

procédés nouveaux. Par contre, on doit avouer qu'on a peu ajouté encore aux éléments du pronostic, dont l'importance n'est pourtant pas moindre pour le praticien. La recherche des ferments du sang, celle de la lipase en particulier, nous a paru donner des renseignements précieux sur la résistance générale de l'organisme dans les affections médicales, et peut-être les chirurgiens y puiseraient-ils quelquefois aussi des données utiles en ce qui concerne les indications opératoires. Aussi nous semble-t-elle susceptible de devenir un procédé d'exploration clinique auquel, pour se conformer à une nomenclature actuellement en faveur dans le langage médical, on pourrait donner le nom de *zymoscopie* (1).

(1) Consulter sur les ferments du sang : A. CLERC, Contribution à l'étude de quelques ferments solubles du sérum sanguin (*Thèse de Paris*, 6 févr. 1902, n° 170).

## DIX-SEPTIÈME LEÇON

### L'AGGLUTINATION DES MICROBES ET LE SÉRO-DIAGNOSTIC

Origines du séro-diagnostic : Le phénomène de l'agglutination et le phénomène de Pfeiffer. — Le diagnostic des microbes par le sérum spécifique. — Séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. — Technique. — Mesure du pouvoir agglutinant du sérum. — Apparition et disparition de la propriété agglutinante. — Utilité clinique de la séro-réaction. — Séro-diagnostic du choléra et de quelques autres maladies infectieuses. — Pneumococcie. — Tuberculose.

Le phénomène de l'agglutination des microbes par le sérum, qui est d'un très haut intérêt pour l'étude générale des réactions de l'organisme à l'égard des infections, offre pour le clinicien une importance toute particulière, car il est la base d'un procédé d'une application facile à la clinique et qui est connu sous le nom de séro-diagnostic (1).

Le phénomène de l'agglutination paraît avoir été constaté pour la première fois par MM. Charrin et Roger en 1889. Ayant ajouté à du bouillon de culture du sérum d'animal neuf d'une part et, d'autre part, du sérum d'animal immunisé contre le bacille pyocyanique, ils virent qu'en ensemençant ces deux sortes de bouillon avec le bacille, la culture formait des grumeaux dans le bouillon contenant le sérum de l'animal immunisé, au lieu de produire un trouble uniforme comme dans le bouillon additionné de sérum d'animal neuf.

M. Metchnikoff (1891) fit la même constatation pour le vibron avicide, voisin du vibron cholérique, dont il a fait une étude

(1) Pour tous les détails relatifs à l'agglutination des microbes on consultera avec fruit l'excellente thèse de R. BENSUADE (*Le phénomène de l'agglutination des microbes et ses applications à la pathologie, le séro-diagnostic*. Paris, juill. 1897, n° 631), complétée depuis par celle de G. SANTOS (*Les récentes recherches sur l'agglutination des microbes, le séro-diagnostic*, Paris, mai 1900, n° 380).

spéciale (vibron de Metchnikoff), ainsi que pour le pneumocoque. Pour ce dernier microbe, le fait fut confirmé ensuite par Issaëff (1893) et Washbourn (1895). Ivanoff (1894) observa également le même phénomène pour une variété spéciale de vibron cholérique (vibron d'Ivanoff).

Tous ces observateurs avaient constaté la formation de grumeaux dans les cultures en voie de développement. M. Bordet, en 1895, vit que ces grumeaux de microbes agglutinés se formaient aussi instantanément lorsqu'on mélangeait à une culture toute développée de vibron cholérique du sérum d'animal immunisé.

Peu de temps auparavant, Pfeiffer (1894) avait découvert un phénomène différent, mais qui présente des rapports assez étroits avec l'agglutination. Ce *phénomène de Pfeiffer* consiste en ce que, lorsqu'on injecte un peu de culture de vibron cholérique dans le péritoine d'un animal immunisé, les vibrions subissent rapidement des modifications : ils se transforment en granules, ainsi qu'on peut s'en assurer par des prélèvements successifs de liquide péritonéal.

