

A HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA NA PESQUISA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENO EXTRAÍDO DE FIBRAS DE ALGODÃO*

JOSÉ ALBERTO NEVES CANDEIAS **

INTRODUÇÃO

Alguns trabalhos sôbre o fenômeno da aglutinação de partículas inertes em cuja superfície foram adsorvidos determinados grupos químicos^{14-17, 28} e os estudos de Eagle e Vickers⁹ sôbre a natureza da reação química entre o ácido diazo-sulfanílico e proteínas, tornaram possível o trabalho de Pressman, Campbell e Pauling³¹ sôbre a conjugação de proteínas à superfície de hemácias tratadas pela bis-diazo-benzidina (BDB). Posteriormente, Jacobs e colaboradores¹³ estudaram o efeito do ácido tânico na superfície de certos elementos celulares. Seguiram-se, então, numerosos trabalhos sôbre a adsorção de antígenos de origem bacteriana ou não e de natureza poliçsacarídica ou proteica, à superfície de hemácias tratadas pelo ácido tânico ou pela BDB e subsequente aglutinação dêstes por anticorpos específicos^{1, 5, 8, 10, 20, 25-27, 32}. Todo êste conjunto de investigações parece ter levado ao conceito geral de que os polissacáridos adsorvem fãcilmente à superfície de hemácias não modificadas, enquanto para a adsorção dos antígenos de natureza proteica é necessário um tratamento prévio com ácido tânico^{4, 39} ou com bis-diazo-benzidina.

O objetivo imediato do presente trabalho é apresentar os resultados obtidos numa tentativa de padronizar as condições para a execução da hemaglutinação passiva de hemácias de coelho sensibilizadas com um antígeno extraído das fibras de algodão cardado, após tratamento com ácido tânico, BDB e sem qualquer tratamento prévio.

Objetivo mediato seria estabelecer um método sorológico que permitisse titular, no sôro de individuos que apresentem quadros de bissinose, anticorpos antifibras de algodão, tentando estabelecer uma correlação entre aquêles títulos e a gravidade do quadro clínico.

Recebido para publicação em 5-7-1965.

* Trabalho da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Dácio de Almeida Christovão) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP.

** Instrutor da Cadeira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Hemácias de coelho — Usaram-se na reação hemácias de coelho, obtidas de sangue dêste animal colhido com todos os cuidados de assepsia em 1,2 volumes de solução de Alserver modificada², esterilizada em autoclave a 120°C durante 15 minutos. As hemácias eram sempre envelhecidas durante 3 dias, na geladeira a 4°C. Passado o tempo de envelhecimento, as hemácias foram lavadas, três vezes, em solução salina não tamponada a 0,85%, ressuspensas nesta mesma solução de modo a obter-se uma concentração de 3% e usadas no mesmo dia. A solução de Alserver permite a conservação das hemácias a 4°C durante duas semanas, no máximo; quando se mantêm durante mais tempo tornam-se muito frágeis, o que prejudica o tratamento com ácido tânico que, por sua vez, também contribui para o aumento da fragilidade globular, além das falsas reações positivas que ocorrem. A suspensão de hemácias a 3% era padronizada em fotocolorímetro.

Soluções salinas tamponadas — As soluções salinas usadas na reação foram preparadas a partir de soluções 0,3 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de modo a obterem-se soluções 0,15 M com $\text{pH} = 6,4$ e $\text{pH} = 7,2$ ²⁴.

Diluentes — Os diluentes usados em tôdas as experiências foram os seguintes: solução salina não tamponada a 0,85% que chamamos de solução salina normal; solução salina tamponada, $\text{pH} = 6,4$, usada para diluição do antígeno; solução salina tamponada, $\text{pH} = 7,2$, usada para lavagem das hemácias de coelho antes da sensibilização com o antígeno; solução salina normal com 1% de sêro normal de coelho usada para diluição dos sêros de coelho a titular; solução salina normal com 0,4% de sêro normal de coelho para lavagem das hemácias depois de sensibilizadas pelo antígeno.

Ácido tânico — No início de cada experiência foram preparadas soluções de ácido tânico em solução salina normal a partir de uma solução mãe de concentração igual a 1:2.000 que se conservava na geladeira a 4°C durante 15 dias; passado êste tempo, preparava-se nova solução mãe. Foram usadas várias diluições de ácido tânico.

