

WORLD HEALTH
ORGANIZATION

ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ



→ Ser/Inf/67.6
WHO/Bilh/67.63

FRANCAIS SEULEMENT

ETUDES IMMUNO-PATHOLOGIQUES DE LA BILHARZIOSE

Microméthode de fixation du complément

par

R. Pautrizel¹

Sommaire

	<u>Page</u>
1. Verrerie et appareillage	2
2. Réactifs	2
3. Echelle d'hémolyse	4
4. Titrage du sérum hémolytique	5
5. Titrage du complément	6
6. Réactions	8
7. Conclusion	9
Figure	

¹ Chaire d'immunologie et de biologie parasitaire, Faculté de médecine et de Pharmacie, Université de Bordeaux, France

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

Cette microméthode est inspirée de celle indiquée par le Groupe scientifique des recherches sur la bilharziose concernant le "diagnostic immunobiologique de la bilharziose" réuni par l'OMS, à Genève, du 7 au 12 août 1961.¹

Elle a été mise au point dans le but de diminuer la consommation des antigènes dont le prix de revient est très élevé. Ceci a été obtenu en réduisant au 1/5 les quantités des réactifs introduites dans la réaction, tandis que les pré-titrages, où l'antigène n'intervient pas, sont effectués à doses normales.

1. VERRERIE ET APPAREILLAGE

La réaction proprement dite s'effectue en microtube (diamètre 5 à 6 mm; hauteur 50 mm), alors que les pré-titrages s'effectuent en tubes à hémolyse. Ceci nécessite des portoirs adaptés aux deux types de tube, pouvant aller au bain-marie, ainsi qu'un équipement spécial de centrifugeuse pour microtubes.

2. REACTIFS

2.1 Soluté physiologique

Tous les réactifs sont dilués dans un tampon isotonique préparé extemporanément à partir d'une solution mère.

Solution mère tamponnée concentrée 10 fois :

NaCl	75 g
MgCl ₂ 6H ₂ O (2,083 M)	2,4 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O (0,625 M)	2,4 ml
Tri-éthanol-amine	28 ml
Hcl normal	180 ml
Eau bi-distillée q.s.p.	1000

Tampon isotonique : diluer la solution mère au 1/10 en eau bi-distillée, au moment de l'emploi.

¹ Org. mond. Santé (1961) Rapport au Directeur général, document mimeographié WHO/PA/166.61. Voir aussi Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn., 1967, 349, 62-73.

2.2 Hématies de mouton

Le sang de mouton est recueilli aseptiquement sur citrate de sodium à 38 pour 1000. Le citrate est stérilisé au préalable à l'autoclave est utilisé à la dose de 480 ml de citrate pour 400 ml de sang.

Au moment de l'emploi, le sang est centrifugé. Le culot est lavé trois fois en tampon isotonique. Le culot globulaire est ensuite remis en suspension à 3 % dans le tampon isotonique.

La suspension est standardisée à l'aide d'un photomètre. Nous utilisons le photomètre Electro-Synthèse, modèle Junior, avec écran No 3. Pour la mesure photométrique, la suspension est diluée au 1/6 en eau distillée, puis placée dans le tube à essai calibré de l'appareil, et dans ces conditions doit donner la graduation 100. Dans le cas contraire, la suspension approximativement à 3 % est ajustée en diluant en conséquence, en tampon isotonique. Si le chiffre trouvé est $100 + x$, à 100 ml de suspension, ajouter x ml de tampon isotonique.

2.3 Sérum hémolytique

Le sérum hémolytique est dilué au moment de l'emploi, en tampon isotonique. Le taux de dilution est déterminé une fois pour toutes pour chaque lot de sérum hémolytique, par un titrage.

2.4 Complément

Le complément utilisé est soit du sérum de cobaye lyophilisé, soit du sérum de cobaye frais. Une dilution préalable du 1/15 en tampon isotonique sert à la fois au titrage du complément du jour et à la réaction.

2.5 Antigène

Les antigènes ne doivent présenter aucun pouvoir anticomplémentaire, à la dilution utilisée. Cette dilution optimale est donnée par "un titrage d'antigène" qui permet d'utiliser la réaction à son maximum de sensibilité. Ce titrage consiste à déterminer la plus petite quantité d'antigène qui indique, avec un sérum positif donné, le titre le plus élevé pour ce sérum.

2.6 Sérum à tester

Les sérums sont testés dès le lendemain du prélèvement ou, si nécessaire, ils sont conservés par congélation à basse température (-25°, ou -70°), mais ils ne devront alors subir qu'une seule congélation - décongélation. Au moment de l'emploi, les sérums sont inactivés, en les maintenant 1/2 heure à 56°.

3. ECHELLE D'HEMOLYSE

Cette échelle d'hémolyse sera faite chaque jour et servira à la lecture des titrages puis de la réaction.