M. Metchnikoff (1895) simplifia beaucoup l'étude du phénomène de Pfeiffer en montrant qu'on obtient cette transformation en granules non pas seulement *in vivo*, mais encore *in vitro*, en ajoutant à une culture en bouillon du sérum d'animal immunisé.

Cette réaction fut aussitôt utilisée pour distinguer entre eux les échantillons de microbes voisins, pour faire ce qu'on appelle aujourd'hui le séro-diagnostic des microbes. Pfeiffer avait, en effet, constaté que la propriété de transformer les vibrions en granules était spécifique, c'est-à-dire que le sérum d'un animal immunisé contre le choléra n'agissait que sur les vibrions cholériques légitimes et non sur les types plus ou moins voisins, plus ou moins faciles à confondre avec eux par l'ensemble de leurs propriétés et de leurs caractères de cultures. Il étendit ensuite ces conclusions au bacille d'Eberth (1896).

En outre, il constata (1895) que le sérum de malades convalescents du choléra, qui est doué de propriétés immunisantes,

possède aussi, comme le sérum de l'animal immunisé, le pouvoir de transformer les vibrions en granules. Peu après, avec Kolle (1896), il observa le même phénomène pour le sang de sujets convalescents de fièvre typhoïde.

Les deux phénomènes dont je viens de vous parler présentent, comme je vous le disais, des rapports étroits. En effet, c'est dans le même sérum d'animaux immunisés que l'on rencontre la double propriété de provoquer l'agglutination des microbes en amas (*propriété agglutinante*) et leur transformation granuleuse (*propriété lysogène*). Ces deux propriétés étaient également spécifiques et pouvaient également servir au diagnostic des espèces microbiennes. Car Gruber et Durham (1896) montrèrent qu'on pouvait faire le séro-diagnostic du vibron cholérique, du bacille d'Eberth et du colibacille, au moyen de l'agglutination par le sérum d'animal immunisé, phénomène bien plus facile à observer que la transformation granuleuse de Pfeiffer. Ces résultats furent confirmés, du reste, par Pfeiffer et Kolle.

Gruber (1), au Congrès de Wiesbaden (9 avril 1896), proposait à l'attention des cliniciens l'étude de la réaction agglutinante et indiquait en même temps le moyen de la mesurer.

« La principale raison, disait-il, qui m'a fait paraître parmi vous, c'est d'engager Messieurs les cliniciens à rechercher la réaction agglutinante dans le sérum sanguin des anciens cholériques et des anciens typhiques. Je voudrais seulement attirer l'attention sur ce fait qu'il serait insuffisant d'employer pour ces recherches un sérum dilué de moitié, car à ce degré de dilution le sérum humain normal agglutine fortement diverses espèces microbiennes; mais qu'il faudrait titrer pour ainsi dire l'action agglutinante d'après diverses dilutions de sérum, de façon à déterminer quel est le degré de dilution qui produit encore après une heure des traces d'agglutination. »

La réponse des cliniciens ne se fit pas longtemps attendre et dépassa en résultats ce que demandait Gruber. Le 26 juin, M. Widal annonça à la Société médicale des hôpitaux, que la

(1) GRUBER, *Verhandl. des XIV<sup>e</sup> Congresses f. innere Medicin*, avril 1896, p. 213.

propriété agglutinante existait dans le sérum non pas seulement chez les malades guéris de la fièvre typhoïde, mais au cours même de la période fébrile et qu'on pouvait par suite l'utiliser pour reconnaître la maladie : ainsi était créée la méthode pour laquelle il proposait le nom de *séro-diagnostic* (1).

