

Recherches immunologiques sur la Péripleurmonie

1^{re} partie : La réaction d'agglutination

par A. PROVOST et R. QUEVAL

I. — HISTORIQUE

On lit, sous la signature de Dujardin-Beaumetz (4), ces lignes : « Avant que Heslop, en 1920, ait repris la question de la séro-agglutination, on avait remarqué que le sérum des bovins, malades ou infectés naturellement, n'exerçait qu'un pouvoir agglutinant très faible et inconstant sur les cultures péripleurmoniques. Du fait de ces réactions médiocres, on estimait que la réaction de l'agglutination ne pouvait servir à dépister la maladie. »

Heslop (8) fut plus heureux en utilisant une souche de laboratoire repiquée vingt fois et la technique d'agglutination lente en tube ; il obtint des réactions positives supérieures au 1/80 ; il reconnaissait cependant que l'interprétation de la réaction était délicate.

Nakamura, Futamura et Watanuki (11) d'une part, Ito, Yamagiwa et Anbo (9) d'autre part, arrivent à des conclusions similaires. Seuls, Titze, Giese et Wedemann (24) et Seelemann (22) accordent quelque valeur à ce test dans les cas cliniques mais le rejettent pour le diagnostic des cas chroniques. En 1938, Campbell (2) utilisant un antigène de culture formolée, conclut que la réaction d'agglutination en tube bien qu'inférieure à la déviation du complément, est applicable au diagnostic de la péripleurmonie, mais n'assure pas la détection des porteurs de germes. Il en rejette l'application pratique.

Il faut attendre 1951 pour que Priestley (16) signale les très bons résultats qu'il obtient en « floculation » (*) sur lame avec l'antigène concentré de Campbell pour déviation du complément et des

sérums d'animaux malades ou vaccinés. Puis en 1953, Newing et Field (12) décrivent le test d'agglutination sur lame, utilisant le sang total et un antigène coloré et montrent tout l'intérêt de son emploi dans le diagnostic et la prophylaxie. Après avoir amélioré la préparation de l'antigène (13), Newing (14) montre la supériorité de la réaction d'agglutination sur lame sur la déviation du complément, la première se montrant plus sensible que l'autre et capable de détecter certains porteurs chroniques.

L'extinction de la peste bovine, tout au moins sous sa forme épizootique, peut être envisagée à brève échéance avec les vaccins efficaces dont on dispose actuellement ; de ce fait la péripleurmonie représente dans le Centre-Afrique la maladie d'endémicité la plus répandue avec les trypanosomiasés. Les méthodes de lutte employées jusqu'alors (vaccination willemsienne et quarantaine) ont été incapables d'assurer le contrôle et l'éradication de la maladie et il semble bien, dans l'état social actuel qu'une prophylaxie raisonnée soit impossible. Le problème est quelque peu différent au Tchad et au Cameroun :

— Au Tchad, Far-West du continent africain, seule une immunisation de masse est concevable, pour les raisons qu'a expliquées Receveur (20) : nécessité de la transhumance, indiscipline des propriétaires. L'usage d'un test sérologique n'aura d'intérêt que pour des collectivités de bétail vivant en vase clos, telles les fermes expérimentales ou les ranchs d'élevage.

— Au Cameroun, et plus spécialement dans les régions du Nord, où la transhumance est plus limitée et où existent des pâturages de quarantaine, un test sérologique applicable sur le terrain serait d'une très grande utilité.

(*) Terme impropre, que cet Auteur vient de corriger ; il s'agit d'une agglutination.

C'est donc dans le but pratique de l'application sur le terrain, en brousse, que nous avons entrepris l'étude de l'agglutination sur lame. Nous exposons ici la technique de préparation de l'antigène et les résultats obtenus. Nous nous sommes efforcés de standardiser au maximum la préparation de l'antigène et l'épreuve, sans cependant introduire de données trop complexes. Nous signalerons chemin faisant les réflexions que nous nous sommes faites dans la pratique du test.

II. — PRÉPARATION, STANDARDISATION ET ESSAIS DE L'ANTIGÈNE

1. — Souches de *Mycoplasma mycoides* utilisées (*).

Toute souche de *Mycoplasma mycoides* se prête à la préparation de l'antigène; ce dernier peut être même constitué par un mélange de deux ou trois souches. Dans un but de normalisation on pourrait souhaiter utiliser une souche commune dans les divers laboratoires, bien qu'il semble que toutes les souches aient les mêmes caractéristiques antigéniques.

Les souches employées pour ce travail ont été isolées de sérosités pulmonaires recueillies sur des bovins ayant succombé à la maladie naturelle et leur pouvoir pathogène fut évalué par inoculation à des bouvillons de la première subculture à la dose de 1 millilitre par voie sous-cutanée. Les animaux, après inoculation, présentent le phénomène de Willems d'un délai d'apparition assez variable suivant la virulence de la souche et succombent entre le 19^e et 25^e jour après l'inoculation.