Bis-diazo-benzidina — Preparou-se dissolvendo 0,23 g de benzidina em 45 ml de 0,2 N HCl e adicionando uma solução de 0,175 g de NaNO_2 em 5 ml de água destilada. É essencial que a temperatura desta mistura seja mantida a 0°C durante o período de 30 minutos em que se processa a reação química. Para conservar a reatividade da bis-diazo-benzidina, assim preparada, conservou-se esta a -68°C ¹¹. A partir da solução mãe

preparou-se a solução de uso, juntando a 7 ml de solução salina tampoadada, pH = 7,2, a 0,5 ml da solução de benzidina.

Antígeno — Foi preparado um antígeno, a que chamamos AG I, segundo técnica descrita por Cavagna e Finulli⁶.

Sêro de coelho — O sêro imune foi obtido de coelhos submetidos à inalação de partículas de algodão, em ambiente fechado, durante 1,30 horas por dia, por um período de 30 dias. Fêz-se uma sangria de todos os animais antes de iniciada a imunização. Depois que esta se iniciou, fizeram-se sangrias repetidas cada 10 dias, a partir do 5.º dia, até ao 55.º dia. Antes de usados, todos os sêros foram inativados a 56°C durante 30 minutos.

Tratamento das hemácias pelo ácido tânico — A suspensão de hemácias a 3% foi posta em contacto, volume a volume, com as diluições de ácido tânico durante 15 minutos a 37°C e a 4°C. Em seguida, as hemácias foram centrifugadas a 1.500 RPM durante 15 minutos e lavadas com solução salina tampoadada, pH = 7,2; após nova centrifugação a 1.500 RPM durante 5 minutos o sedimento de hemácias foi ressuspense em solução salina normal de modo a obter-se a suspensão a 3% usada nas reações.

Sensibilização das hemácias taninizadas — As hemácias taninizadas foram sensibilizadas com várias diluições do antígeno na proporção de 1 volume de hemácias para 4 volumes de antígeno, à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, fêz-se uma centrifugação a 1.500 RPM e uma lavagem com solução salina normal com 0,4% de sêro normal de coelho. Repetiu-se a operação anterior mais uma vez preparando-se, no final, a suspensão de hemácias a 3% em solução salina normal com 0,4% de sêro normal de coelho.

Sensibilização de hemácias tratadas pela BDB — Diluiu-se o antígeno a 0,1% em solução salina normal e para cada 2 ml desta diluição adicionaram-se 1,6 ml de solução salina normal, 0,05 ml de papa de hemácias lavadas e diferentes volumes da solução de BDB. Depois de uma leve agitação, deixou-se a mistura à temperatura ambiente durante 15 minutos e, centrifugou-se a 1.500 RPM durante 5 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 3,5 ml de solução salina normal com 1% de sêro normal de coelho. Nova centrifugação seguida de ressuspensão final das hemácias em 2,5 ml de solução salina normal com 1% de sêro normal de coelho. Foram feitas experiências para verificar o modo como se processava a sensibilização a 4°C e a 37°C, sempre, durante 15 minutos.

Técnica da reação — Numa série de tubos de hemólise 12 × 75, colocaram-se 0,5 ml das diversas diluições de sêro (fator de diluição 2)

e 0,05 ml da suspensão de glóbulos sensibilizados com AG I; os resultados obtidos se referem ao uso de hemácias sem qualquer tratamento prévio, após tratamento com ácido tânico e com BDB. Foram usados os seguintes controles: hemácias normais, em salina e sêro normal de coelho; hemácias taninizadas, mas não sensibilizadas, em salina e sêro normal; hemácias taninizadas e sensibilizadas, em salina e sêro normal; hemácias tratadas pela BDB, mas não sensibilizadas, em salina e sêro normal; hemácias tratadas pela BDB e sensibilizadas em salina e sêro normal. A leitura dos resultados foi feita de acôrdo com o critério adotado por Stavitsky³⁷, no que diz respeito ao aspecto da hemaglutinação. Fixou-se a temperatura ambiente e o período de 12 horas como condições para a leitura final. Consideramos como título hemaglutinante a recíproca da maior diluição do sêro a que correspondesse uma leitura de ++.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fizeram-se experiências tendo em vista verificar o efeito do tempo e temperatura de incubação na sensibilização de hemácias de coelho, sem tratamento prévio, por várias diluições do antígeno AG I. Nestas experiências, a sensibilização foi feita misturando-se uma parte da suspensão a 10% de hemácias de coelho com quatro partes de diferentes diluições do antígeno e incubando-se as misturas, tomadas em duplicata, a 37°C durante 2 horas e a 4°C pelo mesmo período de tempo. A concentração da suspensão de hemácias usada na reação foi, neste caso, de 1%. Os dados ilustrando os resultados das experiências são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 — Sensibilização de hemácias de coelho por várias diluições do antígeno durante 2 horas a 37°C

