

## Recherches immunologiques sur la péripneumonie

### X. Proposition d'une nouvelle technique sérologique pour le diagnostic expérimental de la maladie : le test de quatre tubes

par A. PROVOST et R. QUEVAL (\*)

I. E. M. V. T., Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, Fort-Lamy, Tchad

#### RÉSUMÉ

Après avoir indiqué les raisons qui les ont conduits à suspecter certaines défaillances de la réaction de fixation du complément dans le diagnostic de la péripneumonie bovine, les auteurs décrivent sous le nom de « test des 4 tubes » une technique de diagnostic sérologique de la maladie qui allie pour un même sérum sur un même portoir : une fixation directe du complément, une fixation « indirecte », la recherche de l'antigène péripneumonique circulant et un contrôle du sérum. Les modalités techniques et l'interprétation sont décrites en détail ; des exemples sont donnés.

En matière de diagnostic expérimental de la péripneumonie, c'est un lieu commun que d'affirmer l'utilité des réactions de fixation du complément. A plusieurs reprises, le groupe d'experts FAO/OIE/OUA sur la péripneumonie a insisté sur ce point dans ses rapports de travail (2), tout en estimant cependant que les techniques employées avaient des limites et étaient perfectibles.

Il est hors de propos de discuter en détail dans ces lignes les mérites respectifs des différentes méthodes proposées. Reposant sur les mêmes principes et ne mettant en œuvre que des variantes de manipulations, elles fournissent les mêmes résultats et ne diffèrent que par leur sensibilité et, partant, leur spécificité. Sans trop simplifier, on peut estimer que les limites assignées à ces tests sérologiques se rencontrent chez des bovins en incubation de péripneumonie

n'ayant pas encore élaboré d'anticorps fixant le complément et pour lesquels ils ne sont pas encore décelables, ainsi que pour de rares animaux en période terminale préagonique chez lesquels le torrent circulatoire est envahi par un (ou des) antigène(s) mycoplasmaïque(s) saturant *in vivo* certains anticorps (29).

On pourrait, certes aussi, faire état de la spécificité des divers tests : la réaction dite « de FARCHA » (1) se montre beaucoup plus sensible que la réaction classique de CAMPBELL et TURNER (5) : cette dernière est néanmoins préférée pour le diagnostic de routine, justement parce qu'étant moins sensible elle ne donne pas lieu à des interprétations dues à des seuils de lecture (1).

Fort de ces données, le laboratoire de FARCHA a utilisé depuis plus de 10 ans la réaction de fixation du complément pour obtenir confirmation du diagnostic clinique de péripneumonie, effectuer le tri des malades dans un effectif contaminé, assurer le contrôle sanitaire de

(\*) Aide technique de Messieurs Henry CORNÉLIE et Noël GOMBOT.

bovins destinés à l'importation. Enseignée à d'autres stations de recherches existant dans l'orbite de ce laboratoire, tout spécialement celle de Bouar (R. C. A.) autour de laquelle existe un important foyer de péripneumonie, la réaction de fixation du complément — et plus précisément la technique de CAMPBELL et TURNER — y a été largement mise en œuvre.

## I. — RECONNAISSANCE D'ÉCHECS

Un certain confort intellectuel s'était installé depuis plusieurs années. La réaction était entrée dans la pratique courante qui, tout spécialement au Tchad, consistait en la confirmation du diagnostic clinique de péripneumonie posé sur un effectif.

Néanmoins, dans le courant de l'année 1965, quelques échos alarmants naissaient en R. C. A. Dans une station d'élevage où évoluait un foyer de péripneumonie, des bovins mouraient de la maladie dans les jours suivants un examen sérologique négatif. La mise en place d'un plan de prophylaxie sanitaire dans la région de Bouar apportait des compléments d'information : l'abattage des troupeaux contaminés était depuis 1964 matériellement encouragé en mettant à la disposition des éleveurs les moyens nécessaires à l'écoulement de leurs animaux (transport, commercialisation des viandes) ; des examens sérologiques de routine étaient effectués par la réaction de CAMPBELL et TURNER.

On eut d'abord la surprise, puis la stupeur, de constater que des sérums provenant de bovins dont les viscères étaient saisis pour péripneumonie se révélaient négatifs en fixation du complément. Aucune erreur de manipulation ne pouvant être invoquée, on s'était alors demandé si ces échecs du diagnostic expérimental ne pouvaient être portés au passif de la pratique dans laquelle seule la dilution au 1 : 10 de sérum était examinée ; en certaines occasions, on aurait pu avoir une inhibition de la réaction de fixation du complément par excès d'anticorps.

A peu près à la même époque, une expérience de contrôle d'un vaccin antipéripneumonique inactivé était menée au laboratoire de FARCHA. Elle montrait que des zébus non vaccinés, placés en contact de malades créés artificiellement par intubation endobronchique de lymphes péripneu-

monique et qui devaient mourir de péripneumonie, ne voyaient jamais devenir positive leur sérologie suivie par le test de CAMPBELL et TURNER ; elle ne devenait que très légèrement positive par le test de FARCHA. La reconnaissance de ces échecs arrivait au moment où de semblables ennuis étaient enregistrés dans le diagnostic sérologique de la peste bovine (18) ; un doute puissant était jeté sur la technologie générale des méthodes sérologiques du laboratoire ; il fallait remédier à cet état de fait extrêmement fâcheux. Tous les faits qui viennent d'être rapportés étaient d'autant plus troublants que la pratique de la réaction accumulée depuis vingt ans en Australie et en Afrique orientale n'en fait pas mention.

Pour rassurer le lecteur, il faut d'emblée qu'il soit dit que les échecs ci-dessus relatés n'étaient pas la règle générale et que leur proportion n'excédait pas 10 p. 100 des examens, sauf en certaines occasions. Les exemples ci-dessous en sont révélateurs :

|                                | Cas de péripneumonie clinique ou nécropsique | Nbre de sérums négatifs en F. C. |
|--------------------------------|--|----------------------------------|
| Troupeau transit Bouar         | 19   | 13                               |
| Troupeau Ousman bi Bello ..... | 160  | 10                               |
| Troupeau Bobaye bi Ibro .....  | 100  | 6                                |
| Troupeau B.D.P.A. ...          | 82   | 64                               |

Il paraît important de signaler que ces erreurs ne furent au départ connues que parce que certains bovins étaient abattus dans les jours suivant l'examen sérologique ; si l'on s'était contenté d'un contrôle sérologique banal, on aurait très bien pu les ignorer et la réaction de fixation du complément continuer de jouir de l'estime de tous.

Si peu nombreux qu'ils aient été, il fallait tenir compte de ces échecs sérologiques puisque leur méconnaissance pouvait ruiner toute politique de prophylaxie qui les aurait ignorés en maintenant dans les troupeaux à assainir des malades et des contaminés à tous points de vue ignorés.

Sur ces sérums au comportement apparemment aberrant, divers contrôles furent alors mis en œuvre :

— En règle générale, seule la réaction de fixation du complément pour les anticorps péripneumoniques était négative alors que les réactions d'agglutination sur lame et d'hémagglutination conditionnée étaient positives. Néanmoins quelques sérums de malades se montraient négatifs aux trois réactions.

— L'exactitude de l'équilibre des paramètres de la réaction (antigène, sérum, complément) a été examinée pour éliminer la possibilité de phénomène de zone par excès d'anticorps ou d'antigène ; la dilution poussée des sérums au comportement aberrant n'a pas permis de retenir cette hypothèse.

— La recherche de l'antigène péripneumonique circulant par précipitation interfaciale (31) ou en gélose utilisant un sérum anti-*M. mycoides* d'âne hyperimmunisé, est restée négative pour ces sérums ; une éventuelle saturation *in vivo* ne pouvait être invoquée.

— Par contre, corroborant en ce qui avait été trouvé pour d'autres systèmes immunologiques de diagnostic (18) et singulièrement lors de la recherche des anticorps antibovipestiques, quelques-uns de ces sérums se sont révélés être déficients en gammaglobulines par les tests d'électrophorèse et d'immuno-électrophorèse, ainsi que nous l'avons rapporté (18, 19).

L'existence de cette hypogammaglobulinémie conditionnant la négativité de certaines réactions sérologiques, pose un problème grave pour la validité des réactions de diagnostic en général. Ayant eu des déboires avec les tests physico-chimiques simples de recherche des gammaglobulines bovines (tests de la Huerga et de Kunkel, fiche réticulo-endothéliale de SANDOR) nous avons proposé de considérer la présence ou l'absence d'anticorps antivirux parainfluenza 3 comme « marqueurs » de la gammaglobuline (19) ; sur les 2 p. 100 de sérums de bovins de plus d'un an examinés qui étaient négatifs au test d'hémagglutination, la moitié sont dépourvus d'anticorps parainfluenza 3 et l'autre moitié sont d'authentiques hypogammaglobulinémiques.

Cette carence immunologique n'était pourtant pas le cas des sérums à comportement aberrant en sérologie péripneumonique que nous avons invoqués, sauf en seul.

En ces circonstances, la modestie s'impose. Il faut avouer notre ignorance actuelle des causes

intrinsèques de ces échecs sérologiques, mais aussi y apporter un remède. C'est la solution que nous avons trouvée qui fait l'objet des lignes suivantes.