Les premiers faits confirmatifs furent rapportés par le professeur Dieulafoy à l'Académie de médecine. A la Société médicale des hôpitaux, j'eus l'occasion d'en présenter de nouveaux, ainsi que MM. Chantemesse, Lemoine, etc. Tandis que de toutes parts affluaient les confirmations, MM. Widal et Sicard perfectionnaient tous les détails de la technique. Des recherches étaient entreprises pour déterminer la nature, l'origine, la répartition dans les diverses humeurs de cette curieuse propriété agglutinante. Enfin, par la suite, le séro-diagnostic a été étendu à d'autres maladies, telles que le choléra, la fièvre de Malte, la peste, la pneumococcie et en dernier lieu à la tuberculose.

Voyons tout d'abord, en ce qui concerne la fièvre typhoïde, la technique qui doit être employée.

L'agglutination peut se faire, comme je vous l'ai dit tout à l'heure, soit instantanément dans une culture toute développée, soit pendant le développement de la culture.

La *réaction extemporanée* se fait en mélangeant dans un verre de montre ou dans un tube à essai le sérum et une dilution de bacilles d'Eberth. Le sérum doit contenir, de préférence, peu de globules sanguins, car s'il en renfermait trop on ne verrait guère que ces éléments dans le champ du microscope et les bacilles libres ou en amas seraient difficiles à apercevoir, d'autant plus qu'on les examine forcément sans coloration. Par contre, la présence d'un petit nombre de globules ou à leur défaut de bulles d'air facilite la mise au point. Quant à la dilution de microbes qu'il convient d'employer, la meilleure est fournie par une cul-

(1) F. WIDAL, Séro-diagnostic de la fièvre typhoïde (*Bull. et Mém. de la Soc. méd. des hôp.*, 26 juin 1896, p. 561). — Pour tous les détails concernant la technique, consulter l'important mémoire de MM. F. WIDAL et A. SICARD, Études sur le séro-diagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, mai 1897, p. 353).

ture en bouillon ayant 24 heures d'étuve. Il est bon de vérifier par un examen microscopique préalable que la culture est pure et que les bacilles sont tous isolés sans former spontanément des amas.

Une culture de 24 heures, examinée après addition d'une petite proportion de sérum non agglutinant, montre au microscope des bacilles plus ou moins longs, extrêmement mobiles, parcourant tout le champ du microscope et tous séparés les uns des autres.

Après addition d'une petite proportion de sérum agglutinant,

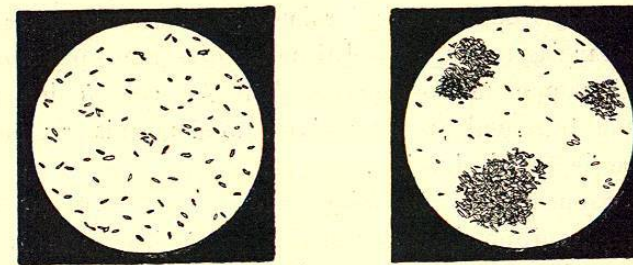


FIG. 90. — Séro-diagnostic de la fièvre typhoïde.

I. Culture du bacille d'Eberth en bouillon.  
II. La même, additionnée de sérum agglutinant.

au contraire, on voit se former plus ou moins rapidement des amas de bacilles : tout d'abord, un petit nombre de bacilles s'accolent, devenant pour ainsi dire des centres d'attraction ; peu à peu d'autres s'y ajoutent ; quelquefois, sur les bords de ces amas en voie de formation, l'on voit un bacille fixé au groupe par une de ses extrémités, tandis que l'autre exécute encore des mouvements oscillatoires. Les bacilles restés libres perdent peu à peu leur mobilité et finissent par s'agglutiner pour la plupart aux amas déjà formés. Bientôt, la préparation ne montre plus guère que des groupes de bacilles agglomérés, disséminés dans le champ du microscope « comme les îlots d'un archipel ».

Lorsque l'agglutination est intense, le phénomène peut être visible sans le secours du microscope ; on voit se former, dans le

tube ou le verre de montre qui contient le mélange, de petits grains très fins correspondant aux amas microbiens.

La réaction en culture, moins employée parce qu'elle demande plus de temps, plus de précautions, et ne donne pas de résultats meilleurs que la réaction extemporanée, comporte deux variantes.

