



INDEXED

SEROLOGIE DES MALADIES PARASITAIRES
CONSERVATION DE SERUMS NORMALISES

par

B. G. Woodhead & D. S. Ridley
Hospital for Tropical Diseases
University College Hospital
Londres, Royaume-Uni



Table des matières

	<u>Pages</u>
1. Introduction	2
2. Méthodes	2
2.1 Sérums	2
2.2 Conservation dans l'azote liquide	2
2.3 Lyophilisation	2
2.4 Dessiccation sur papier-filtre	2
3. Résultats	3
3.1 Effet de la température sur la conservation du sérum	3
3.2 Effet de la congélation et de la fusion	3
3.3 Conservation par lyophilisation	3
3.4 Conservation par dessiccation sur papier-filtre	3
4. Discussion	4
Tableaux	5
Résumé	8
Remerciements	8
Références bibliographiques	8

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.

1. INTRODUCTION

Il est essentiel que tout laboratoire sérologique soit à même de constituer une banque d'antisérums utilisables comme témoins dans les épreuves de pratique quotidienne, ainsi que pour les titrages et pour l'évaluation de nouveaux antigènes et de nouvelles techniques. L'idéal serait que ces produits témoins puissent être conservés pendant de longues périodes sans baisse de titre et qu'ils soient d'un accès facile. Les méthodes actuelles de conservation ont normalement pour principe la réfrigération, en congélateur de -20° à -70°C , dans des récipients refroidis à la neige carbonique à -80°C ou à l'azote liquide à -196°C . Toutes ces formules présentent des inconvénients; aucune notamment ne convient pour le transport. La lyophilisation peut remplacer la conservation à basse température, mais son usage n'est pas généralisé. On trouvera dans le présent document des indications sur divers aspects des problèmes de la conservation et du transport des sérums.

2. METHODES

2.1 Sérums

Tous les sérums utilisés lors des essais avaient été obtenus récemment et dans des conditions d'aseptie. On n'y avait pas ajouté de produit conservateur. Il s'agissait ou bien de témoins positifs connus à utiliser pour l'étude de la filariose ou de la schistosomiase ou bien de sérums en cours d'épreuve pour la recherche des anticorps correspondants. On les a soumis à l'épreuve de fixation du complément (FC), selon une technique adaptée de la méthode LBCF (United States Public Health Service, 1965).

2.2 Conservation dans l'azote liquide

Les échantillons ont toujours été congelés brutalement par immersion directe. Avant utilisation, on les faisait dégeler rapidement au bain-marie à 56°C .

2.3 Lyophilisation

a) On a utilisé à cet effet un lyophilisateur par centrifugation Edwards (modèle 5 PS). On a étudié sur douze sérums l'effet de la lyophilisation sans conservation. Après dessiccation, ces sérums ont été laissés dans un récipient non étanche, à 4°C , jusqu'au lendemain où ils ont de nouveau été éprouvés. Après dessiccation initiale, les échantillons de deux sérums destinés à des essais à long terme ont été laissés une nuit sur un déshydratant puis mis dans des ampoules de verre scellées sous vide. On les a ensuite conservés à la température ambiante. Avant les épreuves, on a ramené les échantillons à leur volume primitif en utilisant de l'eau distillée.

b) Trente-neuf sérums provenant de malades atteints de schistosomiase cliniquement confirmée ont été reçus d'Afrique, lyophilisés et par paires. Un sérum de chaque paire a été reconstitué et éprouvé à l'arrivée, puis conservé dans l'azote liquide, l'autre étant conservé à l'état sec à -20°C . Des essais parallèles ont été effectués trois mois plus tard.

2.4 Dessiccation sur papier-filtre

Après imprégnation par 0,2 ml de sérum, on a laissé des disques de papier-filtre Whatman N° 1 sécher dans les conditions atmosphériques; après conservation sur chlorure de calcium ou dans des enveloppes de plastique ou de papier pendant trois à quatre semaines à la température ambiante, on les a élués dans 2 ml de soluté salin tamponné au véronal à pH 7,2.

3. RESULTATS

3.1 Effet de la température sur la conservation du sérum

Le tableau 1 indique l'effet du stockage à différentes températures sur des fractions provenant d'un mélange de sérums positifs connus. Le résultat de l'épreuve FC est exprimé par la mention "négatif" ou par l'inverse du titre d'anticorps donnant une FC de 50 %. Chaque fraction n'a été éprouvée qu'une fois, puis éliminée, pour prévenir toute influence possible de congélations et de fusions répétées. Les résultats montrent que les antisérums témoins peuvent être conservés sans diminution sensible du titre jusqu'à six semaines à 4°C, trois mois à -20°C et près de quatre ans à -196°C. Nous avons toutefois observé que des échantillons de sérum prélevés à la partie supérieure du récipient accusaient après plusieurs années une diminution du titre d'anticorps, alors que les échantillons du même sérum prélevés au fond du récipient conservaient leur titre initial.

