

BRUCELLOSE BOVINE EXPÉRIMENTALE

X. — HÉMAGGLUTINATIONS PASSIVES APRÈS INFECTION CONJONCTIVALE PAR « BRUCELLA ABORTUS »

Micheline RENOUX *, G. RENOUX, M. PLOMMET et A. PHILIPPON

*Station de Pathologie de la Reproduction,
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,
37 - Nouzilly*

RÉSUMÉ

Une technique d'hémagglutination passive après couplage de la phase soluble de l'antigène standard pour agglutination par le chlorure de chrome a été utilisée pour suivre l'évolution des anticorps antibrucelliques sur 63 génisses, éprouvées par inoculation expérimentale.

L'hémagglutination passive est négative avant l'inoculation ; elle devient positive sur la plupart des animaux dès le 2^e jour après l'inoculation et sur tous, le 7^e jour, à un taux au moins égal au 1 : 100. Cette réaction reste ensuite positive sur toutes les génisses ; les taux sont en particulier très élevés au moment du début de l'excrétion vaginale de *Brucella* (\geq 1 : 1 600) et le jour de la fin de la gestation (\geq 1 : 1 600). Sur 4 génisses, faiblement infectées, et dont les réactions d'agglutination et de fixation du complément présentaient des fluctuations, 3 sont restées positives à l'hémagglutination ($>$ 1 : 100) ; l'une, atteinte d'infection transitoire, a montré des taux variables et faibles.

Dans les semaines précédant un avortement, ou le début de l'excrétion vaginale de *Brucella*, on observe une montée très rapide des titres, indépendamment du délai écoulé depuis l'inoculation.

Ainsi, la réaction d'hémagglutination passive apparaît-elle très sensible, très fidèle et pourrait présenter en pratique un grand intérêt pour le diagnostic de la brucellose bovine.

INTRODUCTION

Le chlorure de chrome couple aux hématies de mouton un antigène soluble extrait de *B. abortus* assurant ainsi des réactions d'hémagglutination passive (RENOUX, DUBOIS et RENOUX, 1968) ou d'immunohémolyse (DUBOIS, RENOUX et RENOUX, 1968).

Le couplage aisé de cet antigène brucellique aux hématies de mouton mène à une réaction de diagnostic : les premiers résultats publiés ont montré que cette réaction était très sensible et spécifique (RENOUX, RENOUX et DUBOIS, 1970).

(*) Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, 37 - Tours.

L'expérience sur l'efficacité de deux vaccins antibrucelliques chez les génisses (PLOMMET *et al.*, 1970) a fourni les échantillons de sérum qui ont permis d'étudier la valeur de la réaction d'hémagglutination passive appliquée au diagnostic de la brucellose bovine dans des conditions très précises de connaissance de l'état des animaux.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Vaccins

a) B 19, vaccin standard, sous forme lyophilisée, fourni par le Docteur HULSE, Central Veterinary Laboratory, Weybridge. Reconstitué au moment de l'emploi, il contient sous le volume de 5 ml de 60 à 80 × 10⁹ cellules vivantes.

b) Le vaccin H 38 est fourni par l'Institut Mérieux, lot 5, préparé en janvier 1966. Il contient 150 × 10⁹ cellules tuées par ml ; on injecte 3 ml sous la peau du fanon.

Épreuve infectante. — Les génisses vaccinées et un groupe témoin, non vacciné, sont éprouvés 16 ou 20 mois après les vaccinations alors que la plupart de ces femelles sont pleines de cinq-six mois et demi, par l'instillation conjonctivale à gauche de 1 goutte d'une suspension titrant, par goutte, 16 × 10⁶ cellules vivantes de *B. abortus*, souche 544.

Génisses. — *Frissonnes*, importées des Pays-Bas de troupeaux indemnes de brucellose, âgées de 117 à 161 jours à leur arrivée. Vingt-cinq génisses sont vaccinées par H 38 et 23 par B 19 alors qu'elles sont âgées d'environ 5 mois ; 15 sont conservées comme témoins de l'épreuve infectante.

