

TECHNIQUE ACTUELLE DE LA REACTION DES MICROPRECIPITINES

PAR

E. ARJONA, C. JIMÉNEZ DÍAZ, J. M. SEGOVIA et A. ORTEGA
Madrid

Dans des travaux antérieurs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), nous avons analysé les bases théoriques ainsi que certains résultats expérimentaux et cliniques, obtenus dans différents processus allergiques, avec notre réaction sérologique des « microprécipitines ». Nous désignons sous ce nom les anticorps démontrables lorsque des particules de collodion s'intercalent dans la réaction « in vitro » de l'antigène en opposition aux « macroprécipitines » ou précipitines habituelles, démontrables simplement par la mise en contact de l'antigène avec le sérum qui les contient.

Nous avons exposé dans ces publications des arguments sur lesquels se base notre opinion que ces deux anticorps diffèrent tant en signification qu'en valeur diagnostique, ainsi le rapport qui existe entre la macroprécipitine, la réagine et les anticorps bloquants. Une grande observation comparée des faits clinique et de l'investigation des microprécipitines nous a convaincu de la spécificité et de l'efficacité diagnostique de la réaction. Les réactions effectuées à diverses reprises chez le même sujet conduisent à des résultats semblables; ceux-ci coïncident fréquemment avec l'observation faite par le malade et, — exjuvantibus — la suppression des aliments positifs détermine l'amélioration ou la suppression des symptômes. Dans notre expérience actuelle, cette méthode est la plus efficace

pour le dépistage des influences allergiques alimentaires; c'est pour cela que la réaction, outre sa valeur conceptuelle, a son utilité pratique.

Cependant, malgré nos publications, la méthode ne s'est pas ouvert un chemin dans la pratique générale; nous attribuons ceci au fait que la lecture en exige un certain entraînement; voilà pourquoi nous avons apporté des modifications destinées à en faciliter la lecture. Dans cette communication, nous voudrions mentionner la technique que nous employons avec les modifications introduites dernièrement, qui rendent la lecture plus facile et qui, donnent une plus grande sensibilité à la réaction.

Zozaya (9) démontra qu'un antigène incomplet (hap-tène) pouvait se compléter en augmentant sa grandeur par l'adsorption de particules de collodion. *Cohen et Weller* (10), pensant que les précipitations « in vitro » dans les maladies allergiques se produisent mais à un degré non visible par les techniques habituelles, eurent l'idée d'employer la méthode de *Zozaya* a fin d'augmenter la grandeur des particules et de rendre visible ainsi le phénomène dans ce genre de précipitation. De cette manière, ils ont obtenue des précipitations positives chez un malade sensible à la colle de poisson, ainsi que chez d'autres atteints de pollinose et qui avaient été traités.

Postérieurement *Goodner* (11) employa aussi la méthode au collodion pour l'étude des agglutinations de virus, en démontrant que l'adsorption préalable de l'antigène au collodion n'était pas nécessaire, et que sa présence au moment où s'effectue la réaction antigène-anticorps suffisait à produire l'agglutination ou la précipitation spécifique du système. Notre technique se base précisément sur ce principe de la rapide adsorption des particules de collodion par le complexe antigène-anticorps au moment même où se produit la réaction. On a démontré (*Goodner*) que si particules de collodion sont ajoutées une heure après, lorsque l'antigène s'est déjà uni à l'anticorps, l'adsorption ne se produit pas et que, par conséquent, la précipitation n'est pas visible.

La technique actuelle diffère en partie seulement de celle qui a été communiquée antérieurement (8). La modification, faite pour faciliter la lecture n'atteint que la façon de préparer les particules du collodion qui actuellement sont teintées avec un colorant; ainsi, le phénomène de la précipitation est bien plus visible.

TECHNIQUE

Les éléments précis pour la réaction sont: A) Collodion, B) Antigènes, et C) Sérum du malade.

COLLODION

À 50 c.c. d'acétone très pur on ajoute quelques cristaux de cristal-violet. On agite légèrement le matras pendant 5 minutes temps suffisant pour saturer presque complètement l'acétone avec le colorant. On élimine les cristaux non dissous. On ajoute à l'acétone coloré, 0,5 gr. de collodion sec. On agite le matras pendant 5 ou 10 minutes et, avec une pipette, on ajoute de l'eau distillée petit à petit, en remuant continuellement le matras d'un mouvement circulaire. A ce moment, il se produit un précipité très fin de particules de collodion en violet. La quantité totale d'eau distillée ajoutée est de 50 c.c. Finalement, on ajoute au tout 300 c.c. de solution de chlorure sodique à 9 pour mille; au bout de 24 heures, toutes les particules de collodion se sont précipitées au fond du matras. On élimine la couche surnatante par simple décantation, et on lave les particules trois fois à l'eau distillée par centrifugation. Les particules ainsi lavées et concentrées, se conservent dans l'eau distillée jusqu'au moment de leur usage. Le jour même où l'on fait la réaction, on dissout les particules de collodion dans sérum physiologique jusqu'à l'obtiendrait 2.000 millions de germes par c.c.: cette turbidité est comprise entre les degrés 6 et 7 de l'échelle turbidimétrique de McFarland.