Diluição Antígeno	Recíproca das diluições do sêro de coelho					Contrôles
	4	8	16	32	64	
10 ⁻¹	++++	++++	+++	±	-	-
10 ⁻²	++++	++++	++	+	-	-
10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-

Os resultados apresentados mostram que, para as condições em que foram executadas as experiências, as diluições 10^{-1} e 10^{-2} permitiram evidenciar, no sêro de coelhos imunizados, anticorpos em título de 1:16. Comparando êstes resultados com os apresentados na Tabela 2 pode concluir-se que, das temperaturas escolhidas, foi a de 37°C a que melhor resultado deu na sensibilização das hemácias sensibilizadas pelo antígeno, sem qualquer tratamento prévio.

TABELA 2 — Sensibilização de hemácias de coelho por várias diluições do antígeno durante 2 horas a 4°C

Diluição Antígeno	Recíproca das diluições do sêro de coelho					Contrôles
	4	8	16	32	64	
10^{-1}	+	±	-	--	--	--
10^{-2}	±	--	-	--	--	--
10^{-3}	-	--	-	--	--	--
10^{-4}	--	--	-	--	--	--

Numa segunda fase estudaram-se as condições de sensibilização de hemácias de coelho por diversas diluições do antígeno, após tratamento daquelas com concentrações variáveis de ácido tânico. Os resultados anotados nas Tabelas 3 e 4 permitem algumas conclusões.

Em primeiro lugar, o tratamento das hemácias pelo ácido tânico parece permitir uma sensibilização mais adequada quando se faz a 37°C . Em segundo lugar, pode verificar-se que é importante para um tratamento adequado das hemácias o uso de determinadas concentrações de ácido tânico; em nossas experiências o uso da diluição de 1:2.000 de ácido tânico, tal como já tinha sido verificado por outros autores^{21, 22}, ocasiona um certo grau de hemólise, além de não permitir uma adequada sensibilização. Esta opera-se em condições ótimas usando ácido tânico diluído a 1:200.000, parecendo as diluições do antígeno a 10^{-1} e 10^{-2} as mais adequadas para evidenciarem maior título de anticorpos. Deve-se notar que os títulos de anticorpos obtidos nesta série de experiências foram ligeiramente mais elevados do que os conseguidos com hemácias não tratadas; apesar do antígeno usado ser de natureza polissacarídica⁶, nossas experiências parecem demonstrar que o tratamento pelo ácido tânico permite obter melhores resultados, ao contrário do que referem alguns autores^{3, 7, 16-19, 23}.

TABELA 3 — Sensibilização de hemácias de coelho por várias diluições do antígeno depois de tratadas com ácido tânico durante 15 minutos a 37°C

Dil. inicial ácido tânico	Diluição Antígeno	Recíproca das diluições do sêro de coelho					Contrôles
		4	8	16	32	64	
1:2.000	10 ⁻¹	++	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	++	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	++	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	++	-	-	-	-	-
1:20.000	10 ⁻¹	+++	++	-	-	-	-
	10 ⁻²	+++	++	+	±	-	-
	10 ⁻³	+++	++	++	±	-	-
	10 ⁻⁴	+++	+++	++	+	-	-
1:200.000	10 ⁻¹	++++	+++	++	++	-	-
	10 ⁻²	++++	+++	+++	++	-	-
	10 ⁻³	++++	+++	++	-	-	-
	10 ⁻⁴	++++	+++	++	-	-	-

TABELA 4 — Sensibilização de hemácias de coelho por várias diluições do antígeno depois de tratadas com ácido tânico durante 15 minutos a 4°C