## II. — LA FIXATION DU COMPLÉMENT PAR LES SÉRUMS DE BOVINS

On sait, depuis que ZINSSER et PARKER (31) l'ont montré, que certains systèmes immunologiques ne fixent pas le complément de cobaye bien que soit réalisée l'union antigène-anticorps. L'école canadienne de sérologie, avec Made-moiselle RICE, BOULANGER et BANNISTER a établi le fait et a pu en faire une généralisation pour tous les sérums d'oiseaux (sauf ceux de l'espèce colombine), certains sérums de chevaux, la majorité des sérums de bovins (4).

En se plaçant d'un point de vue général, une revue de la littérature permet de constater combien les sérums de bovins ont des comportements paradoxaux dans les réactions de fixation du complément. De bons résultats ont été enregistrés avec certains antigènes bactériens, tels les leptospirosiques brucelliques, ou apparemment péripneumoniques ; avec les antigènes viraux (24) et d'une manière générale les antigènes de nature protéique, la fixation directe se réalise mal ou pas du tout bien qu'existent les anticorps spécifiques mis en évidence par d'autres méthodes sérologiques (neutralisation par exemple). On remarquera au passage que tel est très exactement le cas des sérums de zébus dont nous avons plus haut évoqué l'existence.

La raison du comportement des sérums de bovins n'est pas connue dans le détail. On a parlé, comme pour le système humain Rh, d'anticorps « incomplets » ou « univalents », anticorps qui ne possèderaient qu'un site de combinaison sur leur molécule. Par ailleurs on a pensé à une stéréostructure particulière qui demanderait pour fixer le complément une supplémentation en un facteur sérique, vraisemblablement la fraction C'1 de ce complément (26) ; d'où la proposition des techniques utilisant le sérum frais de bovins pour ces réactions : la réaction dite de FARCHA (1) est de celles-là.

On a pu voir néanmoins qu'en certaines circonstances et malgré l'apport de sérums frais

dans la réaction, il existait des sérums de bovins dont les anticorps ne fixaient pas le complément.

Il faut bien dire que tout cela n'est pas clair et restera ainsi tant que ne seront pas élucidées les structures spatiales et moléculaires des immunoglobulines bovines ainsi que la cinétique d'apparition des différentes classes de ces immunoglobulines ( $\gamma G$ ,  $\gamma M$ ).

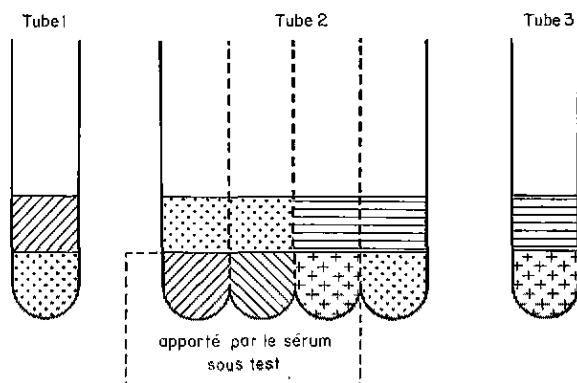
Là n'est point notre propos, beaucoup plus pragmatique : il fallait trouver une solution pratique pour le diagnostic de la péripneumonie où dans l'optique que nous avons de son application à la prophylaxie de la maladie, on doit s'efforcer d'allier la sensibilité à la spécificité.

Nous avons en son temps montré que la réaction d'agglutination sur lame n'était pas spécifique (20) ; la réaction d'hémagglutination ne l'est pas plus et de surcroît fournit des réponses négatives pour quelques malades et de nombreux porteurs chroniques.

Les réactions allergiques n'ont conduit qu'à des déboires. On vient de voir que différentes techniques de fixation du complément avaient connu des échecs.

La réaction de conglutination a été essayée. En aucune occasion avec le sérum de cheval localement disponible il a été possible d'obtenir un complément valable et ces recherches ont été abandonnées (1). Une autre solution existait. RICE a pu mettre sur pied une réaction sérologique avec les sérums de bovins, dite « fixation indirecte du complément » en tenant compte du fait qu'il existait bien un anticorps spécifique mais que, tout en s'unissant à l'antigène, l'immun-complexe ainsi formé était incapable de fixer le complément (22). Si dans un tel système antigène-anticorps « incomplet » on introduit un anticorps à comportement orthodoxe (par exemple un antisérum de lapin), il ne pourra pas s'unir à l'antigène puisque ce dernier sera déjà entré en réaction avec l'anticorps « incomplet ». Le complément de cobaye alors ajouté ni ne se fixera sur l'immun-complexe « incomplet » ni *a fortiori* sur l'immun-complexe orthodoxe qui aurait pu se former si l'antigène avait été libre ; ce complément non fixé peut alors être mis en évidence par une réaction d'hémolyse. Paradoxalement — tout au moins en apparence — une réaction positive dans cette « réaction indirecte » est celle où il y a hémolyse (figure 1). Si en effet l'anticorps incomplet n'existe pas, le

## IMMUNOCOMPLEXES POSSIBLES



### Légende






-  Antigène pour fixation du complément
-  Anticorps de boeuf fixant le complément en fixation directe
-  Anticorps de boeuf "incomplet"
-  Sérum d'âne anti-*Mycoplasma mycoides*
-  Antigène circulant péripneumonique

Figure I

sérum orthodoxe « fixant » se combine à l'antigène et au complément empêchant l'hémolyse subséquente.

Dans ce type de réaction, l'anticorps incomplet se comporte comme une substance inhibant une réaction directe de fixation du complément. On conçoit que par dilution du sérum qui le contient, on puisse le titrer tout comme un anticorps ordinaire.

L'existence d'anticorps « incomplets » était-elle en cause dans les échecs de diagnostic de la péripneumonie ? Vérification fut faite dans une réaction mettant en œuvre l'un des sérums de zébu à comportement anormal, évoqués plus haut, l'antigène péripneumonique pour fixation du complément de CAMPBELL et TURNER, un sérum d'âne anti-*Mycoplasma mycoides*, du complément de cobaye et un système hémolytique hématies de mouton-sérum hémolytique (tableau 1).

L'hémolyse se produisait, la réaction était positive. La démonstration était donc faite que

TABLEAU N°1

Disposition de la réaction de fixation indirecte du complément.

| Sérum de boeuf                 | 1 : 10 |      | 1 : 20 |      | 1 : 1280 |      |     |      |
|--------------------------------|--------|------|--------|------|----------|------|-----|------|
|                                | 0,05   | 0,05 | 0,05   | 0,05 | 0,05     | 0,05 |     |      |
| Dilution quantité              |        |      |        |      |          |      |     |      |
| Antigène                       | 0,1    | 0    | 0,1    | 0    | 0,1      | 0    | 0,1 | 0,1  |
| diluant                        | 0      | 0,15 | 0      | 0,15 | 0        | 0,15 | 0,1 | 0,05 |
| ----- 1 heure à 37° C -----    |        |      |        |      |          |      |     |      |
| Sérum d'âne                    | 0,05   | 0    | 0,05   | 0    | 0,05     | 0    | 0   | 0,05 |
| Complément                     | 0,4    | 0,4  | 0,4    | 0,4  | 0,4      | 0,4  | 0,4 | 0,4  |
| ----- 1 heure à 37° C -----    |        |      |        |      |          |      |     |      |
| Complexe hémolytique           | 0,2    | 0,2  | 0,2    | 0,2  | 0,2      | 0,2  | 0,2 | 0,2  |
| ----- 20 minutes à 37° C ----- |        |      |        |      |          |      |     |      |

dans certains immunosystèmes sérums de zébus-antigènes péripneumoniques pouvaient exister des anticorps « incomplets » que ne mettait pas en évidence une réaction de fixation directe du complément ; de tels sérums y auraient été classés « négatifs ».

Pour le moment nous admettons le fait sans chercher à l'expliquer. Mais le connaissant, notre devoir est de l'exploiter pour pallier aux insuffisances des tests sérologiques jusqu'alors employés.

### III. — LE TEST DIT DES QUATRE TUBES

En partant sur cette idée, nous avons tenu le raisonnement suivant. On ne peut savoir à l'avance si un sérum de zébu, supposé péripneumonique, aura un comportement normal dans une réaction directe de fixation du complément ou bien si on sera obligé de réaliser une fixation indirecte. Le mieux est d'allier les deux tests dans une même réaction, d'où la présence d'un 2<sup>e</sup> tube qui sera celui de la réaction indirecte. Par ailleurs on sait que de l'antigène péripneumonique circulant peut exister dans le sérum des bovins péripneumoniques, que cet antigène sature ou non les anticorps ; quoiqu'il semble que le phénomène de saturation *in vivo* des anticorps fixant le complément soit rare dans la péripneumonie (30), le cas peut néanmoins se présenter ; aussi, profitant de ce que l'on introduisait dans la réaction de fixation indirecte un sérum anti-*mycoïdes*, on a pensé l'utiliser

pour détecter l'antigène circulant éventuellement présent dans le sérum ; un troisième tube est donc inclu dans la réaction ; il sert de surcroît de témoin pour le second tube. Un quatrième enfin servira à apprécier un éventuel pouvoir anticomplémentaire du sérum. A la demande, et ceci pour un test journalier uniquement, des tubes servent de témoins du titrage correct du complément et du sérum anti-*mycoïdes*.