ANTIGÈNES

La plupart des sérums étudiés appartiennent à des malades soupçonnés de sensibilisations alimentaires, c'est pourquoi la plupart des antigènes employés appartiennent à des aliments. Lorsque nous ne recherchons pas la sensibilisation à un aliment défini, nous employons des extraits de onze aliments standards, choisis parmi ceux qui interviennent le plus fréquemment dans l'alimentation de notre pays: pain, pommes de terre, banane, riz, lait, oeufs, viande de boeuf, de mouton, coquillages, poisson blanc et poisson bleu. Les extraits aqueux se font dans une solution tampon de phosphate avec un pH 7,8. Dans tous ces extraits on détermine l'azote protéique et nous ajoutons la solution afin qu'ils aient tous 10 mg. de protéines par c.c. Les extraits se conservent en ampoules

jusqu'au moment de leur utilisation; on en dissout alors 0,1 c.c. (= 1 mg. de protéines) dans 9,9 c.c. de sérum salé physiologique. Lorsque ce que nous voulons éprouver n'est pas un aliment, mais un autre genre d'antigène, comme par ex. poussières de la demeure de l'asthmatique, poussières de céréales, moisissures, etc. la préparation des extraits est à peu près semblable; on les fait toujours en milieu aqueux, dans la solution tampon au phosphate sus-indiquée.

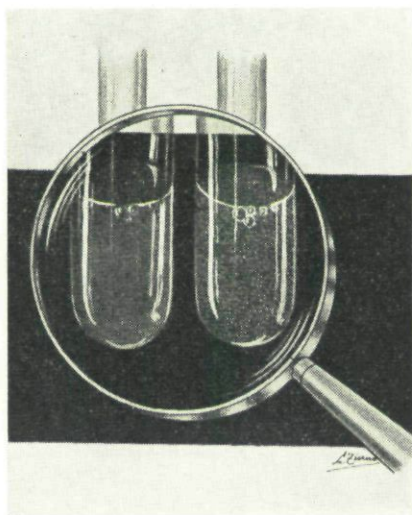
SÉRUM DU MALADE

Il est prélevé à jeûn, en évitant soigneusement l'hémolyse. Les sérums infectés et ceux de malades en phase de menstruation, donnent généralement des précipitations non-spécifiques. Parfois, sans que nous puissions l'attribuer à des causes connues, il se produit des précipitations, également, non-spécifiques, dans certains sérums précipitations visibles aussi dans les tubes de contrôle. Il suffit alors de répéter la détermination en chauffant préalablement le sérum à 56° pendant une demi-heure pour que les microprécipitines étrangères disparaissent et que les microprécipitines spécifiques persistent, puisque, ainsi ne nous l'avons déjà prouvé (4), celles-ci sont thermostables.

METHODE

On place dans une petite échelle une série de tubes de nombre variable, quatre au minimum, par aliment ou antigène à étudier. A partir du premier tube, on fait des dilutions de l'antigène en série, dans 0,5 c.c. de sérum salé physiologique. On ajoute en suite à tous les tubes 0,4 c.c. de la suspension de particules colorées de collodion prêtes à être utilisées et on agite l'échelle. Ensuite, on dépose dans tous les tubes 0,1 c.c. de sérum du malade. On fait des contrôles de l'antigène et du sérum. Après agitation énergique, on laisse l'échelle une heure au près d'un poêle à 37° ou à la température ambiante, puis on la laisse durant 24 heures en glacière. Après ce laps de temps, on fait la lecture.

Pour effectuer celle-ci facilement, nous employons un dispositif par lequel un puissant foyer de lumière arrive obliquement dans le tube à essai placé contre un fond noir. De cette façon, les microprécipitines ressortent clairement; elles se manifestent par une agglutination des particules de collodion nettement différenciables de l'aspect opalin et uniforme du collodion lorsque la réaction est négative (Fig. 1). Si nous plaçons entre lame et lamelle une goutte avec les particules de collodion non agglutinées et une autre avec les particules

*Fig. 1.*

agglutinées, c'est à dire provenant d'un tube à réaction négative et d'un autre à réaction positive, et que nous les examinons au microscope sous faible grossissement, nous voyons très clairement le phénomène. Ainsi dans la Fig. 3, nous observons l'aspect uniforme des particules, indépendantes les unes des autres tandis que, par contre, dans la Fig. 3 correspondant à une réaction positive à l'oeuf, elles apparaissent agglutinées gros grumeaux. Les microprécipitines sont semblables à une réaction de Kahn positive, et le meilleur moyen de les mettre en évidence est de secouer le tube en face du foyer lumineux. A ce moment, le collodion sédimenté au fond du tube, remonte dans la colonne liquide et on peut se rendre compte si les particules sont agglutinées ou non. Nous présentons les précipitations positives suivant quatre degrés (de + à ++++) par tube, selon leur intensité.