Réaction d'hémagglutination passive

1. Préparation de l'antigène.

Il est obtenu à partir des suspensions phénolées concentrées de *B. abortus* (souche 99 ou 1119) utilisées pour la réaction d'agglutination. Après centrifugation et dialyse (membrane Visking, 48 heures contre l'eau du robinet et 24 heures contre de l'eau distillée), le surnageant est concentré et conservé à 4°C. Le poids sec par ml est établi. Au moment de l'emploi, la solution d'antigène est rendue isotonique par du chlorure de sodium.

2. Couplage hématies-antigène.

a) Hématies de mouton. Sang de mouton recueilli aseptiquement sur solution d'Alsever contenant 0,1 p. 100 d'azide de sodium. Les hématies sont lavées trois fois en tampon véronal pH 7,4 et la concentration finale ajustée, par mesure de l'hémolyse à 541 mμ, à 5 × 10⁹ hématies par ml de tampon véronal.

b) Centrifuger une quantité déterminée de suspension à 5 × 10⁹ hématies par ml. A la quantité *n* ainsi choisie d'hématies, ajouter : *n* ml de solution isotonique d'antigène à 500 μg par ml et 0,25 *n* ml d'une solution extemporanée de chlorure de chrome, Cl₃Cr₂, à 1,5 mg par ml. Agiter, laisser 15 mn à la température du laboratoire. Centrifuger. Rejeter le surnageant. Laver trois fois le culot en tampon véronal pH 7,4. Remettre le culot d'hématies couplées en suspension dans un volume 10 *n* de tampon véronal contenant 1 p. 500 de sérum de mouton normal : on obtient ainsi une suspension d'hématies sensibilisées à 5 × 10⁸ par ml.

c) Titrage des hématies couplées à l'antigène. Cette suspension est titrée vis-à-vis d'un sous-étalon de travail, E, dérivé du sérum étalon international, EISA b (Comité O. M. S., 1953) : le titre doit être 1 : 400 000. En outre, des sérums humains ou animaux, connus comme étant positifs ou négatifs, servent à apprécier la qualité des épreuves.

3. Pratique de la réaction d'hémagglutination passive.

En plaque de verre ou de plastique à cupules de capacité 0,50 ml.

a) Préparation des sérums : les sérums dilués au 1 : 5 en tampon véronal sont inactivés par chauffage de 30 mn à 56°C. On adsorbe les agglutinines anti-mouton en ajoutant au sérum décom-

plémenté 1 goutte de culot d'hématies de mouton (lavées 3 fois en tampon véronal) laissée 3 heures à 37°C ; centrifuger ; décanter.

b) Dilution des sérums, en progression géométrique de raison 2, à partir du 1 : 50, par du tampon véronal ; chaque cupule reçoit 0,20 ml de dilution sérique.

c) Addition de l'antigène : placer 0,025 ml de suspension d'hématies sensibilisées dans chaque cupule.

d) Témoins : 1 témoin du sérum, 1 témoin de l'antigène.

e) Mélanger soigneusement en tapotant doucement les côtés de la plaque. Couvrir d'une feuille plastique. Laisser à la température du laboratoire.

f) Lecture, après 18 heures (en pratique, 1 nuit) : + + + +, + + +, + +, +, suivant l'intensité de la réaction, — si aucune hémagglutination (comparer avec les témoins) ; ne tenir compte que du titre final, au moins + +.

g) Taux : jusqu'à présent, jamais un animal ou un homme, indemne de brucellose, n'a présenté un titre hémagglutinant qui soit égal ou supérieur à la dilution sérique 1 : 50.

RÉSULTATS

1. — Délais d'apparition d'une hémagglutination positive après l'épreuve infectante

Toutes les réactions d'hémagglutination passive sont négatives au prélèvement effectué juste avant l'inoculation conjonctivale de 16×10^6 *B. abortus*, souche 544.