Pour se résumer, le test proposé comportera pour *chacune* des dilutions examinées du sérum sous-test :

- tube n° 1 : une réaction de fixation directe du complément ;
- tube n° 2 : une réaction de fixation indirecte du complément, à la même dilution du sérum sous test que dans le tube n° 1 ;
- tube n° 3 : une réaction de fixation du complément, dans laquelle le sérum sous-test joue le rôle d'antigène, pour la recherche de l'antigène péripneumonique circulant ;
- tube n° 4 : témoin d'un éventuel pouvoir anticomplémentaire du sérum sous-test.

#### A. — Matériel.

1. *Sérums sous-test*. Ils sont obtenus classiquement par ponction veineuse et décantation du caillot sanguin, puis sont congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  en attendant la mise en place de la réaction. Les sérums arrivant pour diagnostic au laboratoire sont clarifiés par centrifugation.

L'influence de l'inactivation ou de la non-inactivation à 56 °C sera envisagée plus loin.

Ils sont dilués de 2 en 2 à partir d'une dilution primitive au 1 : 10.

2. *Antigène péripneumonique.* Le choix s'est porté sur l'antigène ultra-sonné de notre Institut (dit « antigène US ») plutôt que sur l'antigène classique de CAMPBELL et TURNER (\*). Nous avons en effet montré que ce dernier, comme de nombreux antigènes d'origine bactérienne à composition antigénique complexe, présentait plusieurs optimums de fixation selon sa dilution alors que les résultats étaient beaucoup plus réguliers avec l'antigène US (1). De plus sa lyophilisation aisée et sa remise en suspension sans problème garantissent la stabilité de ses qualités antigéniques et mettent à l'abri de la « maturation » ou de la floculation qui se produisent parfois avec l'antigène australien.

On utilise dans la réaction 2 unités antigéniques (U. A.) déterminées par titrage préalable vis-à-vis d'un sérum d'âne anti-*mycoides* par la technique classique dite de l'échéquier.

3. *Diluant.* Le tampon de COHEN a été utilisé dans tous les essais ; tout autre tampon pourrait vraisemblablement convenir.

4. *Complément.* Complément de cobaye lyophilisé (\*), utilisant 2 unités hémolytiques 100 p. 100 de complément (U. H.) titrées en présence de la dilution adéquate d'antigène US ; l'une des qualités de ce dernier est d'être ni pro- ni anti-complémentaire. Le complément dilué n'est pas additionné de sérum frais de bœuf comme on le fait dans la réaction « de FARCHA » (21). La technique de titrage du complément a déjà été exposée (21) ; elle suit la technique classique de KOLMER.

5. *Sérum anti-*mycoides*.* C'est pour des raisons de commodité d'entretien et de prix de revient que l'âne a été choisi comme espèce donatrice de sérum plutôt que le lapin et parce qu'aussi cette espèce n'héberge pas d'anticorps antimyoplasmiques naturels.

Une souche pathogène de *M. mycoides* près de

(\*) Notre collègue P. PERREAU, a qui est acquise notre gratitude, a pris le soin de nous le fournir.

(\*) Fourni par B-D Mérieux, 69, Marcy-l'Etoile — France.

son isolement est cultivée en bouillon tryptose contenant 10 p. 100 de sérum de l'âne qui doit être immunisé ; ainsi est éliminé un facteur d'erreur pouvant provenir de la production d'anticorps-antisérums d'une espèce hétérologue. Les corps microbiens sont récoltés par centrifugation, non lavés, et mis en suspension en sérum physiologique à une opacité double de celle du tube 10 de l'échelle de BROWN. L'âne reçoit une inoculation intraveineuse hebdomadaire de 20 ml pendant 6 semaines au moins, suivie d'une inoculation mensuelle d'entretien. Il est saigné lorsque son sérum présente le maximum de fixation du complément ; ce temps est variable d'un animal à l'autre.

Le sérum est filtré et lyophilisé ; on le conserve ainsi à — 20 °C pendant plusieurs années.

Après reconstitution à son volume primitif avec de l'eau, il est titré, ainsi qu'on l'a dit plus haut, vis-à-vis de l'antigène US en présence de 2 UH de complément et avec un temps de fixation de 1 heure à 37 °C. L'unité fixatrice est la plus haute dilution donnant 100 p. 100 de fixation en présence de la plus haute dilution d'antigène. Dans la réaction finale, on utilisera un multiple de l'unité fixatrice (U. F.).

6. *Système hémolytique.* Classique, utilisant des hématies de mouton à 2 p. 100 et un sérum hémolytique commercial (\*).

## B. — Mise en œuvre.

Le principe est de rechercher à la fois et pour des dilutions variables d'un même sérum de bovin suspect : sa capacité de fixation directe dans une réaction de type « FARCHA » ; sa capacité de fixation indirecte ; la présence éventuelle d'antigène péripneumonique circulant ; enfin son pouvoir anti-complémentaire. Utilisant de faibles quantités de chacun des réactifs, c'est-à-dire se mettant à la fois à l'abri de la possibilité de réaction bloquée par excès d'antigène et travaillant au maximum de la sensibilité, on peut théoriquement penser que ce type de réaction détectera tous les bovins péripneumoniques, y compris les hypo-gammaglobulinémiques qui, malades, hébergent de l'antigène circulant à défaut d'anticorps décelables *in vitro*.

(\*) Serpasteur, 36, rue du Docteur ROUX, Paris (15)<sup>e</sup>.

### 1. Etude préliminaire de quelques paramètres de la réaction.

Divers paramètres de la réaction méritaient d'être étudiés car pouvant influencer sur sa sensibilité.

a) *Inactivation des sérums sous-test.* On sait que l'inactivation à 56 °C pendant 30 minutes réduit la capacité fixatrice des sérums bovins (11, 14, 21) sans pour autant augmenter la spécificité de la réaction ni faire disparaître le pouvoir anticomplémentaire qui peut exister. Il fallait se demander si l'inactivation avait une influence sur la fixation indirecte et la détection de l'antigène circulant. Expérience faite sur une douzaine de sérums différents, les uns positifs en fixation indirecte, d'autres n'hébergeant que de l'antigène circulant ou les deux à la fois, on conclut que l'inactivation ne joue aucun rôle. Il fut donc décidé de ne pas inactiver les sérums sous-tests, de les utiliser le plus frais possible, et si l'on devait les conserver, de le faire à -20 °C ; ce faisant, on s'efforce de préserver leur capacité fixatrice directe.

En pratique, toutefois, les sérums qui sont envoyés de brousse pour diagnostic sont recueillis et voyagent dans des conditions toutes relatives de réfrigération ; il s'ensuit une inactivation naturelle qui, on le verra dans les résultats, paraît influencer sur la fixation directe.

b) *Temps de « neutralisation » du mélange antigène-sérum de bœuf sous-test dans le tube n° 2.* Il s'agit de la fixation d'un anticorps et d'un antigène. Connaissant par expérience les difficultés de la fixation directe du complément avec les sérums bovins où, après nombre d'auteurs, nous avons pu nous rendre compte que les meilleurs résultats étaient enregistrés avec une maturation du mélange de 18 heures à 4 °C, on pouvait se demander s'il n'en serait pas de même pour la fixation indirecte. L'expérience est donc réalisée en utilisant des sérums dont on a vérifié auparavant les capacités fixatrices dans une réaction indirecte et en faisant maturer les mélanges : dilutions des sérums sous test-antigène, soit 1 heure à 37 °C soit 18 heures à 4 °C avant addition du sérum d'âne anti-mycoïdes et du complément.

Les titres obtenus sont rigoureusement les mêmes. Pour la commodité de l'exécution de la réaction complète, on a retenu le temps de « neutralisation » de 1 heure à 37° mais il tombe

sous le sens que, selon l'organisation du travail du laboratoire, on pourrait tout aussi bien choisir l'autre solution.

Ce faisant, ainsi qu'on le verra plus loin dans l'exécution de la réaction complète, on réalisera dans le premier tube de chaque dilution une fixation directe de 1 heure à 37 °C ; les résultats en seront moins bons (perte de une à deux dilutions dans la fixation des sérums positifs) mais le travail facilité. Il restera nécessaire de définir un nouveau seuil de positivité qui ne sera pas forcément celui de la réaction dite de FARCHA (21) fixé au 1 : 80 de la dilution de sérum.

c) *Temps de fixation du complément sur les immuns-complexes.* Ces derniers sont multiples : Dans les premiers tubes de chaque dilution de sérum sous-test, existe le complexe anticorps péripneumonique de ce sérum sous-test antigène péripneumonique.

Dans les troisièmes tubes, anticorps d'âne anti-mycoïdes-antigène péripneumonique circulant du sérum sous-test (s'il existe).

Dans les seconds tubes, la multiplicité des immuns-complexes possibles engendre une situation plus compliquée (figure 1) : anticorps péripneumoniques-antigène péripneumonique comme dans le 1<sup>er</sup> tube si le sérum réagit en réaction directe de fixation du complément ; même union mais sans fixation du complément pour les sérums « anormaux » ; anticorps d'âne anti-mycoïdes-antigène péripneumonique pour les sérums négatifs ; éventuellement, antigène circulant-anticorps d'âne anti-mycoïdes.