L'agent causal de nouveau isolé par filtration de la sérosité sous-cutanée est utilisé pour l'ensemencement des milieux de culture.

Pour l'isolement du germe à partir du tissu pulmonaire, de la lymphe, des ganglions rétro-pharyngiens ou préscapulaires, nous procédons comme suit : un échantillon des tissus ci-dessus énumérés est broyé dans un mixer avec quelques millilitres de bouillon, centrifugé légèrement pour débarrasser le mélange des grosses particules puis filtré sur Seitz E. K. De cette façon, on obtient aisément un inoculum suffisamment riche pour assurer le développement des organismes dans les milieux de culture, sans contamination. Cette technique nous a permis d'isoler, entre autres, les souches suivantes utilisées pour la préparation de l'antigène : B13, 20 Oe, T2/3, Maroua I. Signalons que la souche T3 du Kenya (15), reçue à son 33^e passage sur œuf embryon-

né, fut repiquée sur les milieux de culture liquides appropriés et également utilisée comme source d'antigène.

2. — Milieux de culture.

Il est classiquement admis que la culture de l'agent causal de la péripneumonie s'effectue sur les milieux de culture usuels (bouillon peptoné, bouillon Martin) additionnés de facteurs de croissance (liquide d'ascite, sang ou mieux sérum). Cependant, l'apport d'un facteur de croissance au milieu de culture sous forme de sérum, par exemple, ne conduit pas toujours pour une même souche au même développement des cultures car nous avons constaté, ainsi que d'autres auteurs et contrairement à ce qui a été observé à Dakar par Mornet et Orue (10) que les sérums d'animaux n'ont pas une efficacité équivalente. Des recherches effectuées par Tang (23) et Freundt (6), il ressort que les sérums humain et équin, ont donné davantage de satisfaction et sont les plus couramment utilisés.

Au début de nos études, nous avons utilisé le milieu de culture liquide préconisé par Turner, Campbell et Dick (25), enrichi par l'addition de 20 p. 100 de sérum de zébu; la seule modification apportée à ce milieu de base a été la préparation de la digestion de foie et de viande effectuée avec une pepsine commerciale au lieu de l'emploi d'estomacs de porcs. Nous nous aperçûmes par la suite que les sérums d'animaux différents convenaient plus ou moins bien et que certains étaient incapables d'assurer la croissance du germe. Cet écueil est dû à deux faits :

— certains sérums contiennent des anticorps bactéricides;

— le taux en cholestérol du sérum de zébu, tout au moins au Tchad, est à la limite inférieure requise pour assurer la croissance du micro-organisme (19).

Nous fûmes donc amenés à modifier de nouveau ce milieu de culture : au milieu de base initial de Turner, Campbell et Dick additionné de 10 p. 100 de sérum de cheval on ajouta du cholestérol comme l'indiquent Edward et Fitzgerald (5), sous la forme d'une suspension aqueuse finement dispersée, à des concentrations de 0,1 à 0,3 milligramme par millilitre de milieu. Manifestement l'adjonction de cholestérol à nos milieux permit de luxuriantes cultures; par contre ce produit bien qu'à l'état finement dispersé, a l'inconvénient de donner un milieu fortement opalescent si bien que l'appréciation des cultures ne peut se faire par un simple examen macroscopique mais obligatoirement par contrôle de la culture au microscope à contraste de phase. Si cette dernière méthode de culture utilisant le cholestérol comme facteur de croissance fût provisoirement rejetée, nous pensons exposer dans une note ulté-

(*) Nous adoptons la terminologie *Mycoplasma*, en accord avec la règle de nomenclature de EDWARD et FREUNDT (*J. Gen. Micr.* 1956, 14, 197, et *Intern. Bull. of Nomencl.*, (1955), 5, 13).

rieure une technique permettant d'éviter l'écueil signalé (19).

Nous avons également employé à la place de sérum, la PPLO-sérum-fraction Difco (*) au taux de 2 p. 100 dans ce même bouillon de Turner, Campbell et Dick; les cultures furent bonnes, avec un milieu clair, facilement lisible. L'utilisation en pratique courante de la PPLO-sérum-fraction Difco ne fut pas retenue en raison de son prix de revient.

Après ces variantes du milieu de Turner, Campbell et Dick on employa un milieu de culture classique à base de digestion de viande, peptoné (bacto-peptone Difco à 10 p. 1.000), salé, ajusté à pH 7,6-7,8 et additionné d'un tampon aux phosphates puis, après stérilisation, de 20 p. 100 de sérum de cheval traité par le cholestérol (19). Le développement des micro-organismes dans ce milieu se révèle par une nette opalescence, à l'exception du quart inférieur du tube où le bouillon reste clair après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°. Ce fait souligne le caractère aérobique du germe. Après 48-72 heures, l'opalescence est totale et s'accroît progressivement avec le vieillissement de la culture.