Deux jours après l'infection, on observe (tabl. 1) :

— chez les génisses témoins, 14/15 réactions positives à des taux compris entre 1 : 50 et 1 : 1 600 ;

— chez les génisses qui avaient été vaccinées par le vaccin tué H 38, 21/25 réactions positives du 1 : 50 au 1 : 800 ;

— chez les génisses antérieurement vaccinées par le vaccin vivant B 19, 22/23 hémagglutinations positives entre 1 : 50 et 1 : 1 600.

Sept jours après l'infection par *B. abortus* et quel que soit le lot, toutes les réactions d'hémagglutination passive sont positives, au moins au taux de 1 : 100 (tabl. 1).

2. — Résultats des hémagglutinations passives le jour où est isolé la première souche de *B. abortus* dans le mucus vaginal, avant le part

Treize vaches témoins, 17 vaches vaccinées H 38 et 20 vaches vaccinées B 19 ont fourni une culture de *B. abortus* dans leur mucus vaginal, avant la parturition : 15 d'entre elles avaient une réaction d'agglutination négative, avec 7 réactions de fixation du complément également négatives (RENOUX, PLOMMET et PHILIPPON, 1971).

Toutes les réactions d'hémagglutination passive sont positives à des taux compris entre 1 : 1 600 et 1 : 800 000.

TABLEAU I

Titres hémagglutinants spécifiques observés chez les génisses 2 jours et 7 jours après inoculation conjonctivale de Brucella abortus

Témoins = génisses non vaccinées, témoins de l'infection expérimentale

H 38 = génisses vaccinées 16 ou 20 mois auparavant par le vaccin tué H 38

B 19 = génisses vaccinées 16 ou 20 mois auparavant par le vaccin vivant B 19

Les chiffres expriment le nombre d'animaux entrant dans chaque classe ; les chiffres entre parenthèses, le nombre d'animaux en expérience.

Lots	Jours après l'infection	Titres hémagglutinants												
		1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600			
Témoins (15)	2		7	3	1		1							
	7		4	1	5	3	2							
H 38 (25)	2		11	4	2	1	2							
	7		5	5	5	5	2		2	1				
B 19 (23)	2		8	9		1	2							
	7		1	5	6	3	2	2	2	1			1	

3. — Résultats des hémagglutinations passives, le jour de la fin de la gestation

Toutes les génisses pleines, qu'elles aient mis bas à terme malgré l'infection brucellique, qu'elles aient avorté ou donné naissance à un veau prématuré ou mort-né, ont un titre très élevé d'hémagglutination passive au moment où se termine leur gestation. Ce titre est compris entre 1 : 1 600 et 1 : 400 000.

Les génisses vides ont toujours des titres d'hémagglutination plus faibles, quoique positifs : 1 : 100 à 1 : 1 600 le jour de leur abattage.

4. — Hémagglutinations passives des génisses à infection transitoire ou localisée

Une génisse témoin, n° 762, non fécondée ; 2 génisses vaccinées par H 38, parts normaux et 2 génisses vaccinées par B 19, n° 725 non fécondée et n° 740, veau mort-né, montrent une infection brucellique transitoire ou localisée (PLOMMET *et al.*, 1970). En même temps leurs réactions sérologiques classiques, agglutination et fixation du complément, sont variables, tantôt négatives, tantôt faiblement positives (RENOUX, PLOMMET et PHILIPPON, 1971).