On sait par expérience et depuis longtemps que l'optimum de la fixation du complément se réalise avec les sérums bovins en un temps de 18 heures à 4 °C ; avec le sérum d'âne anti-mycoïdes, la fixation est équivalente que l'on utilise une maturation de 18 heures à 4 °C ou de 1 heure à 37 °C. C'est finalement par commodité que cette dernière période de fixation a été choisie, sachant pertinemment, comme dans le cas précédent, que l'on abaissait en la choisissant le seuil de sensibilité de la réaction.

d) *Equilibre des unités fixatrices de sérum anti-mycoïdes.* Au début de l'étude la réaction complète utilisant 4 tubes par dilution de sérum, on introduisait après maturation de 1 heure à 37 °C du mélange sérum sous test-antigène péripneumonique, 2 unités fixatrices (U. F.) de sérum

d'âne anti-mycoïdes dans les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> tubes de chaque dilution.

On pensait ainsi se situer, comme pour une réaction de KOLMER, au maximum de la sensibilité. Il est apparu toutefois que pour de nombreux sérums de malades l'antigène circulant n'était détecté que dans les hautes dilutions du sérum sous-test, entre le 1 : 320 et le 1 : 1.280 par exemple. C'est dire que l'on travaillait en zone d'excès d'antigène (circulant) et que dans la pratique si les dilutions n'étaient pas poussées assez loin, on risquait de méconnaître sa présence qui faisait justement tout l'intérêt de la réaction proposée. Un réajustement des paramètres s'imposait.

En utilisant non plus 2 U. F. mais 10 U. F. de sérum d'âne dans les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> tubes, l'antigène circulant est détecté dès les basses dilutions (1 : 10, 1 : 20). Il fallait alors se demander si la quantité accrue d'anticorps dans le tube 2 n'allait pas gêner la fixation indirecte par excès d'anticorps. L'expérience montre que non, ce qui était d'ailleurs prévisible puisque les anticorps (fixant et incomplets) du sérum de bœuf sous-test ne sont pas mis en jeu.

Dans la suite des recherches on a donc utilisé

10 U. F. de sérum d'âne soit la dilution 1 : 128 avec le sérum dont nous disposons.

## 2. Disposition pratique de la réaction.

Les réactifs sont ceux qui viennent d'être décrits :

- diluant de COHEN,
- sérum de bœuf sous-test, non inactivé, dilué du 1 : 10 au 1 : 160 en diluant de COHEN,
- antigène ultra-sonné dilué à 2 U. A. par 0,1 ml,
- complément dilué à 2 U. H. par 0,4 ml,
- sérum d'âne anti-mycoïdes dilué à 10 U. F. par 0,05 ml,
- système hémolytique.

Les portoirs utilisés comportent 24 trous permettant de ranger 20 tubes de réaction (4 par dilution de sérum) et 2 tubes de contrôle nettement séparés. On utilise ainsi un portoir par sérum.

La disposition de la réaction est figurée dans le tableau II.

On inclut dans chaque test journalier un sérum de bœuf positif possédant de l'antigène circulant.

TABLEAU N°II  
Disposition du "test des quatre tubes"

|                                | Pour chaque dilution de sérum de bœuf sous test (1 : 10 à 1 : 160) |          |          |          | Témoin complément | Témoin sérum d'âne |   |
|--------------------------------|--|----------|----------|----------|-------------------|--------------------|---|
|                                | Tube n°1   | Tube n°2 | Tube n°3 | Tube n°4 |                   |                    |   |
| Sérum sous test                | 0,05   | 0,05     | 0,05     | 0,05     | 0                 | 0                  |   |
| Ag US (2UA)                    | 0,10   | 0,10     | 0        | 0        | 0,10              | 0,10               |   |
| Diluant                        | 0,05   | 0        | 0,10     | 0,15     | 0,10              | 0,05               |   |
| ----- 1 heure à 37° C -----    |  |          |          |          |                   |                    |   |
| Sérum d'âne (10 UF)            | 0  | 0,05     | 0,05     | 0        | 0                 | 0,05               |   |
| C' (2 UH)                      | 0,4  | 0,4      | 0,4      | 0,4      | 0,4               | 0,4                |   |
| ----- 1 heure à 37° C -----    |  |          |          |          |                   |                    |   |
| Système hémolytique            | 0,2  | 0,2      | 0,2      | 0,2      | 0,2               | 0,2                |   |
| ----- 20 minutes à 37° C ----- |  |          |          |          |                   |                    |   |
| Interprétation                 | 1 Positif direct   | 2+4      | 4        | 0        | 0                 | 0                  |   |
|                                | 2 Positif indirect   | 0        | 0+2      | 0        | 0                 | 4                  |   |
|                                | 3 Négatif  | 0        | 4        | 0        | 0                 | 4                  |   |
|                                | 4 Anticomplémentaire   | 4        | 4        | 4        | 4                 | 4                  |   |
|                                | 5 antigène circulant (   | 2+4      | 4        | 1+4      | 0                 | 0                  | 4 |
|                                | 6 (  | 0        | 4        | 1+4      | 0                 | 0                  | 4 |
|                                | 7 (  | 0        | 1+4      | 1+4      | 0                 | 0                  | 4 |



Les périodes de maturation et de fixation proposées ont été étudiées pour nos conditions de travail particulières (journée continue de 7 heures au cours de laquelle les techniciens ont le temps de diluer les sérums sous-test, de mettre en place et mener à bien la réaction).

Il est bien évident, comme on l'a vu dans l'étude des paramètres, que l'on peut substituer, au gré de chaque laboratoire, des temps de 18 heures à 40°C pour l'une ou l'autre des périodes.

### 3. Interprétation théorique.

On apprécie la fixation sur l'échelle conventionnelle et classique de 1 + à 4 + « de fixation ». Toute une gamme de lyse et de fixation existe dans la réaction.

Dans les premiers tubes de chaque dilution d'un sérum fixant le complément en réaction directe, on pourra avoir une fixation allant de 4 à 3 +, pour devenir négative dans les plus hautes dilutions si elles sont poussées.

Dans les seconds tubes, la situation est un peu plus complexe. La réaction négative au regard de la fixation indirecte y sera celle de 4 + de fixation, la positive celle où la lyse des hématies sera complète.

Toutefois, un sérum qui fixera le complément en réaction directe (1<sup>ers</sup> tubes) donnera aussi pour les 2<sup>es</sup> tubes des fixations à 4 et 3 + puisque la réaction directe aura pu y avoir lieu. S'il existe en même temps de l'antigène circulant, la positivité des 2<sup>es</sup> tubes va de pair avec celle des 3<sup>es</sup> tubes. La lyse totale ou éventuellement partielle des 2<sup>es</sup> tubes, accompagnant celle des 1<sup>er</sup> et 3<sup>e</sup> tubes, signera par contre la positivité du sérum sous test en fixation indirecte à la dilution considéré.

La positivité (fixation de 1 + à 4 +) des 3<sup>e</sup> tubes indiquera la présence d'antigène circulant quelque soit la réponse des 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> tubes. Les 4<sup>e</sup> tubes devront toujours être lysés sous peine d'annuler les lectures des tubes les précédant dans chaque dilution (existence d'un pouvoir anticomplémentaire à la dilution du sérum considéré).

En ce qui concerne les tubes témoins, celui du complément devra présenter une lyse totale, celui du sérum d'âne une fixation à 4 + sous réserve — ce qui est vérifié dans les titrages préliminaires — qu'il n'est pas anticomplémentaire à la dilution employée.

Ceci posé, le tableau II donne dans sa partie inférieure l'interprétation des situations possibles pour chaque dilution de sérum. Ne considérons pour l'instant qu'une dilution donnée de ce sérum sous-test. Un sérum négatif présentera une lyse totale dans le 1<sup>er</sup> tube, une fixation à 4 + dans le 2<sup>e</sup>, une lyse totale dans les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> tubes (interprétation n° 3 du tableau II). Sa « formule de fixation » qui résume la situation à une dilution donnée est : 0400.

Un sérum présentera une fixation directe, fixera dans le 1<sup>er</sup> tube de 2 à 4 + ; la fixation sera totale (4 +) dans le 2<sup>e</sup> tube, due tant à la fixation directe du sérum qu'à celle du sérum d'âne se copulant à la fraction d'antigène non éventuellement entrée en réaction avec la dilution du sérum sous-test ; le 3<sup>e</sup> tube sera soit négatif (interprétation 1 du tableau II) soit positif dans le cas d'antigène circulant associé à l'anticorps fixant (interprétation 5). La « formule de fixation » du sérum à la dilution considérée, où pour chaque tube est exprimé le degré de fixation, pourra donc être : 2400, 3400, 4400, 2410, 2420, 3410, 2440...