Tout d'abord on peut mélanger à du bouillon vierge le sérum, puis ensemer le mélange. Si le sérum possède la propriété agglutinante, la culture pousse en grumeaux. Le bouillon, au lieu de présenter un aspect uniformément trouble et un reflet moiré, est presque complètement clair et au fond du tube se sont déposés des flocons de microbes, qui viennent flotter dans le liquide par l'agitation, mais qui ne s'y dissolvent pas complètement. L'examen microscopique, dans le cas où les amas seraient de très petites dimensions, confirmerait au besoin l'existence de l'agglutination.

On peut encore, au lieu d'ajouter le sérum avant l'ensemencement du bouillon, l'ajouter seulement à des cultures déjà développées. Le mélange est remis à l'étuve et en quelques heures des grumeaux plus ou moins volumineux se sont déposés et le bouillon est devenu clair (clarification du bouillon).

La réaction en culture, surtout par le premier procédé, exige l'emploi d'un sérum rigoureusement aseptique : or, on ne l'obtient guère qu'en recueillant le sang dans une veine, ce qui constitue dans la pratique une difficulté qui n'est pas négligeable.

Quel que soit le procédé employé, l'on peut obtenir la réaction, comme l'ont montré MM. Widal et Sicard (1), en utilisant au lieu de sang frais et de sérum, du sang desséché, recueilli sur du papier buvard ou sur des lames de verre; cela permet de transporter et d'envoyer au loin sans difficulté le sang que l'on veut soumettre à l'examen.

Comme on ne dispose pas toujours d'une culture jeune de bacille d'Eberth en bouillon, et qu'il est nécessaire, pour en obtenir, d'avoir à sa portée un laboratoire, MM. Widal et Sicard (2)

(1) WIDAL et SICARD, *Soc. méd. des hôp.*, 31 juill. 1896, p. 681.

(2) WIDAL et SICARD, *Soc. de Biol.*, 30 janv. 1897.

ont proposé l'emploi des bacilles morts et conservés. M. Bordet (1) avait montré, en effet, que le vibrion cholérique tué par le chloroforme est encore apte à subir l'agglutination.

Le formol, recommandé par MM. Widal et Sicard, tue les bacilles dans le bouillon de culture, ne les agglomère pas et leur laisse l'aptitude à l'agglutination, légèrement amoindrie, il est vrai. Ces cultures mortes sont faciles à transporter sans danger et peuvent être indéfiniment conservées, toujours prêtes à servir en cas de besoin.

L'inconvénient de la réaction qu'on obtient avec les bacilles morts consiste en ce que le seul phénomène visible sous le microscope est l'agglutination en amas; car tous les microbes étant morts sont nécessairement immobiles avant toute action du sérum et l'on se prive ainsi d'un élément d'appréciation assez important de la réaction, à savoir l'immobilisation des microbes par le sérum agglutinant.

Aussi bien toutes ces modifications de la technique primitive ne sont-elles que des procédés d'exception, utilisables suivant les nécessités particulières. En règle générale et toutes les fois que ce sera possible, c'est au procédé extemporané qu'il conviendra de recourir.

Mais l'emploi de ce procédé, aussi bien, d'ailleurs, que de la réaction en culture, exige encore une précaution indispensable, comme l'avait indiqué Grüber : c'est de titrer le pouvoir agglutinant du sérum par des dilutions successives.

Au lieu de diluer le sérum avec du sérum normal ou du bouillon vierge, avant de le mélanger à la culture, il est préférable de mélanger à une dose uniforme de sérum des doses croissantes de culture. Le moyen le plus simple consiste à prendre une série de tubes à essai, à introduire dans chacun d'eux une goutte de sérum, puis successivement dans la série des tubes, X, XX, XXX gouttes, etc., de culture en bouillon.

Pour être sûr que les gouttes de sérum équivalent aux gouttes de bouillon, il est bon de se servir pour chaque liquide de

(1) BORDET, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, avril 1896, p. 208.