La technique modifiée, que nous venons de décrire est celle que nous employons actuellement dans notre Institut. Elle présente sur la précédente l'avantage d'une plus grande simpli-

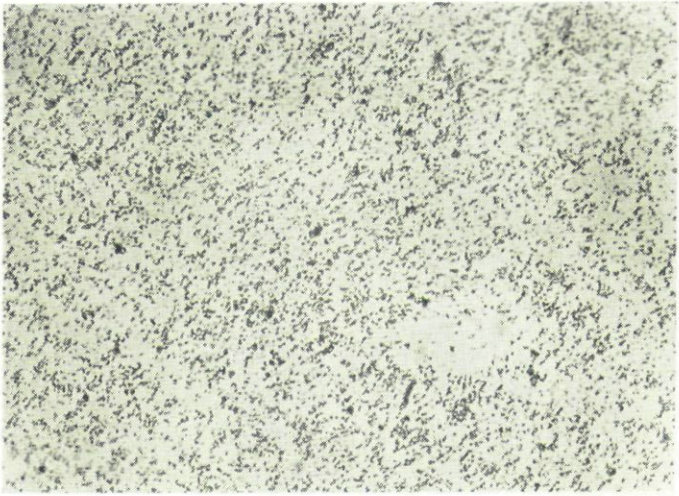


Fig. 2.

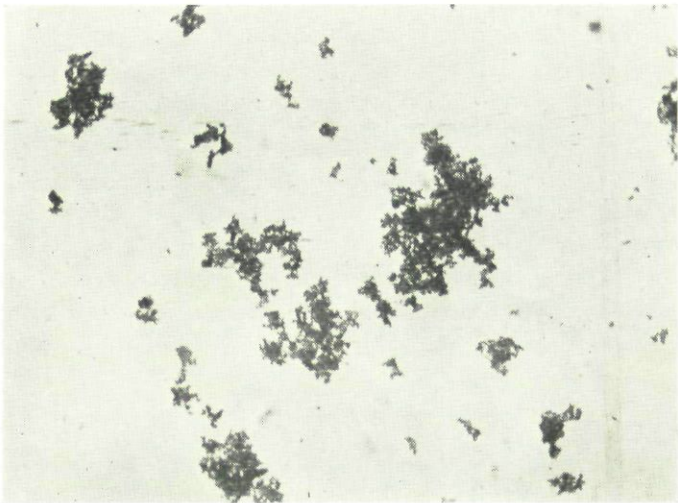


Fig. 3.

No.	Nom	Diagnostic	Antigènes	Collodion	Collodion coloré
4352	C.F.	migraine	viande de boeuf	négatives	++ ++ ++ ++
			pois. blancs	négatives	+ ++ + +
			oeufs	négatives	++ ++ ++ ++
4354	V.E.	asthme	viande de boeuf	négatives	++ ++ ++ ++
4355	P.V.	asthme	mucor	+ + + + +	++ ++ ++ ++
			pous. grenier	+ + + + +	+++ ++ ++ ++
4357	M.R.	migraine	aliments standard	négatives	négatives
4359	J.P.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4360	P.T.	migraine	pain	négatives	+ + + + +
			oeufs	négatives	++ ++ ++ ++
4361	P.L.	migraine	viande de boeuf	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++
4363	R.S.	asthme	aliments standard	négatives	négatives
4364	F.C.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4367	M.N.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4368	F.B.	urticaire	viande de mouton	++ ++ ++ +	++ ++ ++ ++
4382	M.S.	urticaire	pain	+ + + + +	+ + + + +
			pom. de terre	+ + + + +	+ + + + +
			lait	+ + + + +	+ + + + +
4388	L.M.	acné	aliments standard	négatives	négatives
4389	S.F.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4390	M.L.	asthme	viande de boeuf	négatives	++ ++ ++ ++
			lait	négatives	++ ++ ++ ++ ++
4391	J.V.	asthme	aliments standard	négatives	négatives
4392	D.C.	asthme	aliments standard	négatives	négatives
4395	P.F.	eczéma	pois. bleus	+ + + + +	++ ++ ++ ++
4396	R.M.	eczéma	aliments standard	négatives	négatives
4399	C.R.	urticaire	oeufs	+ + + + +	++ ++ ++ ++
4400	M.R.	prurit	aliments standard	négatives	négatives
4401	C.C.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4403	M.C.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4404	A.S.	asthme	cladosporium	négatives	négatives
4408	C.A.	asthme	aspergillus	négatives	négatives
			penicillium	négatives	négatives
4440	C.M.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4441	L.R.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4442	R.M.	asthme	cladosporium	++ ++ ++ +	++ ++ ++ ++
4443	E.P.	urticaire	viande de boeuf	négatives	+ + + + +
			viande de mouton	+ + + + +	++ ++ ++ ++
			oeufs	+ + + + +	+ + + + +
4445	J.H.	asthme	pous. céréales	négatives	négatives
4446	D.V.	urticaire	viande de boeuf	++ ++ ++ +	++ ++ ++ ++
4448	B.M.	asthme	aliments standard	négatives	négatives