Le sérum positif dont les anticorps ne fixent pas le complément en réaction directe (c'est-à-dire les sérums que nous avons qualifiés d'anormaux) verra dans le premier tube les hématies lysées ; dans le second tube on pourra aller de la lyse totale (réaction positive) à la fixation partielle à 2 +. S'il n'y a pas d'antigène circulant, le 3<sup>e</sup> tube est négatif (interprétation 2) mais s'il existe, la fixation y sera variable de 1 à 4 + (interprétation 7). En théorie, dans ce dernier cas, le degré de fixation du 2<sup>e</sup> tube devra suivre celle du 3<sup>e</sup>. La « formule de fixation » d'un tel sérum se situe dans la gamme : 0000, 0100, 0200, 0110, ... 0440.

Certains sérums peuvent être parfaitement négatifs au regard des fixations directes ou indirectes mais présenter de l'antigène circulant (interprétation 6) ; la formule de fixation est alors variable de 0410, 0420 à 0440.

Si le sérum est anticomplémentaire à la dilution considérée, il n'existe aucune lyse dans les tubes ; la formule de fixation est alors 4444 (ou éventuellement 3433).

En tout état de cause, on réglera toujours son interprétation en fonction de la situation existant dans le 4<sup>e</sup> tube de chaque dilution.

Si l'on considère maintenant les dilutions d'un même sérum de 1 : 10 à 1 : 160 on pourra avoir, par exemple, les formules de fixation figurant dans le tableau III. La complexité de la lecture n'est qu'apparente. Avec un peu d'entraînement nos techniciens sont parfaitement arrivés à interpréter les résultats.

TABLEAU N°III  
Quelques interprétations possibles avec  
le test des quatre tubes (.)

|   |      |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|------|
| -sérum négatif  | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 |
| -sérum positif direct                                     | 4400 | 4400 | 4400 | 4400 | 3400 |
| -sérum positif direct<br>avec antigène cir-<br>culant     | 4430 | 4430 | 4420 | 3410 | 2400 |
| -antigène circulant                                       | 0430 | 0420 | 0410 | 0410 | 0400 |
| -sérum positif<br>indirect                                | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0100 |
| -sérum positif in-<br>direct avec anti-<br>gène circulant | 0330 | 0330 | 0220 | 0110 | 0000 |
| -anticomplémentaire<br>négatif                            | 4444 | 3333 | 0400 | 0400 | 0400 |
| -anticomplémentaire<br>positif                            | 3443 | 2441 | 2410 | 1410 | 0410 |

(.) Les chiffres de 0 à 4 représentent le p.100 de lyse des hématies.

### C. — Quelques résultats.

La technique proposée, que nous n'osons dénommer fixation du complément parce qu'en fait elle fait appel à plusieurs réactions sérologiques, est entrée depuis deux ans dans la pratique *quotidienne* du laboratoire de FARCHA, tant dans le domaine de la recherche que dans celui du diagnostic. C'est dire que l'on dispose maintenant de quelques éléments pour apprécier son utilité.

Pour établir la valeur pratique du test des 4 tubes, il fallait disposer de troupeaux de bovins péripneumoniques connus et de bovins sains en contact. Il restait à établir alors une comparaison entre les tests sérologiques classiques, la nouvelle réaction proposée et les données de la clinique et de l'autopsie. L'occasion s'est présentée à deux reprises lors de contrôles d'immunité du vaccin mixte antipestique-antipéripneumonique (« Bisec ») réalisés au laboratoire. Ayant ainsi de solides éléments d'appréciation, on a pu appliquer le test des 4 tubes au diagnostic.

### 1. Etablissement des normes d'appréciation de la réaction.

Le contrôle d'immunisation d'un vaccin anti-péripneumonique consiste à placer un certain nombre de bovins vaccinés au contact de bovins péripneumoniques artificiellement créés par intubation endobronchique de lésions péripneumoniques broyées, en même temps qu'un nombre de bovins réceptifs égal à celui des vaccinés (1).

On a ainsi 3 catégories de sujets dont on va pouvoir suivre la sérologie :

- les intubés, péripneumoniques certains,
- les bovins réceptifs qui développeront une péripneumonie-infection identique à la maladie naturelle,
- les vaccinés présentant une gamme variable d'infection selon la valeur de leur immunité.

En ce qui nous concerne, ce ne sera pas sa valeur qui rentrera en ligne de compte mais uniquement la cinétique de la sérologie, quelque soit la classe du malade.

Dans la présente expérience ont été comparés le test dit de FARCHA (TF) et le test des 4 tubes (TQT) sur des prises de sang hebdomadaires. Le premier test a été réalisé sur les sérums le plus tôt possible après l'obtention de l'échantillon, le second à l'occasion ; il s'est parfois écoulé plusieurs semaines entre les deux examens, temps pendant lequel les sérums étaient conservés à  $-20^{\circ}$ .

Les résultats ne seront pas exposés dans leur totalité car il s'agit de plus de 1.500 réactions ; seuls les faits saillants seront commentés. Des résultats chiffrés sont fournis dans le tableau IV.

a) Le test des 4 tubes est incomparablement moins sensible en fixation directe du complément que le test de FARCHA ; partant, il paraît être plus spécifique. Il ne nous est pas apparu qu'il y ait à lui fixer un seuil de lecture ;

Ex. : nos 3907 et 2186 où sont exposés les résultats de 4 prises de sang hebdomadaires consécutives ; 3901 avec 2 examens hebdomadaires. Chez un péripneumonique confirmé, les titres peuvent toutefois être sensiblement équivalents (no 3523, no 2267 chez qui est détecté en même temps de l'antigène circulant ; 2127, 2596, 2585). Dans ces cas particuliers, le TQT est positif en

une occasion où le test de FARCHA est négatif ; ce point sera discuté.

Comme il s'agit d'une règle générale, nous considérons que toute positivité du TQT en fixation directe signe la présence d'anticorps péripneumoniques (ce qui ne veut pas dire : maladie péri-

pneumonique). En aucune occasion le TQT n'a été positif chez des bovins considérés comme normaux (0400 à toutes les dilutions).

Ainsi qu'on l'a dit, en de rares occasions le TQT peut être positif et la réaction de FARCHA négative. Comme seul est différent dans les

TABLEAU N° IV

Exemples de lecture du test des quatre tubes (TQT) et du test de Farcha (TF).  
(Interprétation donnée dans le texte, paragraphe III-C-1).

| N° du bovin | T Q T          |                |                |                |                 | T F              |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
|             | 1 : 10<br>2410 | 1 : 20<br>1410 | 1 : 40<br>0410 | 1 : 80<br>0410 | 1 : 160<br>0400 |                  |
| 2118        |                |                |                |                |                 | 20 ++++          |
| 2127        | 4400           | 4400           | 2400           | 1400           | 0200            | 10 ++++          |
| 2186        | 0400           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | 20 ++++          |
|             | 0400           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | 40 ++++          |
|             | 0400           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | 80 ++++          |
|             | 0400           | 0400           | 0400           | 0300           | 0400            | 40 ++++          |
| 2267        | 1400           | 1400           | 0400           | 0400           | 0400            | -                |
|             | 4410           | 4400           | 4400           | 1400           | 0400            | 80 ++++<br>160 + |
| 2549        | 4443           | 4440           | 1440           | 1440           | 0400            | 40 ++++          |
|             | 0400           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | 10 ++++          |
|             | 0400           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | -                |
|             | 1400           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | 20 ++++<br>40 +  |
| 2551        | 0100           | 0200           | 0300           | 0400           | 0400            | 40 ++++          |
| 2562        | 4400           | 4400           | 2200           | 1100           | 0000            | 10 ++++          |
|             | 0100           | 0000           | 0000           | 0000           | 0400            | 20 ++++          |
| 2564        | 2420           | 2410           | 1410           | 0410           | 0400            | 80 ++++          |
|             | 4420           | 4430           | 4440           | 4440           | 4440            | 80 ++++          |
| 2566        | 0000           | 0000           | 0000           | 0000           | 0000            | 20 ++++          |
|             | 0100           | 0100           | 0000           | 0100           | 0100            |                  |
| 2567        | 0000           | 0000           | 0000           | 0000           | 0000            | 40 ++++          |
|             |                |                |                |                |                 | 80 ++            |
| 2568        | 4444           | 2420           | 1420           | 1420           | 1400            | 40 ++++          |
| 2585        | 2431           | 0440           | 0420           | 0420           | 0420            |                  |
| 2593        | 2421           | 1420           | 0420           | 0420           | 0220            | 20 ++++          |
| 2596        | 0420           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | -                |
|             | 4400           | 4400           | 0400           | 0400           | 0400            | 20 ++++          |
| 2598        | 4444           | 2440           | 0440           | 0420           | 0110            | 20 ++++          |
| 2742        | 0440           | 0420           | 0400           | 0400           | 0400            | -                |
|             | 1440           | 1430           | 0420           | 0420           | 0420            | 10 ++++          |
| 3523        | 4400           | 3400           | 1400           | 0400           | 0400            | 80 ++++          |
|             | 3400           | 1400           | 0400           | 0400           | 0400            | 40 ++++          |
| 3535        | 4400           | 4400           | 1100           | 1100           | 0000            | 80 ++++          |
|             | 0200           | 0100           | 0000           | 0000           | 0000            | 80 ++++          |
| 3901        | 0400           | 0400           | 0400           | 0400           | 0400            | 10 ++++          |
|             | 2400           | 1400           | 0400           | 0400           | 0400            | 40 ++++          |