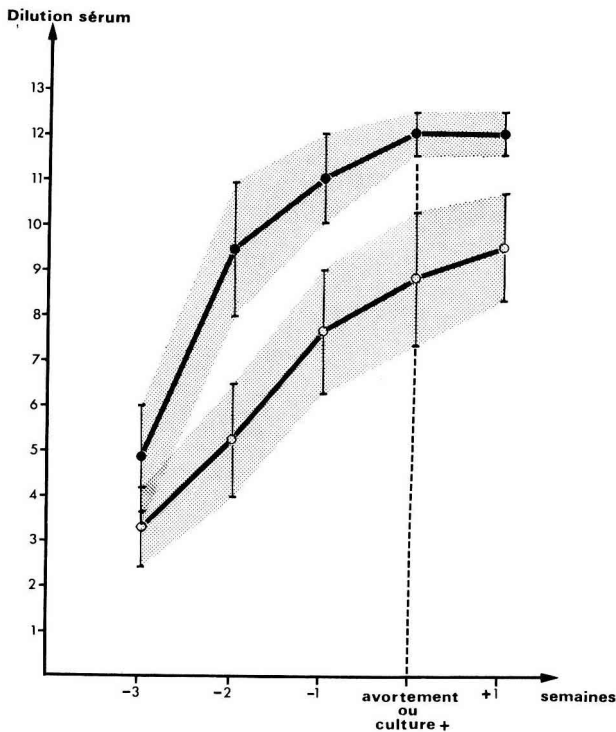


FIG. 1. — Montée des anticorps hémagglutinants avant les avortements ou avant l'isolement de *B. abortus* dans les mucus vaginaux

● génisses avortées

○ génisses qui ont donné une culture positive *ante partum* et n'ont pas avorté

en grisé : écart-type sur la moyenne

Dilution sérum : logarithme des dilutions de 1 : 100 à 1 : 400 000; temps, en semaine, avant ou après l'avortement ou la culture de *B. abortus* dans le mucus vaginal.

Pour 4 de ces animaux, n^{os} 728, 730, 740, 762, les réactions d'hémagglutination passive sont toujours positives à des taux compris entre 1 : 100 et 1 : 12 800 ; la génisse 725 est la seule à montrer des taux variables et faibles, ne dépassant pas 1 : 100, de la réaction d'hémagglutination passive.

5. — *Variation du taux d'hémagglutination passive annonçant une culture positive ou un avortement*

Si l'on place sur un graphique (fig. 1) les taux moyens, et leurs écarts-types, des réactions d'hémagglutination passive dans les semaines qui précèdent un avortement, on constate une brusque montée des taux dans les 15 jours qui précèdent ces avortements ; cette montée des anticorps hémagglutinants est indépendante de l'intervalle de temps écoulé du jour de l'inoculation expérimentale au jour de l'avortement ; les avortements sont apparus entre le 29^e et le 66^e jour après l'épreuve infectante.

On constate une ascension similaire des anticorps hémagglutinants chez les vaches qui n'avorteront pas mais qui fourniront une culture de *B. abortus* à partir d'échantillons de mucus vaginal, avant la parturition pour les vaches pleines, ou chez des vaches non fécondées (PHILIPPON, RENOUX et PLOMMET, 1970). Cette montée d'anticorps est, ici aussi, indépendante du laps de temps entre l'épreuve infectante et cette première culture positive : de 11 à 63 jours. Cependant, dans ce cas, l'ascension des taux d'anticorps hémagglutinants est significativement plus faible que chez les vaches qui avorteront.

DISCUSSION

Les sérums de 63 génisses, dont 48 avaient été vaccinées 16 ou 20 mois plus tôt par B 19 ou par H 38, sont tous négatifs à la réaction d'hémagglutination passive avant l'infection expérimentale par *B. abortus*, souche 544.

Ce résultat confirme des observations antérieures à propos de la brucellose humaine, sur la réelle spécificité de la réaction d'hémagglutination passive utilisant un antigène soluble de *B. abortus* couplé aux hématies de mouton par le chlorure de chrome (RENOUX, RENOUX et NOURRAIN, 1970). Très vite après l'infection brucellose, la réaction d'hémagglutination passive décèle les anticorps spécifiques : en effet, 57 sérums sur 63 (90,5 p. 100) sont positifs à des taux supérieurs ou égaux à 1 : 50 dès le 2^e jour qui suit l'inoculation expérimentale. On peut donc penser que malgré le faible nombre de *B. abortus* (15×10^6) déposé à la surface de la conjonctive, la multiplication des *Brucella* est immédiatement assez ample pour qu'un nombre suffisant d'immunocytes soient impliqués dans la production des immunoglobulines spécifiques. Une autre hypothèse est admissible : certains sérums dilués au millionième, parfois au trois millionième, ont donné, sous le volume de 0,2 ml, une réaction d'hémagglutination positive ; cela revient à dire que cette réaction révèle l'anticorps contenu dans moins d'un nanogramme (10^{-9} gramme) d'immunoglobuline ; par suite, la très grande sensibilité de l'hémagglutination passive permettrait la mise en évidence de très faibles quantités d'anticorps spécifiques sans qu'il soit nécessaire de postuler une rapide multiplication des bactéries.