3.1 Echelle permettant la lecture des titrages

Dans une série de tubes à hémolyse de calibres identiques, on répartit à la pipette graduée au 1/100, suivant le tableau I, une solution d'hémoglobine et une suspension d'hématies (G.R.) de mouton.

1) Solution d'hémoglobine :

- G.R. 3 % 2 ml
- Eau bi-distillée 7,2
- Tampon concentré 10 fois 0,8

2) Suspension d'hématies :

- G.R. 3 % 2 ml
- Tampon isotonique 8 ml

TABEAU I

Echelle d'hémolyse															
% d'hémolyse	0	10	20	30	35	40	45	50	55	60	65	70	80	90	100
Sol. 1	0	0,10	0,20	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,80	0,90	1
Susp. 2	1	0,90	0,80	0,70	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,20	0,10	0
Tampon froid	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Centrifuger - Décantier															

3.2 Echelle permettant la lecture de la réaction

Lorsque la lecture des titrages est terminée, le contenu de chaque tube à hémolyse est transvasé dans une série de microtubes. Cette nouvelle échelle servira à la lecture des réactions.

4. TITRAGE DU SERUM HEMOLYTIQUE

Chaque nouveau lot de sérum hémolytique est titré, une fois pour toutes, de la façon suivante :

Dans un premier temps, on recherche la plus petite quantité de complément capable d'hémolyser 50 % des hématies sensibilisées par égale quantité de sérum hémolytique au 1/500 (tableau II).

TABLEAU II

Titration du sérum hémolytique (1er temps)						
Dilution de K.	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
K. dilué	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
G.R. sensibilisés*	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Bain-marie 37° - 30 minutes						
Tampon froid	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Centrifuger. Etablir la courbe d'hémolyse par comparaison avec l'échelle d'hémolyse. En déduire l'unité de complément 50 %.						

* aa G.R. 3 % et S.H. 1/500.

Dans un deuxième temps, on recherche la plus forte dilution de sérum hémolytique qui, utilisée pour sensibiliser un égal volume d'hématies, provoque la lyse de 50 % de ces hématies, en présence de l'unité de complément déterminée précédemment (tableau III).

TABLEAU III

Titration du sérum hémolytique (2ème temps)						
Dilution S.H.	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000
K (1 unité 50 %)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
G.R. sensibilisés*	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Bain-marie 37° - 30 minutes						
Tampon froid	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Centrifuger. Déterminer le % d'hémolyse obtenu pour chaque dilution. En déduire le titre du sérum hémolytique.						

* aa G.R. 3 % et S.H. aux diverses dilutions.

L'évaluation du pourcentage d'hémolyse est, dans chaque cas, effectuée par rapport à l'échelle d'hémolyse précédemment décrite. Le titre du sérum hémolytique est donné par l'avant-dernière dilution de ce sérum qui donne encore 50 % d'hémolyse.

Le sérum hémolytique que nous utilisons est généralement dilué au 1/2000.

5. TITRAGE DU COMPLEMENT

Le complément est titré chaque jour juste avant la réaction.

Le complément approximativement nécessaire pour le titrage et pour les réactions entreprises ce jour est dilué au 1/15 en tampon isotonique. De cette dilution est prélevée une petite quantité (0,03 ml par exemple) qui est diluée avec

précision au 1/10. Ce complément au 1/150 sert à faire le titrage du jour, tandis que la dilution mère au 1/15 est conservée à 4° jusqu'au moment où sera entreprise la réaction proprement dite.

La répartition des réactifs est effectuée à la pipette graduée au 1/100, dans des tubes à hémolyse, suivant le tableau IV.

TABIEAU IV

Titration du complément										
K 1/150	0,28	0,26	0,24	0,22	0,20	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10
Tampon	0,32	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50
G.R. sensibilisés	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Eau-marie 37°-38° 30 minutes										
Tampon froid	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Centrifuger. - Etablir la courbe d'hémolyse par comparaison avec l'échelle d'hémolyse. En déduire l'unité de complément 50 %.										

5.1 Calcul de la dilution du complément à utiliser.

Le pourcentage d'hémolyse de chaque tube est obtenu par comparaison avec l'échelle d'hémolyse. La courbe correspondante, tracée sur un papier millimétré, permet de déterminer graphiquement, avec précision, la quantité de complément correspondant à l'unité, 50 %. En pratique, on pourra réduire cette courbe aux trois tubes dont le pourcentage d'hémolyse est voisin de 50 %.

De la quantité de complément au 1/150 correspondant à 1 unité 50 %, on déduira la dilution de complément à effectuer pour avoir 5 unités 50 % dans un volume de 0,2 ml. Cette dilution de complément, effectuée à partir de la solution mère, au 1/15, sera utilisée pour la réaction.





