Zothelon (Ampoules)	2.500

B. RENSEIGNEMENTS DIVERS

TABLEAU I

Élevage des petits animaux d'expérience

	1954-55 1333	
	Effectif moyen	Consom- mation
Cobayes	1.795	1.631
Lapins	320	270
Souris blanches	1.189	2.790
Rats	745	504

TABLEAU II

Activité résumée des services

	1954-55 1333	
	Nombre	Litres
Analyses et dosages	1.096	
Milieus de culture		17.432
Colorants		25
Réactifs & préparations diverses . . .		10.386
Préparations médicamenteuses . . .		80
Cultures microbiennes	28.888	
Inoculations	3.614	
Autopsies	1.072	
Diagnostics cliniques	837	