Sept jours après l'inoculation conjonctivale de *B. abortus*, les sérums des 63 génisses présentent des taux d'anticorps hémagglutinants souvent élevés, toujours suffisants pour le diagnostic sérologique de la brucellose bovine.

Ensuite, les taux d'hémagglutination passive sont toujours élevés, plus ou moins en rapport avec l'intensité de l'infection brucellique et indépendamment de la classe d'anticorps, IgM ou IgG, en cause (RENOUX, PHILIPPON et PLOMMET, 1971). Une réaction d'hémagglutination passive fortement positive ($\geq 1 : 1\ 600$) est toujours notée au moment de la mise bas, même à terme, si la vache est brucellique.

Dans la même expérience, près de 13 p. 100 des vaches posent un problème particulier car, pendant toute la durée d'observation, elles ont présenté moins de 80 UI agglutinantes dans leur sérum ; au moment des excréctions vaginales de *B. abortus* ou des mise bas, normales ou pathologiques, 81 p. 100 des fixations du complément et 55 p. 100 des réactions d'agglutination sont positives, 8 p. 100 des résultats sont négatifs aux 2 réactions (RENOUX, PLOMMET, PHILIPPON, 1971) : dans tous ces cas, la réaction d'hémagglutination passive est toujours positive à des taux élevés.

Bien plus, comme si la pullulation, ou la mobilisation de *B. abortus* avant un avortement ou avant l'excrétion vaginale de ces bactéries créait une stimulation rapide et intense de la production d'anticorps hémagglutinants, on remarque une montée brutale de ces anticorps dans les semaines précédant l'accident pathologique. Théoriquement, la mesure de l'ascension d'anticorps pourrait être un moyen de pronostic. Cependant, il est concevable de pouvoir dire qu'en pratique une femelle pleine présentant un très fort taux d'hémagglutinines, par exemple égal ou supérieur à $1 : 12\ 800$, a plus de chances d'avorter à court terme, ou d'éliminer *B. abortus*, qu'une autre vache dont le sérum donnerait une réaction positive mais à un titre moins élevé.

Ainsi, la réaction d'hémagglutination passive, utilisant un antigène soluble de *B. abortus* couplé aux hématies par le chlorure de chrome (RENOUX, DUBOIS, RENOUX, 1968 ; RENOUX, RENOUX, DUBOIS, 1970), paraît dans le cadre de cette expérience être une épreuve très sensible et très fidèle de diagnostic de la brucellose bovine.

Reçu pour publication en juin 1971.

SUMMARY

EXPERIMENTAL BOVINE BRUCELLOSIS.

X. — PASSIVE HAEMAGGLUTINATION AFTER CONJUNCTIVAL INFECTION WITH *BRUCELLA ABORTUS*.

A technique of passive haemagglutination after coupling the soluble phase of the standard agglutination antigen with chromium chloride was used to follow the development of antibrucellosis antibodies in 63 experimentally inoculated heifers.

Passive haemagglutination was negative before inoculation, but became positive in the majority of animals on the 2nd day after inoculation, and in every animal by the 7th day ; the titer was $\geq 1 : 100$. The reaction remained positive thereafter in all animals, the titers being very high particularly at the start of vaginal excretion of *Brucella* ($\geq 1 : 1\ 600$) and on the last day of gestation ($\geq 1 : 1\ 600$). Four weakly infected heifers showed fluctuations in agglutination and complement fixation reactions, but 3 of these remained positive in haemagglutination tests ($> 1 : 100$), and one heifer, which showed a transitory infection, gave low and variable titers.

In the weeks before an abortion or the start of vaginal excretion of *Brucella*, the titers rose very rapidly independently of the time since inoculation.