Dil. inicial ácido tânico	Diluição Antígeno	Recíproca das diluições do sêro de coelho					Contrôles
		4	8	16	32	64	
1:2.000	10 ⁻¹	+++	++	-	-	-	-
	10 ⁻²	+++	+++	+	-	-	-
	10 ⁻³	+++	+++	+	-	-	-
	10 ⁻⁴	+++	+++	+	-	-	-
1:20.000	10 ⁻¹	+++	+++	++	+	-	-
	10 ⁻²	+++	++	++	-	-	-
	10 ⁻³	+++	+	+	-	-	-
	10 ⁻⁴	+++	+	+	-	-	-
1:200.000	10 ⁻¹	++++	+++	+	-	-	-
	10 ⁻²	++++	+++	++	+	-	-
	10 ⁻³	++	++	+	+	-	-
	10 ⁻⁴	++	++	+	+	-	-

Os resultados da hemaglutinação passiva de hemácias de coelho tratadas com BDB são apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7. Foram estudadas as condições em que se operava a reação, não só em relação à tem-

peratura, como às concentrações de BDB e de antígeno, usadas. Pode verificar-se que se obtiveram títulos mais elevados com a sensibilização das hemácias com 0,15 ml de BDB, diluição a 10^{-1} ou 10^{-2} do antígeno e à temperatura ambiente.

TABELA 5 — Sensibilização de hemácias de coelho com várias quantidades de BDB durante 15 minutos à temperatura ambiente

Quantidade BDB (ml)	Diluição Antígeno AG 1	Recíproca das diluições do soro de coelho					Contrôles
		4	8	16	32	64	
0,10	10^{-1}	+	+	-	-	-	-
	10^{-2}	+	+	-	-	-	-
	10^{-3}	+	±	-	-	-	-
	10^{-4}	+	+	-	-	-	-
0,15	10^{-1}	++++	++++	+++	±	-	-
	10^{-2}	++++	++++	+++	±	-	-
	10^{-3}	++	++	-	-	-	-
	10^{-4}	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise
0,20	10^{-1}	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise
	10^{-2}	"	"	"	"	"	"
	10^{-3}	"	"	"	"	"	"
	10^{-4}	"	"	"	"	"	"

Como já tinha sido verificado por outros autores^{35, 36, 38}, é necessária uma adequada proporção entre a concentração de BDB e antígeno, na ausência da qual se dá a hemólise dos glóbulos. Isto foi observado não só com 0,20 ml de BDB e qualquer diluição do antígeno, mas também com 0,15 ml de BDB e altas diluições do antígeno; quando a sensibilização foi feita a 37°C só o excesso de BDB ocasionou a hemólise.

Os resultados obtidos nestas experiências parecem sugerir que o antígeno extraído das fibras de algodão, usado na reação, é um composto contendo grupos amínicos (hexosamina), uma vez que a conjugação diazo só é possível na presença de radicais nitrogenados livres³⁸. Suportando esta hipótese temos o resultado da dosagem de azoto total feita no antígeno AG 1, que atingiu o valor de 6,8 mg%. Neter e colaboradores³⁰ obtiveram de lipopolissacáridos de enterobactérias componentes hexosamínicos, cuja dosagem em azoto variava entre 5 e 9 mg%. Estes dados talvez possam sugerir que o antígeno por nós usado possua aqueles grupos, podendo estar relacionado com endotoxinas de bactérias Gram-negativas, eventualmente, contaminando as fibras do algodão^{6, 12, 29, 33, 34}.

TABELA 6 — Sensibilização de hemácias de coelho com várias quantidades de BDB durante 15 minutos a 4°C

Quantidade BDB (ml)	Diluição Antígeno	Recíproca das diluições do sôro de coelho					Contrôles
		4	8	16	32	64	
0,10	10 ⁻¹	+	±	-	-	-	-
	10 ⁻²	++	++	+	-	-	-
	10 ⁻³	++	++	+	-	-	-
	10 ⁻⁴	+	+	-	-	-	-
0,15	10 ⁻¹	++++	++++	+++	±	-	-
	10 ⁻²	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise
	10 ⁻³	"	"	"	"	"	"
	10 ⁻⁴	"	"	"	"	"	"
0,20	10 ⁻¹	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise
	10 ⁻²	"	"	"	"	"	"
	10 ⁻³	"	"	"	"	"	"
	10 ⁻⁴	"	"	"	"	"	"