3.2 Effet de la congélation et de la fusion

L'effet de congélations et de fusions répétées est indiqué au tableau 2. Des fractions d'un mélange de sérums frais ont été conservées soit à -20°, soit à -196°C. On les a fait dégeler de 1 à 12 fois en les laissant chaque fois dans cet état soit une demi-heure, soit toute une nuit. Entre deux opérations, les échantillons restaient gelés au moins vingt-quatre heures. L'expérience a duré cinq semaines et pendant ce laps de temps on n'a observé aucune détérioration due au stockage. Il y a eu diminution du titre dans chaque cas, cette diminution étant le moins marquée lorsque la période passée en état de dégel était plus courte et le stockage fait à -196°C. Cette conclusion a été confirmée par une nouvelle expérience au cours de laquelle un échantillon de sérum était dégelé en vue du prélèvement d'une unique fraction, puis immédiatement recongelé. Dans ce cas, il n'y a eu aucune diminution du titre d'anticorps, en dépit de dix opérations successives de fusion et de congélation.

L'effet de congélations et de fusions répétées a été également étudié sur un lot de sérums précédemment conservé pendant trois ans à -196°C. Tous les sérums du lot ont accusé un affaiblissement du titre d'anticorps, mais il n'a pas été plus marqué que dans le cas de sérums frais.

3.3 Conservation par lyophilisation

Douze sérums ont été éprouvés immédiatement après lyophilisation; on a observé dans un tube une diminution du titre d'anticorps dans le cas de quatre sérums, alors que pour les huit autres, il n'y avait aucun changement. Le tableau 3 montre les résultats préliminaires obtenus en conservant les mêmes sérums à l'état lyophilisé ou à -196°C. Dans les deux cas, on n'a observé aucune diminution sensible de titre au bout de huit mois.

Vingt-huit sérums sur les 39 qui ont été reçus d'Afrique étaient positifs à leur arrivée. Au bout de trois mois, ceux conservés dans l'azote comprenaient 17 sérums positifs, 18 négatifs et 4 anticomplémentaires, tandis que les sérums lyophilisés comportaient 20 spécimens positifs, 18 négatifs et 1 anticomplémentaire. Seuls des sérums faiblement positifs à l'origine (5+ ou 10+) étaient devenus négatifs.

3.4 Conservation par dessiccation sur papier-filtre

Le tableau 4 indique l'effet de cette méthode de conservation au bout de quatre semaines, les échantillons étant placés dans un dessiccateur sur du chlorure de calcium. Il y a diminution sensible du titre d'anticorps. On a également comparé les effets du stockage dans des enveloppes de plastique étanches et dans des enveloppes en papier. Après trois semaines, la détérioration des échantillons conservés dans les enveloppes de plastique est

analogue à celle des échantillons placés dans le dessiccateur. Par contre, la diminution du titre est plus marquée dans le cas des échantillons placés dans des enveloppes de papier perméables. Il n'y a pas de diminution du titre d'anticorps lorsque l'élution des sérums à partir du papier-filtre est faite immédiatement après dessiccation. Il semble donc que la dessiccation n'affecte pas le titre, mais qu'il y ait diminution par la suite, la dégradation pouvant être réduite par la conservation à sec. Sur douze sérums qui nous ont été envoyés de Ceylan, à l'état desséché, dans des enveloppes de plastique étanche, en vue d'une épreuve FC pour la recherche des filaires, 8 étaient négatifs, 3 positifs et 1 anticomplémentaire.

4. DISCUSSION

Les problèmes auxquels on est confronté quand on veut entretenir une banque de sérums et transporter des sérums témoins ou des sérums d'épreuve d'un laboratoire à l'autre, tiennent à trois faits :

- 1) le sérum ne peut pas être conservé par réfrigération pendant des périodes prolongées à moins que la température ne soit maintenue au-dessous du point d'eutexie de -60°C (Greaves, 1954);
- 2) les méthodes de conservation à très basse température sont assez compliquées et coûteuses;
- 3) puisque des opérations répétées de congélation et de fusion causent une diminution de titre, il est souhaitable que les sérums soient conservés sous forme d'échantillons d'un volume adapté à des épreuves individuelles. La méthode de conservation par l'azote liquide n'est pas appropriée à cet égard, en raison de la capacité réduite des récipients utilisés.

Ces problèmes sont bien connus, mais il semble qu'il n'existe guère de publications à ce sujet, et dans beaucoup de laboratoires on continue à stocker les sérums à -20°C .

Les résultats de la présente étude confirment qu'il est impossible de conserver des sérums sans une sensible diminution du titre FC, sauf à de très basses températures, encore qu'un réfrigérateur ordinaire puisse convenir pour une durée n'excédant pas quatre semaines. Un congélateur fonctionnant à -20°C ne donne pas de résultats sensiblement meilleurs. Les résultats obtenus en conservant les sérums dans l'azote liquide ont été excellents pour des périodes allant jusqu'à trois ans et demi, mais il semble que les sérums stockés en haut du récipient se détériorent s'il est ouvert assez fréquemment ou si on laisse descendre le niveau du liquide. Il faut donc compenser les pertes par évaporation fréquemment, ce qui est un inconvénient. On a encore observé que s'il faut recongeler un sérum après fusion, il importe d'opérer sans attendre, auquel cas il n'y a pratiquement aucune détérioration.

