

SERO-AGGLUTINATION :

BRUCELLOSE

R. GAUMONT *, Danièle TRAP * et G. GAYOT *

* Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires
22 rue Pierre Curie , B. P. 67 - 94703 Maisons-Alfort Cedex

RESUME

L'envoi, en même temps que les sérums faisant l'objet de l'essai, d'un protocole détaillé et d'une fiche réponse où seront précisés les réactifs employés et les conditions exactes de réalisation de l'épreuve est indispensable.

Il y a intérêt à répéter l'épreuve trois ou quatre jours de suite et à l'effectuer simultanément sur un sérum de référence.

Cet exposé repose sur les observations effectuées à l'occasion de trois essais comparatifs sur le diagnostic sérologique de la Brucellose, organisés par le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires et réalisés avec la coopération des Directeurs des Laboratoires Départementaux d'Analyses Vétérinaires.

Ces observations sont, les unes d'ordre pratique, les autres d'ordre méthodologique.

I - OBSERVATIONS D'ORDRE PRATIQUE

- Origine des sérums : ils provenaient de bovins naturellement infectés. L'emploi de sérums d'animaux vaccinés ou récemment infectés a été évité de peur qu'ils ne soient riches en IgM moins stables que les IgG.

- Traitement des sérums : ils avaient été stérilisés par filtration. Lors des deux premiers essais, ils avaient été ultérieurement lyophilisés ; certaines différences dans les résultats observées d'un laboratoire à l'autre ayant été imputées au fait qu'ils n'avaient pas été repris exactement dans les mêmes conditions, ils ne l'ont pas été dans le troisième.

- Codage des sérums : lors du dernier essai, 4 sérums ont été adressés à 88 Laboratoires ; 352 étiquettes ont été numérotées

de 1 à 352 puis tirées au sort pour être collées sur chaque ampoule.

- Délai maximal de réponse : lors du dernier essai il a été demandé que les résultats parviennent au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires dans le mois suivant l'envoi des sérums.

Modes de conditionnement et d'envoi des sérums : ils ont été répartis dans des flacons à pénicilline (5ml). Ceux-ci ont été expédiés dans de simples enveloppes matelassées lorsque les sérums étaient lyophilisés et dans des boîtes métalliques lorsqu'ils ne l'étaient pas. Les envois ont été effectués en dehors des périodes de vacances et de travail intense, prophylaxie de la brucellose en zone charolaise par exemple.

Envoi d'un protocole détaillé et de recommandations particulières concernant l'épreuve : d'une façon générale, il est indispensable. En ce qui concerne la séro-agglutination brucellique et le diagnostic sérologique de la Brucellose en général, cette question ne devrait toutefois pas se poser, les techniques à employer ayant été décrites dans l'annexe de l'arrêté ministériel du 3 juin 1966 relative à l'utilisation des antigènes brucelliques.

Il est nécessaire, en revanche, d'envoyer un modèle de fiche réponse indiquant :

- la date d'envoi et la date de réception des sérums,
- les réactifs employés, en particulier l'antigène (nom du fabricant, numéro du lot, date de péremption),
- les conditions de réalisation de l'épreuve (température et temps d'incubation).

Des recommandations particulières peuvent être effectuées pour la séro-agglutination brucellique au sujet du réglage des machines.

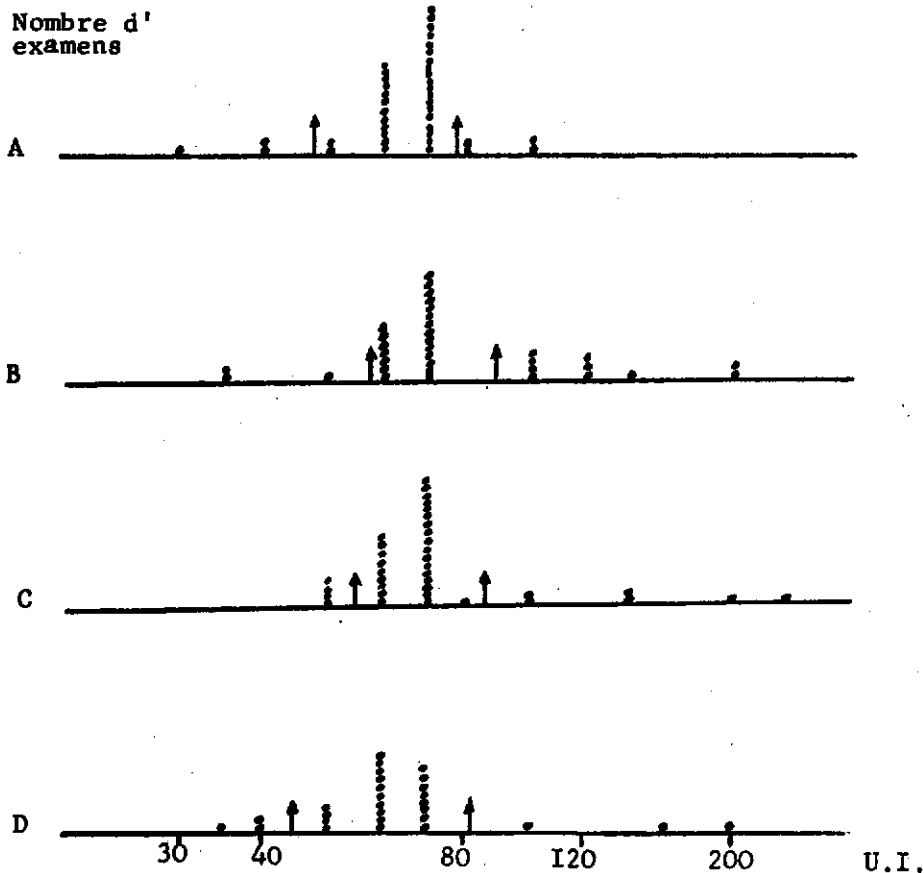
Analyse des résultats obtenus : lorsque plusieurs antigènes ont été utilisés lors des essais, il y a intérêt à effectuer cette analyse antigène par antigène.