TABLEAU N°IV (suite)

|      |      |      |      |      |         |              |
|------|------|------|------|------|---------|--------------|
| 3903 | 0410 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 20 ++++      |
|      | 0200 | 0200 | 0300 | 0400 | 0400    | -            |
|      | 1400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 80 ++++      |
| 3906 | 4400 | 4400 | 4400 | 1400 | 0400    | 40 ++++      |
|      | 4440 | 4440 | 4440 | 4410 | 0400    | 80 ++        |
| 3907 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 40 ++++ 80 + |
|      | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 10 ++++      |
|      | 1400 | 1400 | 0400 | 0400 | 0400    | 80 ++++      |
|      | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 40 ++        |
|      | 2400 | 1400 | 1400 | 0400 | 0400    | 10 ++++      |
|      | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 10 ++++      |
|      | 2410 | 1410 | 0400 | 0400 | 0400    | 10 ++++      |
|      | 1400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 40 ++++      |
|      | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 40 ++++      |
|      | 4441 | 4440 | 2440 | 1440 | NF      | 40 ++++      |
|      | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | NF           |
|      | 0400 | 0400 | 0400 | 0400 | 0400    | 20 ++++      |
|      | 4440 | 2440 | 1440 | 0440 | NF      | 80 ++++      |
|      | 4400 | 4400 | 0400 | 0400 | 0400    | 160 ++++     |
|      | 4400 | 4400 | 4400 | 4400 | 4400    | NF           |
|      | 4420 | 4420 | 4410 | 4410 | 4400    | NF           |
|      | 4440 | 4430 | 4420 | 3410 | 1410    | 80 ++++      |
|      | 4400 | 4400 | 4400 | 4400 | 4400    | 160 ++++     |
|      | 4400 | 4400 | 4400 | 4400 | 0400    | 80 ++++      |
|      | 4440 | 4440 | 4440 | 4440 | 4420    | 80 ++++      |
|      | 4400 | 4400 | 4400 | 4400 | 4400    | 80 ++++      |
|      | 4400 | 4400 | 1400 | 0400 | 0400    | 80 ++++      |
|      | 4400 | 4400 | 1400 | 0400 | 0400    | 80 ++++      |
| 1400 | 1400 | 0400 | 0400 | 0400 | 40 ++++ |              |
| 4400 | 2400 | 0400 | 0400 | 0400 | 80 ++++ |              |
| 3913 | 0200 | 0200 | 0000 | 0200 | 0300    | 40 ++++      |
|      | 3410 | 2410 | 1410 | 0410 | 0400    | 20 +++       |
|      | 1420 | 1420 | 0420 | 0400 | 0400    | -            |
| 3939 | 2411 | 1400 | 0400 | 0400 | 0400    | 10 +         |
|      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0100    | 10 ++++      |

Les rangées horizontales de chiffres du TQT et du TF correspondent pour les sérums où il y en a plusieurs (2186, 3907) à des examens réalisés sur des prises de sang hebdomadaires. NF : réaction non effectuée.

constituants de la réaction l'antigène introduit, on en arrive à penser que l'on met parfois en évidence des anticorps fixant le complément parfaitement différents dans les deux tests. Ceci reste évidemment à vérifier.

b) La positivité indirecte (2<sup>e</sup> tube) du test des 4 tubes va souvent de pair avec une négativité ou un titre non spécifique de la réaction de FARCHA ; plus souvent, cette dernière deviendra positive une ou deux semaines après la positivité indirecte du TQT, alors disparue. C'est dire que le TQT peut détecter des anticorps péripneumoniques avant la fixation directe du complément, même avec le test de FARCHA pourtant sensible. Nous estimons que la positivité indirecte du TQT détecte des anticorps de primo-infection péripneumonique.

Ex. : 3903, 3938, 3930, 2566, 2551, sérum intéressant parce que s'il fixe au titre 1 : 40 (non significatif) dans le test de FARCHA et s'il est positif en fixation indirecte, la réaction de CAMPBELL et TURNER a donné un résultat négatif. Avec les réactions classiques la positivité de ce sérum aurait été méconnue.

Il y a parfois dissociation dans les réactions de fixation directe des deux tests.

Ex. 3535, 2567, où le test de FARCHA est positif et le TQT positif en réaction indirecte seulement. Nous n'offrons pas d'explication pour le phénomène.

Sur le plan pratique, il est important de noter que les n<sup>os</sup> 3938 et 2567 auraient été classés négatifs ou douteux au vu du seul test de FARCHA et que ce doute aurait subsisté pour les animaux

si l'on n'avait disposé que d'un seul échantillon de sérum.

Il est un phénomène curieux qui est celui de l'électivité de la fixation indirecte à certaines dilutions du sérum plutôt qu'à d'autres ; ainsi les nos 2562, 3535 déjà cités, et 3913 (1<sup>re</sup> ligne). Il est douteux qu'il s'agisse d'une inhibition par excès d'anticorps puisque dans le cas du 3913 par exemple, la fixation directe va vers sa négativation à la dilution 1 : 160 ; le n° 2567 et le n° 3930, fortement positifs en fixation indirecte (bovins non vaccinés 15 jours après la mise en contact avec les malades) le sont dès la dilution 1 : 10.

c) L'antigène circulant est très régulièrement détecté en deux sortes de circonstances :

— lors de la primo-infection péripneumonique, auquel cas il peut être présent sans aucun anticorps (3903, 2127, 2585) ou avec des anticorps fixant directement le complément (nos 3939, 2549, 2267) ou des anticorps incomplets ; cette dernière éventualité sera envisagée plus loin. En général l'antigène circulant est détecté une ou deux semaines avant la positivité sérologique, directe ou indirecte (nos 2596, 2742) ;

— lors de la phase terminale de la maladie avec négativation ou réduction du titre de la réaction directe (2549), mais le plus souvent sans modification (3906, 2564).

Certaines fois, on trouve des décharges d'antigène circulant tout au long de la maladie (n° 3907), mais aussi des épisodes frustrés de positivité antigénique chez des vaccinés en contact avec des malades sans que la présence épisodique de cet antigène soit cliniquement perceptible ni ne rende par la suite positive la recherche des anticorps.

Enfin il est une observation remarquable : la présence de l'antigène circulant en quantité élevée est souvent accompagnée d'un pouvoir anticomplémentaire du sérum aux basses dilutions (nos 2598, 2568, 2593, 2549, 1<sup>re</sup> ligne) ; une tentative séduisante d'explication est de penser à une union anticorps péripneumoniques-antigène circulant qui fixerait le complément de cobaye apporté dans la réaction.

Incidemment et sans oser dire que cela est lié au même phénomène, il ne nous a jamais été donné de rencontrer aux basses dilutions d'un

sérum une fixation indirecte positive et la présence d'antigène circulant ; le cas des sérums 2593 et 2598 qui ne deviennent positifs indirects qu'à la dilution 1 : 160 accrédirait cette thèse.

En certaines occasions et malgré la modification introduite en cours d'étude dont il a été fait mention (emploi de 10 U. F. de sérum d'âne anti-mycoïdes), il arrive que dans les basses dilutions du sérum sous test on assiste à une inhibition partielle de la détection de l'antigène (n° 2564).

d) Si l'on tente de faire une synthèse du déroulement de la maladie péripneumonique suivie par le test des 4 tubes, on aboutit à la séquence suivante :

- négativité sérologique ;
- présence d'antigène circulant ;
- positivité en fixation indirecte ;
- positivité en fixation directe avec alors 2 éventualités :
  - négativation de la sérologie (guérison) ;
  - décharges d'antigène circulant suivies ou non de fluctuations de la sérologie en fixation directe puis décharge ultime d'antigène circulant avec ou sans négativation sérologique.

e) Dans les tests suivis d'autopsies qu'il nous a été donné de pratiquer, nous n'avons observé que cinq séquestres, de petite taille, tous bactériologiquement stériles ; la sérologie des bovins au TQT était négative. Des résultats, nous ne pouvons extraire que le cas de l'animal n° 3907, bovin sensible mis au contact de malades, péripneumonique à son tour puis apparemment guéri, toujours vivant au moment où ces lignes sont écrites ; sa sérologie vaut d'être citée *in extenso* car elle est évocatrice de celle d'un porteur chronique.

## 2. Application au diagnostic.

Lors de la conception du test des 4 tubes, on avait pensé pouvoir en faire une réaction simple n'examinant qu'une ou deux dilutions de sérum, le 1 : 50 et 1 : 100 par exemple. C'est maintenant une pratique qui nous paraîtrait dangereuse car la positivité directe et l'antigène circulant peuvent fort bien être détectés au-dessous de la dilution 1 : 50 et ne pas l'être au-dessus. D'où la règle adoptée d'examiner les 5 dilutions du 1 : 10 au 1 : 160.

Les exemples cités ont permis de se rendre compte que le TQT décrie péricapneumoniques, sur le vu de leur positivité indirecte ou de leur antigène circulant, des sérums qu'ignorerait parfaitement toute réaction directe. Ne disposant que d'un seul échantillon du sérum d'un animal, on déclarerait ce dernier sain alors qu'il serait infecté et péricapneumonique ignoré en évolution abortive ou non. C'est dans ce dernier aspect que le test proposé nous paraît surclasser tous les autres pour la détection des contaminés, suspects et malades. Il doit être particulièrement précieux pour la surveillance d'un effectif. Reste le cas des porteurs de séquestres pour lesquels nous n'avons pas encore d'opinion définitive, mais où il paraît pourtant qu'il soit aussi valable sinon plus que tout ce qui a été proposé jusqu'alors.