No.	Nom	Diagnostic	Antigènes	Collodion	Collodion coloré
4449	L.P.	asthme	pous. domestique	négatives	négatives
4450	J.H.	urticaire	aliments standard	négatives	négatives
4451	M.P.	eczéma	aliments standard	négatives	négatives
5452	A.R.	eczéma	aliments standard	négatives	négatives
4453	I.L.	asthme	tilletia	négatives	négatives
				négatives	négatives
4455	D.S.	eczéma	aliments standard	négatives	négatives
4456	A.G.	eczéma	lait	++++	++++
4457	N.T.	asthme	pous. domestique	négatives	négatives
4458	J.N.	asthme	laine	négatives	négatives
4460	T.P.	asthme	mucor	négatives	négatives
			helminthosporium	négatives	négatives
4464	D.V.	urticaire	pain	++++ ++	++++ + +
			riz	++++ +++	++++++++
			viande de boeuf	+ ++++	+ ++++
4465	L.D.	asthme	aliments standard	négatives	négatives
4466	A.C.	asthme	aliments standard	négatives	négatives

cité dans la préparation du collodion et de plus de clarté dans la lecture. Mais avant de l'avoir adoptée définitivement, nous avons fait une étude comparative avec la technique antérieure en effectuant des déterminations simultanées. Dans le tableau suivant, nous groupons les résultats obtenus :

Dans le tableau ci-dessus, nous voyons que dans tous les cas où la réaction faite avec le collodion sans colorant était positive, elle l'était également avec une intensité semblable, et même, dans certains cas, supérieure, avec le collodion coloré

Nous n'avons jamais vu qu'une réaction positive l'ancienne technique fusse négative avec celle au collodion coloré. Par contre, il est parfois arrivé que les particules colorées fussent précipitées par un antigène alors qu'elles ne l'avaient pas été par la première technique; ceci est donc l'indice d'une plus grande sensibilité de réaction et probablement d'une plus grande spécificité, quoique nous ne puissions en être sûrs avant d'avoir à notre disposition, les résultats thérapeutiques ultérieurs. Il est certain que la nouvelle technique colorée nous

offre les mêmes résultats positifs que l'ancienne, avec une plus grande clarté dans la lecture et une facilité accrue dans l'obtention des particules de collodion.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Arjona, E., Ales, J. M. & Jimenez Díaz, C.*: Rev. Clin. Esp. 15, 192, 1944.
2. *Ales, J. M., Arjona, E., Jimenez Díaz, C. & Segovia, J. M.*: Rev. Clin. Esp. 19, 238, 1945.
3. *Jimenez Díaz, C., Segovia, J. M., Arjona, E. & Ales, J. M.*: Rev. Clin. Esp. 23, 13, 1946.
4. *Segovia, J. M., Jimenez Díaz, C., Arjona, E. & Ales, J. M.*: Rev. Clin. Esp. 33, 97, 1949; Bull. Inst. Med. Res. Madrid, 2, 57, 1949.
5. *Segovia, J. M.*: Thèse doctorale, Madrid 1947.
6. *Arjona, E. & Ales, J. M.*: « Anafilaxia y Alergia ». Exposé au Premier Congrès National d'Allergie de Madrid, 1949.
7. *Jimenez Díaz, C. & Arjona, E.*: « Les anticorps allergiques ». Exposé au Premier Congrès Européen d'Allergie, Paris, Juin 1950.
8. *Jimenez Díaz, C., Arjona, E., Ales, J. M. & Segovia, J. M.*: Rev. Clin. Esp. 38, 356, 1950; Bull. Inst. Med. Res. Madrid, 3, 125, 1950.
9. *Zozaya, J.*: Jour. Med. Exp. Med. 55, 325, 1932.
10. *Cohen, M. B. & Weller, R. R.*: Jour. Allergy 12, 3, 1941.
11. *Goodner, K.*: Science, 94, 241, 1941.

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.