TABELA 7 — Sensibilização de hemácias de coelho com várias quantidades de BDB durante 15 minutos a 37°C

Quantidade BDB (ml)	Diluição Antígeno	Recíproca das diluições do sôro de coelho					Contrôles
		4	8	16	32	64	
0,10	10 ⁻¹	+	±	-	-	-	-
	10 ⁻²	+	±	-	-	-	-
	10 ⁻³	+	±	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	+	+	-	-	-	-
0,15	10 ⁻¹	+	+	-	-	-	-
	10 ⁻²	+	+	-	-	-	-
	10 ⁻³	+	+	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	+	+	-	-	-	-
0,20	10 ⁻¹	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise	hemólise
	10 ⁻²	"	"	"	"	"	"
	10 ⁻³	"	"	"	"	"	"
	10 ⁻⁴	"	"	"	"	"	"

O Gráfico mostra os resultados de uma experiência pela qual pôde verificar-se que os títulos hemaglutinantes subiam rapidamente durante o período em que os animais permaneciam em processo de imunização, para

logo sofreram uma queda rápida, uma vez que aquele era suspenso. Depois de 55 dias a reação de hemaglutinação não permitia revelar qualquer taxa de anticorpos.

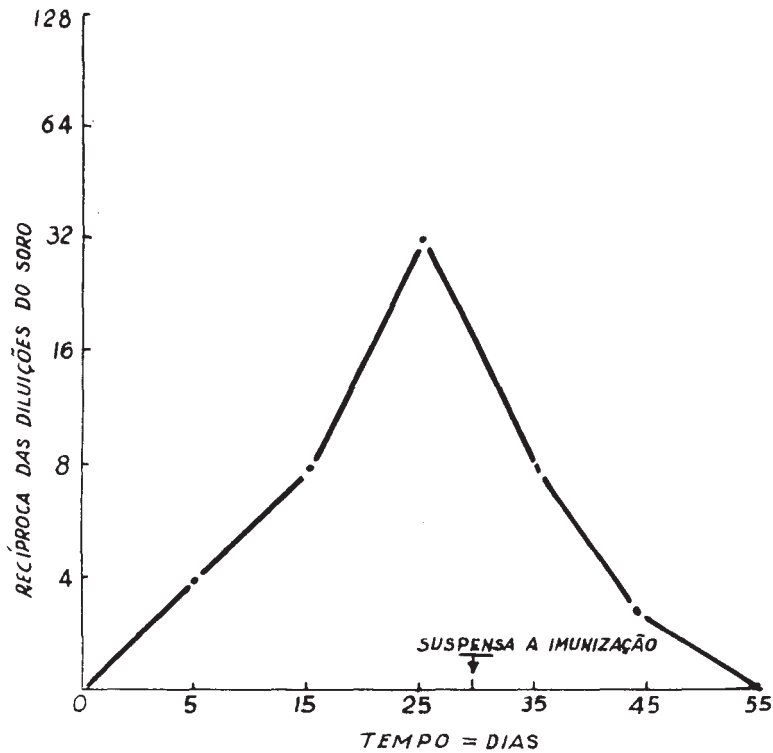


Gráfico — Títulos hemaglutinantes do soro de coelho imunizado mediante inalação de fibras de algodão.

RESUMO

Foi descrita uma reação de hemaglutinação capaz de demonstrar anticorpos no soro de coelhos imunizados mediante inalação de fibras de algodão. Nesta reação foram usadas hemácias de coelho e hemácias com ácido tânico e bis-díazo-benzidina, posteriormente sensibilizadas com um antígeno extraído daquelas fibras. Sugere-se a natureza hexosâmica do antígeno e sua possível relação com endotoxinas de bactérias Gram-negativas, eventuais contaminantes das fibras de algodão.