Thus, the haemagglutination reaction appears to be very sensitive and very reliable, and may be of great interest in the practical diagnosis of bovine brucellosis.

РЕЗЮМЕ

Экспериментальный бруцеллез у крупного рогатого скота. X. Пассивные гемагглютинации после конъюнктивального заражения *Brucella abortus*.

Техника пассивной гемагглютинации после соединения ратворного фаза стандартного антигена для агглютинации хлористым хромом употреблялась чтобы следить за эволюцией противо бруцеллезных антител у 63 подопытных тёлочек, которые подверглись экспериментальной инокуляции.

Пассивная гемагглютинация отрицательная до инокуляции; она становится положительной у большинства животных со 2-го дня после инъекции, и у всех, на 7-ой день. Пропорция по меньшей мере равняется 1:100. После чего эта реакция остаётся положительной у всех тёлочек; пропорции особенно большие в момент начала влагалищных выделений *Brucella* ($\geq 1:1.600$) и в день конца стельности ($\geq 1:1.600$). На 4 тёлки, со слабой инфекцией, и у которых реакция гемагглютинации и фиксации комплемента представляли флуктуации, 3 остались положительными к гемагглютинацией ($> 1:100$); одна, поражённая временной инфекцией, показала настоящие но слабые пропорции.

За несколько недель до выкидыша, или при начале влагалищных выделений *Brucella*, замечают быстрое увеличение титров, независимо от того сколько времени прошло после инокуляции.

Таким образом реакция пассивной гемагглютинации оказывается очень чувствительной, очень надёжной и могла бы на практике представить собой высокий интерес для определения диагноза бруцеллеза у крупного рогатого скота.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COMITÉ MIXTE FAO/OMS d'Experts de la Brucellose. 2^e Rapport, 1953. *Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn.*, **87**.
- DUBOIS M. P., RENOUX M., RENOUX G., 1968. Immunohémolyse après sensibilisation par le chlorure de chrome : application à une hormone protidique et à une glycoprotéine bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur*, **115**, 979.
- PHILIPPON A., RENOUX G., PLOMMET M., 1970. Brucellose bovine expérimentale. III. Excrétion vaginale de *Brucella abortus* avant et après la mise bas. *Ann. Rech. vétér.*, **1**, 215-224.
- PLOMMET M., RENOUX G., PHILIPPON A., LORENTZ C., GESTIN J., 1970. Brucellose bovine expérimentale. I. Comparaison de l'efficacité des vaccins B 19 et H 38. *Ann. Rech. vétér.*, **1**, 189-201.
- RENOUX G., RENOUX M., NOURRAIN G., 1970. Brucellose à *Brucella abortus* chez l'homme en France. Une enquête en Indre-et-Loire. *Sem. Hôp.*, **48**, 2015-2023.
- RENOUX G., PLOMMET M., PHILIPPON A., 1971 a. Brucellose bovine expérimentale. VIII : Évolution des anticorps agglutinants ou fixant le complément après inoculation par *Brucella abortus* au 5-6^e mois et demi de la gestation. *Ann. Rech. vétér.*, **2**, 159-171.
- RENOUX G., PHILIPPON A., PLOMMET M., 1971 b. Brucellose bovine expérimentale. IX. Évolution des anticorps IgM et IgG chez des génisses primogestantes, vaccinées par vaccin vivant B 19 ou vaccin inactivé H 38 après leur infection, par *Brucella abortus*. *Ann. Rech. vétér.*, **2**, 173-183.
- RENOUX M., DUBOIS M. P., RENOUX G., 1968. Hémagglutination après couplage par le chlorure de chrome d'une glycoprotéine bactérienne, échec de la benzidine. *Ann. Inst. Pasteur*, **115**, 978.
- RENOUX M., RENOUX G., DUBOIS M. P., 1970. Couplage au chlorure de chrome et hémagglutination appliquée au diagnostic des brucelloses. *Internat. Symp. Brucellosis*, Tunis 1968 ; *Symp. séries immunobiol. Standard.*, **12**, pp. 355-360, Karger Basel, New York.