#### IV. — DISCUSSION

On se souvient des mobiles qui, au départ, nous ont incités à étudier un nouveau type de réaction sérologique applicable au diagnostic de la péricapneumonie ; c'étaient les échecs rencontrés dans la pratique des réactions de fixation du complément sur d'authentiques malades.

Certes, on a pu dire que les lésions se constituaient très vite dans la péricapneumonie et qu'il pouvait arriver que la sérologie fût négative et qu'une péricapneumonie soit rencontrée à l'abattage quelques jours plus tard (2). En admettant le cas pour certains diagnostics réalisés sur des sérums venant de brousse, nous le réfutons pour des animaux péricapneumoniques d'expérience suivis au laboratoire par prises de sang bi ou tri-hebdomadaires.

On a pu montrer que l'hypogammaglobulinémie, si elle pouvait expliquer certains échecs, ne devait pas être incriminée statistiquement pour plus de 1 p. 100 des sérums (19).

Nous avons enfin étayé l'opinion qu'il s'agissait en fait dans les cas rapportés d'un comportement sérologique banal, commun pour des sérums bovins examinés dans des réactions de fixation du complément ; ce comportement a été retrouvé, étudié en d'autres parties du monde et pour d'autres maladies : fièvre aphteuse, stomatite vésiculeuse mais aussi péricapneumonie. C'est ainsi que CAMPBELL et TURNER eux-mêmes (5), puis JOHNSTON et SIMMONS en

Australie (10) d'une part, PARKER (16) et GOURLAY (9) en Afrique d'autre part, pour ne citer qu'eux, font état de tels échecs. La technique de CAMPBELL et TURNER ne doit pourtant pas être plus mise à l'index qu'une autre ; le test de HUDDART est tout aussi sujet aux erreurs (2) comme l'est celui de FARCHA.

A ce comportement anormal, diverses parades ont été préconisées : addition de sérum bovin frais apportant un facteur thermolabile favorisant la fixation directe comme dans les techniques de BOULANGER (4a), de KNIGHT et COWAN (14) ou celle dite « de FARCHA » (21). La congutination a en certaines occasions été proposée ; dans nos mains et par suite de circonstances locales, elle ne s'est pas montrée applicable. La réaction indirecte de RICE (22, 23, 25) offrait par contre tous les espoirs.

Comme néanmoins on pouvait penser qu'en certaines circonstances un ou des antigènes péricapneumoniques circulants pouvaient saturer les anticorps, il devenait logique d'ajouter une épreuve permettant de les détecter. D'où l'apparente complexité de la réaction qui est proposée.

Dans son essence, le test proposé, combinant recherche d'antigène et d'anticorps, a des analogies avec celui de SHIFRINE et GOURLAY (27), où une réaction d'agglutination sur lame est couplée à une recherche d'antigène circulant. Il nous paraît toutefois lui être supérieur en ce qu'il peut détecter des anticorps qu'ignore l'agglutination sur lame et qu'il ne requiert qu'un seul type de réaction où entrent les différents réactifs d'une réaction de fixation du complément.

Il est toutefois intéressant de noter que par des voies d'approche différentes, deux groupes d'études convergent vers le même but et étayent l'opinion qui se fait jour, à savoir que *la seule recherche des anticorps péricapneumoniques ne saurait affirmer le diagnostic de péricapneumonie mais qu'il est nécessaire d'évaluer l'antigène circulant*.

Les techniciens avertis de la méthodologie de la fixation indirecte du complément auront remarqué que dans la réalisation pratique nous nous sommes quelque peu écartés du schéma initialement proposé par RICE (22) et suivi par KARRER, MEYER et EDDIE (12) pour la recherche des anticorps ornithosiques. Elle se rapproche par contre de celle qu'ont employé RICE et BROOKSBY (25) et qu'on aussi exploré KONJO

et BANKOWSKI (13). Il nous a paru préférable, dans nos conditions de travail et avec le complément dont on disposait, de ne pas ajouter ce dernier dans un premier temps au mélange sérum sous test-antigène ; ce complément aurait alors subi deux séjours successifs à 37° et l'expérience nous a montré que pour pallier à son inactivation thermique il fallait au départ de la réaction en introduire de grandes quantités, ce qui est à la fois coûteux et diminue la sensibilité du test. La pratique de n'ajouter le complément que dans le 2<sup>e</sup> temps de la réaction, juste après l'introduction du sérum d'âne anti-mycoïdes, a donc été adoptée.

La disposition même de la réaction, où l'on présente 4 épreuves sérologiques différentes pour une même dilution du sérum sous test, peut surprendre. Là encore nous nous sommes éloignés de ce que préconisait RICE (23) qui utilisait pour un même sérum 3 portoirs sur lesquels étaient rangés les dilutions successives du sérum : le premier portoir servait au contrôle du pouvoir anticomplémentaire, le second à la réaction directe, le 3<sup>e</sup> à la réaction indirecte. Si on avait adopté cette disposition, c'est un quatrième portoir qu'il aurait fallu ajouter, d'où un encombrement des baignoires. Dans la disposition proposée, un seul portoir suffit à un sérum où sont examinées les dilutions du 1 : 10 au 1 : 160. On a vu que cette gamme de dilutions convenait parfaitement au diagnostic de la péripneumonie, ce qui est le but final recherché.

Le choix de l'antigène ultra-sonné a peut-être des incidences qui ne sont pas encore pleinement appréciées. Par opposition à l'antigène bouilli de CAMPBELL et TURNER, il s'agit d'un antigène obtenu par simple lyse ultra-sonique de corps mycoplasmatiques récoltés par centrifugation. C'est dire qu'il est vraisemblable que le complexe antigénique qu'il représente contient des molécules, surtout des molécules protéiques, plus près de leur état naturel qu'après l'ébullition que subit l'antigène australien. Il est donc possible que soient détectés avec l'antigène ultra-sonné une autre catégorie d'anticorps qu'avec l'antigène de CAMPBELL et TURNER, en plus de ceux que met en évidence ce dernier par sa fraction thermostable également présente dans l'antigène ultra-sonné. Il y a là matière à recherches qui n'ont été, jusque-là, qu'esquissées.

Il n'en reste pas moins que le grand progrès qu'il y a à réaliser dans les techniques sérologiques de la péripneumonie, celle-ci comme toutes les autres jusqu'à maintenant proposées, est l'amélioration de la spécificité antigénique. L'opinion semble actuellement prévaloir que le manque de spécificité est dû à la présence du galactane (28). Si l'on arrive à s'en débarrasser dans les préparations antigéniques, on peut espérer qu'avec l'aide du test ici proposé on arrivera à cerner de très près le problème du diagnostic de la maladie.

Quelle est la classe d'anticorps que détecte exactement la réaction indirecte ? Nos résultats montrent clairement qu'il s'agit dans la réaction indirecte d'une toute autre catégorie d'anticorps que ceux qui fixent le complément et que les sérums que l'on trouve être positifs en fixation indirecte ne sont pas des sérums de bovins gammaglobulinémiques. ANDERSON et coll. (3) ont montré que l'inaptitude à fixer le complément d'un sérum bovin dans un immunosystème donné était liée à la présence d'anticorps sensibles à l'inactivation par le mercapto-éthanol, autrement dit à des globulines  $\gamma$ M. Depuis plusieurs années, il a été montré que ces dernières ne fixaient pas le complément (17), bien que MURPHY et coll. (15) leur attribuent une certaine capacité fixatrice.

Nous pencherions pour penser qu'effectivement les globulines  $\gamma$ M ne fixent pas le complément avec les antigènes péripneumoniques car les résultats enregistrés avec le test des quatre tubes montrent clairement qu'avant la phase de positivité directe existe dans la maladie péripneumonique une phase de positivité indirecte ; or on sait qu'au cours de l'immunisation ce sont les globulines  $\gamma$ M qui apparaissent les premières (17).

Une explication possible au phénomène générateur des échecs sérologiques apparents qui furent à la genèse de la présente recherche pourrait donc être que la quantité totale de gamma-globulines soit correcte mais qu'un trouble existe dans la répartition des globulines  $\gamma$ G et des  $\gamma$ M. C'est très précisément ce que laissent présager nos électrophorogrammes de sérums à comportements anormaux dans lesquels les globulines  $\gamma$ M étaient parfaitement mises en évidence au détriment des  $\gamma$ G (18).

C'est aussi ce que laisse présager la réparti-

tion des globulines  $\gamma G$  et  $\gamma M$  dans l'infection humaine par *Mycoplasma pneumoniae* (6) où la distribution des 2 protéines sériques est variable avec le temps et où en conséquence, la réponse aux tests sérologiques peut elle aussi être variable.

Au total, la réaction indirecte de fixation du complément a de fortes analogies avec une réaction de neutralisation réalisée *in vitro*, ou encore le test des anti-globulines mis en œuvre dans la réaction de COOMBS.