Lorsque l'on utilise les machines, les dilutions sériques finales vont de 1/10 à 1/160. Il est alors souhaitable que le titre en Unités Internationales (U.I.) des sérums soumis à l'essai soit tel que, compte tenu des différences observées d'un laboratoire à l'autre, les taux d'agglutination obtenus soient compris entre + à 1/10 (13 U.I.) et +++ à 1/160 (280 U.I.) ce qui permet de calculer la moyenne géométrique des titres et de déterminer les limites de confiance des réponses pour un sérum et un antigène donnés, comme il est indiqué dans le tableau suivant.

Tableau I : Résultats obtenus par les différents laboratoires en séro-agglutination avec un sérum et 4 antigènes : titres en unités internationales, moyennes géométriques de ces titres et limites de confiance.

Antigènes employés	Résultats en U. I.													Total	Moyenne géométrique des titres obtenus par les Laboratoires	Limites de confiance pour 95 % des réponses	
	30	35	40	50	60	70	80	100	120	140	160	200	240				
A	1		2	2	12	19	2	2							40	64,12	48 à 79
B		2		1	7	14		4	3	1			2		34	76,52	58 à 89
C				4	9	17	1	2		2			1	1	37	72,76	55 à 86
D		1	2	4	10	8		1				1	1		28	64,09	44 à 81
Non indiqué			3	6	2	3	1	1	2	1			2		21		
TOTAL	1	3	7	17	40	61	4	10	5	4	1	6	1	160			

Il est possible de donner une représentation graphique des résultats en indiquant pour chaque sérum et éventuellement pour chaque antigène en abscisse les logarithmes des titres U.I. et en ordonnées, le nombre d'épreuves ayant donné un titre déterminé. La distribution s'effectue selon une courbe de Gauss. Les limites de confiance sont représentées par des flèches.



- Difficultés rencontrées lors des essais : elles concernent essentiellement la stabilité du titre des sérums.

- Améliorations obtenues : elles résultent surtout de l'envoi d'une fiche réponse précisant les réactifs employés et les conditions dans lesquelles l'épreuve a réellement été effectuée.

II - OBSERVATIONS D'ORDRE METHODOLOGIQUE

Choix des sérums et constitution du lot:

Il serait possible de n'envoyer qu'un seul sérum de titre moyen mais il est préférable d'envoyer plusieurs échantillons :

- un sérum négatif,
- un sérum de titre limite (30 U.I. environ)
- un ou mieux deux sérums nettement positifs.

Le volume des échantillons à envoyer dépend du nombre d'épreuves que l'on souhaite réaliser avec chacun d'eux. L'expérience prouve que, lorsque l'on répète l'épreuve le même jour sur un échantillon déterminé, en opérant correctement on obtient toujours le même résultat. Cette répétition effectuée le même jour ne présente donc pas beaucoup d'intérêt. En revanche, il est intéressant de la répéter trois ou quatre jours de suite afin de déterminer l'influence éventuelle du facteur temps sur le titre du sérum une fois le flacon ouvert. Il est alors utile d'employer simultanément un sérum de référence pour comparer l'évolution des titres.

Critères de jugement des résultats.

Les titres compris entre les limites de confiance pour 95 % des réponses peuvent être considérés comme "normaux" ; ceux qui sont en dehors de ces limites de confiance doivent être considérés comme "anormaux" et par conséquent non satisfaisants.

Détermination du seuil de positivité à retenir.

Il faut disposer de sérums provenant :

- les uns d'animaux indemnes appartenant à des cheptels indemnes,
- les autres d'animaux à différents stades de l'infection et d'animaux vaccinés.

On effectue alors deux histogrammes à partir des résultats obtenus avec ces deux séries de sérums, les titres étant portés en abscisse et le nombre de sérums ayant fourni ce titre en ordonnée.