La lyophilisation des sérums paraît être à beaucoup d'égards une méthode de choix. A condition d'être placés dans des récipients scellés sous vide ou de se trouver dans un état de dessiccation complète, les sérums peuvent être conservés à la température ambiante pendant des périodes prolongées sans détérioration. Il conviendrait d'étudier cette méthode plus à fond.

L'expérience faite par d'autres chercheurs (Pellegrino & Brener, 1958) est confirmée : des sérums desséchés sur papier buvard peuvent être envoyés par la poste en vue d'épreuves de FC. Mais s'ils ne sont pas maintenus en état de dessiccation il y a détérioration rapide, perte d'activité spécifique et apparition de sérums anticomplémentaires. Néanmoins, dans les climats chauds, cette méthode est préférable à l'expédition des sérums à l'état frais.

TABLEAU 1. EFFET DU STOCKAGE A DIVERSES TEMPERATURES SUR LE TITRE DES SERUMS

Période	Température			
	37°C	4°C	-20°C	-196°C
0	160	160	160	160
0,5 semaine	160	*	*	160
1 "	40	*	*	160
1,5 "	40	*	*	160
2 "	10	*	*	160
2,5 "	5	160	*	160
4 "	Négatif	80	*	160
6,5 "		20	*	160
9,5 "		Négatif	40	160
11,5 "			20	*
6 mois			Négatif	160
10 "				160
3,5 ans				160
* Non testé.				

TABLEAU 2. EFFET DE CONGELATIONS ET DE FUSIONS REPETÉES

Titre* des sérums conservés à -196°C (dans l'azote liquide)			Titre* des sérums conservés à -20°C		
Nombre de fusions	Durée de l'état de fusion		Nombre de fusions	Durée de l'état de fusion	
	1/2 heure	une nuit		1/2 heure	une nuit
1	80	80	1	40	40
2	80	40	2	40	20
3	80	20	3	20	40
4	80	20	4	20	20
5	80	20	5	20	20
6	80	20	6	20	20
7	40	20	7	20	20
8	20	20	8	20	20
9	20	20	9	10	20
10	20	20	10	10	20
11	20	20	11		
12	20	20	12		

* Titre initial : 80.

TABLEAU 3. EFFET DE LA LYOPHILISATION SUR LE TITRE DE SÉRUMS SCÉLÉS SOUS VIDE
PUIS CONSERVÉS A LA TEMPERATURE AMBIANTE

Période	Titre des sérums lyophilisés		Titre des sérums conservés à -196°C	
	Sérum A	Sérum B	Sérum A	Sérum B
0	40	20	40	20
4 mois	20	20	40	20
8 mois	20	20	20	20

TABLEAU 4. DIMINUTION DU TITRE DE SÉRUMS DESSECHÉS SUR PAPIER-FILTRE
ET CONSERVÉS DANS UN DESSICATEUR

Sérum éprouvé	Titre au moment de la dessiccation	Titre après 4 semaines
1	160	40
2	80	40
3	80	40
4	5	5
5	-	-
6	20	10
7	40	10
8	20	10
9	80	40
10	10	5

RESUME

Le problème de la conservation de sérums témoins en vue de tests immunologiques a été étudié avec les résultats ci-après.

Des sérums n'ayant subi aucun traitement particulier ont été conservés sans perte sensible du titre FC pendant 4 semaines à 4°C, 3 mois à -20°C et 3 ans et demi (ou plus) à -196°C.

Les sérums ont pu être dégelés environ 7 fois sans diminution sensible du titre, à condition que la recongélation soit effectuée dans un délai de 1/2 heure au maximum; par contre, il n'a été possible de les dégeler que 2 ou 3 fois en les laissant en état de fusion pendant 18 heures.

La lyophilisation est une méthode de conservation et de transport qui paraît appelée à beaucoup d'avenir.

Les sérums desséchés sur papier-filtre se sont détériorés rapidement; néanmoins, la méthode, si elle ne paraît pas convenir pour le stockage, peut être utile pour l'expédition par la poste.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. Lionel Ponnuswamy de sa précieuse collaboration technique, et le Dr C. Ripert, qui nous a fourni des sérums lyophilisés provenant d'Afrique. L'Organisation mondiale de la Santé a accordé une subvention pour le financement de cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Greaves, R. I. N. (1954) In: Haris, R. J. C., éd., Biological Applications of Freezing and Drying, New York, Academic Press, pp. 87-127

Pellegrino, J. & Brener, Z. (1958) Rev. bras. Malar., 10, 39-44

United States Public Health Service (1965) Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. Part I. Laboratory Branch Complement Fixation Method, Public Health Monograph N° 74