L'anticorps qui y est mis en évidence est celui qui s'unit directement à son antigène spécifique ; seul est modifié le système révélateur : fixation directe du complément dans un cas, infection d'un système sensible (animal, œuf ou cultures cellulaires) ou révélateur de l'immun-complexe par agglutination dans les autres.

Dans ces conditions, est-il permis de penser que la réaction indirecte met en évidence non seulement des anticorps d'infection mais aussi des anticorps conditionnant l'immunité chez des bovins normaux ? Il y a là matière à recherches supplémentaires avec de nouveaux antigènes, si l'on se souvient que justement l'activité bactéricide des sérums est fortement liée aux globulines  $\gamma M$  (17).

En pratique et jusqu'à plus ample averti, nous pensons qu'il serait osé d'affirmer pour l'instant, si l'on ne dispose que d'un seul échantillon d'un suspect, qu'un sérum qui est positif uniquement sur le 2<sup>e</sup> tube (positivité indirecte) à l'exclusion des 1<sup>er</sup> et 3<sup>e</sup> tubes (positivité directe et anticorps circulant), provient d'un bovin péripleurmonique ; il est possible qu'il provienne tout aussi bien d'un animal immun.

## SUMMARY

### Immunological studies on pleuropneumonia.

#### X. A new serological technique for experimental diagnosis : the four tube test

The reasons that led the authors to suspect some inadequacies of complement fixation test in bovine pleuropneumonia diagnosis are indicated. A technique of serological diagnosis of the disease, named « four tube test » is described : it uses for one serum on only one tube support : a direct complement fixation, an indirect fixation, the detection of pleuropneumonia circulating antigen and a serum control. The method and the interpretation are exposed in detail. Examples are given.

## RESUMEN

### Investigaciones inmunológicas sobre la perineumonía.

#### X. Propuesta de una nueva técnica serológica para el diagnóstico experimental de la enfermedad : la prueba de los cuatro tubos

Los autores exponen los motivos que hicieron sospechar ciertas fallas de la reacción de fijación del complemento en el diagnóstico de la perineumonía bovina.

Describen una técnica de diagnóstico serológico llamada « Prueba de los cuatro tubos », de la enfermedad que junta para un mismo suero sobre un mismo soporte : una fijación directa del complemento, una fijación « indirecta », la búsqueda del antígeno perineumónico circulante y un control del suero. Se describen en detalle las modalidades técnicas y la interpretación ; se dan ejemplos.



## RÉFÉRENCES

1. ANONYME. — **Rapport quinquennal d'activité (1961-1966) sur la péripneumonie.** Rapport annuel 1966 du Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, Fort-Lamy, Tchad, tome 2.
2. ANONYME. — **Troisième rapport du groupe d'experts FAO/OIE/OUA sur la péripneumonie.** Rapport de la FAO, AN 1967/2. Rome, 1967.
3. ANDERSON (R. K.), JENESS (R.), BRUMFIELD (H. P.) et GOUGH (P.). — **Brucella-agglutinating antibodies : relation of mercaptoethanol stability to complement fixation.** *Science*, 1964, **143**, 1334-1335.
4. BOULANGER (P.). — **The use of the indirect complement fixation test in veterinary medicine.** *Canad. J. comp. Med.*, 1954, **18**, 280-286.
- 4a. BOULANGER (P.). — **Technique of a modified direct complement-fixation test for viral antibodies in heat-inactivated cattle serum.** *Canad. J. comp. Med.*, 1960, **24**, 262-269.
5. CAMPBELL (A. D.) et TURNER (A. W.). — **Studies on contagious pleuropneumonia of cattle. IV. An improved complement fixation test.** *Aust. Vet. J.*, 1953, **29**, 154-163.
6. FERNALD (G. W.), CLYDE (W. A.) et DENNY (F. W.). — **Nature of the immune response to *Mycoplasma pneumoniae*.** *J. Immun.*, 1967, **98**, 1028-1038.
7. GAMBLES (R. M.). — **Studies on contagious bovine pleuropneumonia with special reference to the complement fixation test.** *Brit. Vet. J.*, 1956, **112**, 34-40 ; 78-86 ; 120-127 ; 162-169.
8. GOULLET (P.). — **Structure des anticorps sériques.** *Presse médicale*, 1965, **79** (23), 1349-1353.
9. GOURLAY (R. N.). — **Comparison between some diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia.** *J. comp. Path.*, 1965, **75**, 97-109.
10. JOHNSTON (L. A. Y.) et SIMMONS (G. C.). — **Bovine pneumonias in Queensland with particular reference to the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia.** *Aust. Vet. J.*, 1963, **39**, 290-294.
11. KARMAN (N. P.) et WITTE (J.). — **Die Komplementbindung mit aktivem und inaktivem Serum bei der Diagnose der Lungenseuche des Rindes.** *Zeitschr. Inf. Haust.*, 1926, **29**, 59-67.
12. KARBER (H.), MEYER (K. F.) et EDDIE (B.). — **The complement fixation test and its application to the diagnosis of ornithosis in chickens and ducks. I. Principles and technique of the test.** *J. infect. Dis.*, 1950, **87**, 13-23.
13. KINJO (T.) et BANKOWSKI (R. A.). — **Modification including the use of rabbit serum as indicator in the indirect complement fixation procedure with avian serum for diagnosis of ornithosis.** *Avian Dis.*, 1965, **9**, 359-367.
14. KNIGHT (G. J.) et COWAN (K. M.). — **Studies on allegedly non-complement-fixing immune systems. I. A heat labile serum factor requirement or a bovine antibody complement-fixing system.** *J. Immun.*, 1961, **86**, 354-360.
15. MURPHY (F. A.), OSEBOLD (J. W.) et AALUND (O.). — **Physical heterogeneity of bovine  $\gamma$ -globulins : characterization of  $\gamma$ M and  $\gamma$ G globulins.** *Arch. Bioph.*, 1965, **112**, 126-136.
16. PARKER (A. M.). — **Contagious bovine pleuropneumonia. Production of complement-fixing antigen and some observations on its use.** *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1960, **8**, 111-119.
17. PIKE (R. M.). — **Antibody heterogeneity and serological reactions.** *Bact. Rev.*, 1967, **31**, 157-174.
18. PROVOST (A.), BORREDON (C.) et QUEVAL (R.). — **Une hypogamma-globulinémie essentielle des bovins d'Afrique centrale, cause d'erreur dans les enquêtes sérologiques.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1965, **18**, 385-393.
19. PROVOST (A.), BORREDON (C.) et QUEVAL (R.) et MAURICE (Y.). — **Enquête sur l'infection des bovidés par le virus parainfluenza 3 en Afrique centrale. Application au contrôle de la sérologie de la péripneumonie.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1967, **20**, 51-59.

20. PROVOST (A.), VILLEMOT (J. M.), QUEVAL (R.) et VALENZA (J.). — Les limites d'interprétation de la réaction d'agglutination sur lame dans le diagnostic de la péripneumonie. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1959, **7**, 337-343.
21. QUEVAL (R.), PROVOST (A.) et VILLEMOT (J. M.). — Comparaison de méthodes de déviation du complément utilisées dans l'étude de la péripneumonie bovine. *Bull. epiz. Dis. Afr.* 1964, **12**, 159-170.
22. RICE (C. E.). — Some factors influencing the selection of a complement fixation method. II. Parallel use of the direct and indirect technics. *J. Immun.*, 1948, **60**, 11-16.
23. RICE (C. E.). — Studies in pullorum disease. XXII. Technical of the indirect complement-fixation test for activity with salmonella pullorum antigens. *Canad. J. comp. Med.*, 1948, **12**, 130-136.
24. RICE (C. E.). — The use of the complement-fixation test in the study and diagnosis of viral diseases in man and animal. A review. Part III. Vesicular viruses. *Canad. J. comp. Med.*, 1960, **24**, 204-208.
25. RICE (C. E.) et BROOKSBY (J. B.). — Studies of the complement fixation reaction in virus systems. V. In foot and mouth disease using direct and indirect methods. *J. Immun.*, 1953, **71**, 300-310.
26. RICE (C. E.) et CARRIERE (J.). — The effect of unheated bovine serum on the complement — fixing activity of heat inactivated bovine antiserum with homologous antigen. *J. Immun.*, 1961, **87**, 665-674.
27. SHIFRINE (M.) et GOURLAY (R. N.). — Evaluation of diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1967, **15**, 7-10.
28. SHIFRINE (M.) et GOURLAY (R. N.). — Serological relationships between *Mycoplasma mycoides* and other bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1967, **143** (1) : 317-324.
29. TURNER (A. W.). — Circulating *M. Mycoides* antigen as a cause of loss of agglutination and complement fixation reactivity during acute pleuropneumonia. *Aust. Vet. J.*, 1962, **98**, 401-405.
30. TURNER (A. W.). — Detection of *Mycoplasma mycoides* antigen and antibody by means of precipitin test, as aids to diagnosis of bovine contagious pleuropneumonia. *Aust. Vet. J.*, 1962, **38**, 335-337.
31. ZINSSER (H.) et PARKER (T.). — Observation on a substance in immune horse serum which interferes with alexin fixation. *J. Immun.*, 1928, **8**, 151-161.