Le seuil de positivité est déterminé en superposant les deux histogrammes : il correspond au titre pour lequel le chevauchement est le plus faible. Si on l'abaisse, on augmente la sensibilité ; si on l'élève on augmente la spécificité. On peut également définir une zone de suspicion correspondant aux titres pour lesquels on observe un chevauchement.

Préparation d'un sérum de référence : comme il a été précédemment indiqué, pour obtenir un sérum de titre stable, il convient de s'adresser à des animaux présentant une infection chronique et non à des animaux récemment infectés ou vaccinés.

Si le titre du sérum est assez élevé ($++$ à $1/80$ ou plus), il se maintient généralement bien après lyophilisation. En revanche, si on dilue un tel sérum pour obtenir un sérum de titre limite ($++$ à $1/20$ soit 30 U. I. avec l'antigène que nous utilisons), ce qui est pratique pour l'emploi, l'expérience prouve que son titre peut baisser assez rapidement.

Remerciements :

Nous sommes heureux de remercier ici tous les Directeurs des Laboratoires Départementaux d'Analyses Vétérinaires qui ont participé aux essais comparatifs sur le diagnostic sérologique de la Brucellose, ainsi que Monsieur le Professeur TOMA, le Docteur DESMETTRE et Monsieur TIXIER avec lesquels nous avons discuté de cette question et les personnes du Service des Maladies de la Reproduction qui nous ont apporté leur aide technique dans cette étude, en particulier Madame CAU.

DISCUSSION

Question. Les antigènes utilisés sont-ils standardisés ?

Réponse. Oui, mais chaque antigène est standardisé par rapport à un sérum particulier ; comme les proportions relatives des diverses classes d'anticorps varient d'un sérum à l'autre, il est normal que les antigènes réagissent différemment avec des sérums autres que le sérum étalon spécifique de l'antigène, sérum dont la composition propre est unique.

Q. Y-a-t-il un contrôle de la qualité des antigènes produits dans le commerce ? Peut-on proposer des modifications aux producteurs pour qu'ils homogénéisent leurs produits ?

R. Il existe une méthode officielle de préparation des antigènes. Mais on ne peut contrôler que le produit fini qui, en général, est satisfaisant. Cependant, les phénomènes de zone observés avec certains lots, laissent à penser que dans ce cas l'antigène ne serait pas formolé comme le prévoit la réglementation, mais phénolé, ce qui est interdit. Encore faut-il pouvoir le prouver, ce qui n'est pas aisé.

Q. Si l'on veut standardiser la méthode, il faut absolument des outils identiques. Initialement, il avait été envisagé de n'utiliser qu'un seul antigène fabriqué pour un seul fournisseur. Mais ceci n'a pas été retenu pour éviter tout monopole, et laisser la libre concurrence s'exercer.

Maintenant, il faut que chacun respecte la réglementation, emploie du formol, pas du phénol. D'autre part, il semble paradoxal de faire ces contrôles en dehors de la saison de prophylaxie. C'est justement si les chaînes d'analyse sont traitées en routine, normalement, sans précaution particulière, que l'on pourra juger la valeur des laboratoires départementaux.

- Q. Que faire puisque les sérums dits de référence ne titrent plus la valeur prévue ?
- R. En fait, la baisse du taux d'anticorps a été progressive, sur 4 mois environ. Il faut reprendre le sérum lyophilisé non plus dans 1 ml d'eau distillée mais dans 0,8 ml. Une lettre circulaire adressée aux directeurs des laboratoires va bientôt donner cette information à tous.
- Q. La fabrication du sérum de référence a dû coûter fort cher. Les contrôles portent essentiellement sur le seuil de sensibilité de la méthode telle qu'elle apparaît dans les divers laboratoires. Pourquoi ne pas utiliser deux sérums de référence : un faible, un fort ?

A propos de l'I.B.R. : pourquoi, en routine, un sérum fortement positif lors d'un premier examen peut-il devenir négatif 2 ou 3 jours plus tard, lors d'un deuxième examen (dans le même laboratoire, avec le même personnel, le même matériel, la même technique) ? Et on accuse toujours le laboratoire de se tromper !

- R. Le sérum de référence a été payé par les caisses de l'Etat...
- Q. L'utilisation d'un sérum de référence de titre faible s'avère difficile. Pourrait-on se servir de deux sérums positifs en plus du sérum négatif témoin à chaque examen ?
- R. Diluer un sérum positif avec un sérum négatif peut entraîner des inhibitions d'anticorps qui font chuter le titre prévu du sérum dilué.
- Q. A propos de l'époque de l'année où se font les contrôles de qualité. Si le travail est effectué dans le calme, il sera certainement mieux fait. Peut-être vaut-il mieux se "hâter lentement" que réaliser ces examens dans l'affolement généralisé de la période des prophylaxies.