SUMMARY

A hemagglutination test for demonstrating antibodies in sera of rabbits immunized by inhalation of cotton fibers was described. This test involves

the use of rabbit red cells coupled to an antigen obtained from those fibers, after treatment with tannic-acid and bis-diazo-benzidine. Normal erythrocytes without any treatment were also used. The experiments suggest the hexosaminic nature of the antigen extracted and its possible relation with endotoxin of Gram-negative bacteria from cotton fibers.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. Luiz Cotillo Zegarra as valiosas sugestões e a assistência técnica dada ao presente trabalho. À senhorita Maria Aparecida Rezende de Araújo, técnica do Departamento de Microbiologia — Seção de Virologia, os nossos agradecimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, M. M.; WRIGHT, G. G. & BALDWIN, A. C. Observations on the agglutination of polysaccharide-treated erythrocytes by tularemia antisera. *J. exp. Med.*, **91**(6):561-566, Jun. 1950.
2. ALSERVER, J. B. & AINSLEE, R. B. A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service. *N. Y. St. J. Med.*, **41**(2):126-135, Jan. 1941.
3. BORDUAS, A. G. & GRABAR, P. L'hémagglutination passive dans la recherche des anticorps antiprotéiques. *Ann. Inst. Pasteur*, **84**(5):903-923, mai 1953.
4. BOYDEN, S. V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.*, **93**(2):107-120, Feb. 1951.
5. — Adsorption by erythrocytes of antigens of *Pfeifferella mallei* and *Pfeifferella whitmori*. *Proc. Soc. exp. Biol.* (N. Y.), **73**(2):289-291, Feb. 1950.
6. CAVAGNA, G. & FINULLI, M. Il contenuto di entotossine batteriche nella polvere di cotone, lino e canapa. *Med. d. Lavoro*, **53**(11):696-704, nov. 1962.
7. COLE, L. R. & FARREL, V. R. A method for coupling protein antigens to erythrocytes. I. Description of method. *J. exp. Med.*, **102**(6):631-645, Dec. 1955.
8. COOMBS, R. R. A., HOWARD, A. N. & WILD, F. Titration of antisera to soluble proteins on the basis of an agglutination reaction. *Brit. J. exp. Path.*, **33**:390-397, 1952.
9. EAGLE, H. & VICKERS, P. On the nature of the reaction between diazotised sulfanilic acid and proteins. *J. biol. Chem.*, **114**(1):193-197, May 1936.
10. FRIEDMAN, M. & BENNETT, G. R. Hemagglutination test for detection of adenovirus antibodies. *Proc. Soc. exp. Biol.* (N. Y.), **94**(4):712-717, Apr. 1957.
11. GORDON, J., ROSE, B. & SEHON, A. H. — Detection of "non-precipitating" antibodies in sera of individuals allergic to ragweed pollen by an in vitro method. *J. exp. Med.*, **108**(1):37-52, July 1958.

CANDEIAS, J. A. N. A hemaglutinação passiva na pesquisa de anticorpos específicos para antígeno extraído de fibras de algodão. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, **19**:123-134, 1965.

