

Péripneumonie contagieuse bovine (PPCB)

Doc.Ref.: PE – 006 – PSA/BM

Test de fixation du complément

Principe de la méthode

Le test de fixation du complément (FC) est utilisé comme test de dépistage; tous les échantillons de sérum positifs ou douteux à ce test doivent être soumis à un test complémentaire pour confirmer l'infection. Ce test est basé sur la détection et la quantification d'anticorps fixant le complément anti-*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm).

Le test de FC se compose de deux phases - Fixation et hémolyse. Dans la 1ère phase (Fixation), l'antigène Mmm (Ag) et l'échantillon de sérum à tester (ST) sont mélangés avec du sérum de cobaye contenant du complément (C). Si le ST contient des anticorps spécifiques (Ab) anti-Mmm, un complexe Ag-Ac se forme et le complément est activé et fixé, n'étant pas disponible pour réagir dans la 2ème phase.

Dans la 2ème phase (hémolyse), le système hémolytique (SH) est ajouté. Lorsque le ST possède des anticorps spécifiques de l'Ag, les GV ne sont pas lysés par le complément car il a été fixé dans la 1ère phase du test et la réaction est positive. Lorsque le ST n'a pas d'Ab spécifique, il n'y a pas de formation du complexe Ag-Ac dans la 1ère phase du test, le C n'est pas activé et reste libre de liser les globule rouges (GR) du système hémolytique, la réaction étant négative. Le degré d'hémolyse, conséquence de la lyse globulaire, est à la base de l'interprétation et de la quantification des résultats.

Chez les bovins, le principal anticorps fixant le complément est l'IgG1; L'IgG2 ne fixe pas le complément de cobaye et a la capacité d'empêcher la fixation du complément par d'autres immunoglobulines, produisant ainsi un phénomène de prozone. Cela se produit lorsque la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon de sérum est disproportionnée par rapport à la quantité d'antigène de test (c'est-à-dire des sérums hautement positifs) générant des résultats faussement négatifs. Le problème est facilement résolu en testant l'échantillon à des dilutions plus élevées.

1. Réactifs:

- 1.1. Eau bidistillée stérile ou ultrapure;
- 1.2. Véronal Buffer (TV) - Buffer disponible sur le marché spécialisé.
- 1.3. Sérums à tester (ST).
- 1.4. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm). Il est utilisé dans le test à 2 UA (DT 1/40).
- 1.5. Complément - sérum de cobaye lyophilisé disponible sur le marché spécialisé. Il est utilisé dans les tests à 2,5 UHC.
- 1.6. Globules rouges de mouton (GR);
- 1.7. Hémolysine - sérum hyperimmun de lapin, anti-globules rouges de mouton, disponible sur le marché spécialisé. Il est utilisé dans un test à 12 UHH.
- 1.8. NRS - Sérum bovin négatif, disponible sur le OIE Référence Laboratoire for PPCB (Portugal). Sérum sans anticorps anti-*Mycoplasma*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Leptospira*, *Mycobacterium paratuberculosis* et leucose bovine.
- 1.9. PRS - Sérum bovin positive, com titre 4+/160 et 2+/320, disponible sur le OIE Référence Laboratoire for PPCB (Portugal). Il doit être conservé à -20 ° C. Une fois ouvert, il doit être aliquoté et conservé dans le même état.

2. Procédure (micromethod):

ST doit être exempt de contamination. En cas de turbidité causée par la suspension de globules rouges, centrifuger à 1500 g pendant 10 minutes. Les ST sont testés à la dilution 1/10 en TV (ex: 100 µl de sérum + 900 µl de TV) et inactivés au bain-marie à 56 ° C ± 2 ° C pendant 30 minutes, le jour où ils sont testés.

2.1. Préparation du Système Hémolysique (SH):

2.1.1. Après le titrage, diluez l'hémolysine pour obtenir 12 UHH. Ainsi, par exemple, si 1UHH est contenu dans la dilution 1/12000, 1/1000 hémolysine doit être utilisée (par exemple 12 000/12 = 1000);

2.1.2. Ajouter des volumes égaux d'hémolysine GR 6% et 12 UHH (par exemple 2 ml de 6% GR + 2 ml d'hémolysine 12 UHH) et sensibiliser le SH en incubant dans un bain-marie à 37 ° C ± 2 ° C pendant 30 minutes.

2.2. Exécution du test:

2.2.1 Déposer sur la microplaque en double (contrôle AAC), 25 µl de chaque ST.

2.2.2 Toujours utiliser PRS et NRS dans chaque série de tests. Ces sérums doivent être dilués le jour même du test à la télévision, par dilutions successives sur base 10, de 1/10 à 1/640.

2.2.3 Vérifier le SH (déposer 75 µl de TV dans le dôme), l'AAC d'Ag (déposer 25 µl de TV dans le dôme correspondant) et le complément à 0,5 UHC, 1 UHC et 2,5 UHC (déposer 50 µl de TV dans chacun dôme).

2.2.4 A l'exception du contrôle de l'AAC du ST, du contrôle du SH et du complément, ajouter à chaque dôme 25 µl d'Ag dans le DT 1/40.

2.2.5 À l'exception du contrôle SH, ajouter 25 µl de complément préalablement titré et dilué dans chaque dôme. Agiter la plaque sur l'agitateur de microplaques et incuber à 37 ° C ± 2 ° C dans le four pendant 30 minutes (agiter la microplaque à la moitié de la période d'incubation).

2.2.6 Ajouter 25 µl de SH sensibilisé à chaque puits, agiter les plaques sur l'agitateur de microplaques et incuber au four à 37 ° C ± 2 ° C pendant 30 minutes (agiter la microplaque au milieu de la période d'incubation).

2.2.7 Après avoir centrifugé les microplaques à 125 g pendant 5 minutes, lire les résultats.

Les sérums avec hémolyse partielle ou absence d'hémolyse sont sélectionnés pour la titration. À partir d'une aliquote ST non diluée, préparer des dilutions de sérum de 1/10 à 1/640 (selon le schéma du tableau 2) et répéter le test.

2.3. Lecture et interprétation des résultats:

L'expression des résultats est basée sur le degré de fixation du complément observé dans la dilution la plus élevée dans laquelle il y a fixation du complément et selon le tableau 1.

- Tout sérum dilué au 1/10 fixant complètement le complément (4+) est considéré «positif».

- Les sérums dilués au 1/10 que fixent partiellement le complément (1+, 2+ et 3+) sont considérés «douteux».

- Résultats attendus des contrôles:

Ag → 100% hémolyse

C ½ unités → 50% d'hémolyse

C 1 unité → 100% hémolyse

C'2,5 unités → 100% d'hémolyse

HS → 100% d'inhibition de l'hémolyse

PRS → ++++ 1/160 et ++ 1/320

NRS → 100% d'hémolyse

Table 1. Interprétation des résultats

% Fixation du complément	Expression des résultats
100%	4+ / D*
75%	3+ / D
50%	2+ / D
25%	1+ / D
0%	0 / D

* D – Fator de Diluição

Table 2. Schéma d'une plaque de titrage de sérum

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
ST1	ACA	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640					A
ST2	ACA	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640					B
ST3	ACA	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640					C
ST4	ACA	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640					D
ST5	ACA	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640					E
ST6	ACA	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640					F
PRS	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640						G
NRS	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	AgC	C'1/2C	C'1C	C'2,5C	SHC	H

ST → serum sample ; AgC → Ag control ; C'1/2C → C'1/2 unit control ; C'1C → C'1 unit control
C'2,5C → C'2,5 units control; SHC → SH control