12. GRABBER, C. D. & DODD, M. C. Hemagglutination with red cells sensitized with antigens of enteropathogenic Escherichia Coli. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **66**(1):157-161, Aug. 1956.
13. JACOBS, M. H., STEWART, D. R. & BUTTLER, M. K. — Some effects of tannic acid on the cell surface. *Amer. J. med. Sci.*, **205**(1):154, Jan. 1943.
14. JONES, F. S. Agglutination by precipitin I. *J. exp. Med.*, **46**(2):303-314, May 1927.
15. ——— Agglutination by precipitin II. *J. exp. Med.*, **48**(2):183-192, Aug. 1928.
16. KEOGH, E. V., NORTH, E. A. & WARBURTON, M. F. Adsorption of bacterial polysaccharides to erythrocytes. *Nature*, **161**(4096):687-688, May 1948.
17. LANDSTEINER, K. & VAN DER SCHEER, J. Cross reactions of immune sera to azoproteins. *J. exp. Med.*, **63**(3):325-339, Mar. 1936.
18. LANDY, M. On hemagglutination procedures utilizing isolated polysaccharide and protein antigens. *Amer. J. publ. Hlth*, **44**(8):1059-1064, Aug. 1954.
19. LECOCQ, E. & LINZ, R. Epuisement de l'activité sensibilisante de certains antigènes pour les hématies tannées de lapin. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **154**(5):1120-1124, mai 1960.
20. LIM, K. A. & PONG, W. S. Agglutination by antibody of erythrocytes sensitized by Virus Hemagglutinin. *J. Immunol.*, **92**(4):638-647, Apr. 1964.
21. LINZ, R. Sur la proportion d'antigène fixée par les hématies tannées de lapin. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **154**(11):2138-2140, nov. 1960.
22. ——— & LECOCQ, E. Adsorption d'anticorps sur des hématies tannées. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **154**(4):862-864, avr. 1960.
23. ——— & MADELBAUM, E. L'absorption d'antigènes par des hématies tannées. *Ann. Inst. Pasteur*, **101**(3):307-381, sept. 1961.
24. MACKIE, T. J. & McCARTNEY, J. E. Handbook of bacteriology: a guide to the laboratory diagnosis and control infection. 10th ed. Edinburgh, E. & S. Livingstone, 1960. 980 p.
25. MAGUREANU, E., GROBNICO, M. & MUSETESCO, M. Anticorps adenoviraux. Étude sérologique de leur incidence dans divers groupes de population. *Presse med.*, **72**(52):3113-3115, déc. 1964.
26. McKENNA, J. M., ZUSCHEK, F. & FRANKEL, J. W. An hemagglutination test for titration of antibodies to polioviruses. *Proc. Soc. exp. Med. (N. Y.)*, **97**(1):160-163, jan. 1958.
27. MIDDLEBROOK, G. & DUBOS, R. Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J. ex. Med.*, **88**(5):521-528, Nov. 1948.
28. MUDD, S. et al. Mechanism of opsonin and bacteriotropin action. *J. exp. Med.*, **52**:313-329, 1930.
29. NETER, E. et al. The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **66**(1):141-156, Aug. 1956.
30. ——— Studies of enterobacterial lipopolysaccharides: effects of heat and chemicals on erythrocyte-modifying, antigenic, toxic and pyrogenic properties. *J. Immunol.* **76**(5):377-385, May 1956.

31. PREESMAN, D., CAMPBELL, D. H. & PAULING, L. The agglutination of intact azo-erythrocytes by antisera homologous to the attached groups. *J. Immunol.*, 44(2):101-105, June 1942.
32. SINITSYN, V. A. Detection of botulinic toxins types A and B by means of the indirect haemagglutination reaction as modified by Rytsai. *J. Microbiol. Epidem. Immunobiol.*, 31(4):403-414, Apr. 1959.
33. STAUB, A. M. The role of the polysaccharide moiety in determining the specificity and immunological activity of the O-antigen complex of salmonellae. (Reprint from Bacterial Endotoxin Institute of Microbiology Rutgers, The State University New Brunswick, New Jersey).
34. — & RAYNAUD, M. Connaissances actuelles sur la nature chimique des antigènes présents dans les salmonella. (Tiré-à-part de The World problem of salmonellosis, rédigé par E. van Oye — Monographie Biologicae, vol. XIII).
35. STAVITSKY, A. B. Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.*, 72(5):360-367, May 1954.
36. — Micromethods for the study of proteins and antibodies. II. Specific applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.*, 72(5):368-375, May 1954.
37. — Haemagglutination and haemagglutination-inhibition reaction with tannic acid and bis-diazotized benzidine-protein-conjugated erythrocytes (in Council for International Organizations of Medical Sciences. Immunological methods: a symposium... edited by J. F. Ackroyd. Oxford, Blackwell Scientific Publications [1964]. p. 363-399).
38. — & ARQUILLA, E. R. Micromethods for the study of proteins and antibodies. III. Procedure and applications of hemagglutination-inhibition reactions with bis-diazotized-benzidine and protein-conjugated red blood cells. *J. Immunol.*, 74(5):306-312, May 1955.
39. WAHL, R. & DRACH, G. Recherches immunologiques sur les antigènes protéiques spécifiques et non spécifiques de type de Streptococcus pyogenes (Groupe A). I. Agglutination passive par des immunosérums de lapin, des hématies tannés sensibilisées par des complexes antigéniques extraits de bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 107(6):809-827, déc. 1964.
40. WRIGHT, G. G. & FEINBERG, R. J. Hemagglutination by tularemia antisera: further observations on agglutination of polysaccharide-treated erythrocytes and its inhibition by polysaccharide. *J. Immunol.*, 68(1):65-71, Jan. 1952.