Les résultats enregistrés avec ce milieu furent pleinement satisfaisants mais de fabrication trop longue et peu pratique pour une production d'antigène à grande échelle; aussi avons-nous été amenés à utiliser couramment dans notre laboratoire un milieu de culture recommandé par Difco pour les organismes fastidieux à cultiver (milieu B60 de Difco). Il est constitué comme suit :

Bacto-tryptose (B124)	2 %
Glucose	0,2 %
Chlorure de sodium	0,5 %
Phosphate disodique	0,25 %
Bacto-yeast extract (B127) .	5 %
Sérum de cheval.....	10 %
Eau	100 ml

A l'exception du sérum de cheval tous les ingrédients sont mélangés et dissous dans l'eau. Le milieu est ajusté au pH 7,5-7,6 et réparti à raison de 1 litre dans des ballons de 2 litres puis stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à une température de 120°. Au moment de l'emploi, le sérum de cheval filtré sur filtre Seitz E.K. est ajouté au milieu de culture et le mélange final de nouveau stérilisé sur filtre Seitz E.K.

3. — Ensemencement, culture et récolte des organismes.

Après filtration, l'inoculum est ajouté au milieu ainsi que 200.000 unités de Pénicilline ou à défaut de l'acétate de thallium (0,0125 par millilitre) pour parer à l'envahissement éventuel du milieu par des germes de contamination.

(*) Difco Laboratoires, Detroit I, Michigan. U.S.A.

M. et Mrs Rodwell (21) et Newing (13) ont montré que le développement des cultures en bouillon était stimulé de façon remarquable par aération, aussi réalisons-nous une culture dite « aérée » à l'aide d'un agitateur magnétique Jouan qui permet de créer dans le bouillon nutritif une turbulence d'intensité réglable, en atmosphère stérile et sans formation de mousse. On peut suivre à l'œil nu, dans le milieu, l'aération par des bulles d'air finement dispersées.

Lors de l'ensemencement, on immerge stérilement dans le milieu de culture un barreau de fer doux. Le ballon placé sur le capot de l'appareil, l'ensemble est mis à l'étuve à 37° pour l'incubation. Les ballons ensemencés sont ainsi cultivés pendant 72 heures et aérés quotidiennement à différentes reprises. Durant la période d'incubation, les milieux deviennent de plus en plus opalescents et en fin d'incubation un trouble homogène traduit le terme de la culture. Il est à noter la formation de « comètes » (longs filaments décrivant des volutes) au sein du milieu de culture avec une souche utilisée (T3) (*).

Le contrôle de pureté des cultures s'effectue à l'examen direct entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase.

Pour réaliser la séparation des micro-organismes du milieu de culture nous utilisons à défaut d'une centrifugeuse à flot continu du type « Sharples », un centrifugeur Jouan, type CS1, d'une vitesse de rotation égale à 12.000 tours par minute en centrifugation oblique avec des pots enrobés.

Selon les données de Dole et Cotzias (3) les normes de la centrifugation calculées sont les suivantes : vitesse de rotation 12.000 tours par minute et durée : 14 minutes.

4. — Standardisation et coloration de l'antigène.

Dans la description technique exposée ci-dessous la plupart des détails relatifs à la préparation de l'antigène sont puisés à la documentation fournie par Newing et Field (12). Les organismes, après centrifugation et élimination du surnageant sont rassemblés en un culot de couleur blanche et d'aspect crémeux. Après égouttage soigné du sédiment le culot est remis en suspension dans quelques millilitres d'eau physiologique jusqu'à ce que l'on obtienne une suspension crémeuse que l'on amène à trois fois l'opacité du tube n° 10 de l'échelle d'opacité de Brown (où à défaut de cette gamme à six fois

(*) Nous nous permettons, à ce propos, de n'être pas d'accord avec l'affirmation de PIERCY et KNIGHT (15) selon laquelle seules les souches filamenteuses sont virulentes et les souches virulentes toujours filamenteuses. Nous disposons de souches très virulentes (STEC 1; TREC 1; Maroua 1) et qui n'ont jamais montré les "comètes" de la souche T3 Kenia, dont la virulence n'est d'ailleurs que moyenne.

l'opacité du tube n° 10 de l'échelle opacimétrique de Mac Farland).

A cette suspension standardisée, on ajoute une solution aqueuse de violet de méthyle (*) à 1 p. 100, dans une proportion telle que la préparation antigénique contienne 3 millilitres de colorant dans 100 millilitres du mélange final.

Pour intensifier la coloration, l'antigène coloré est chauffé au bain-marie bouillant pendant 30 minutes en agitant doucement; on refroidit à l'eau courante et les organismes colorés et tués sont centrifugés à la vitesse de rotation de 10.000 tours par minute pendant 15 minutes. Le liquide surnageant éliminé, on remet en suspension ce culot coloré dans le mélange décrit ci-dessous, de manière à obtenir le volume liquide primitif.

On doit noter que la centrifugation, opérée après le processus de coloration, donne un liquide surnageant clair car le colorant est fixé sur les micro-organismes; si la solution colorante a été mal préparée ou filtrée, on peut observer dans le culot microbien de petites particules de colorant. Dans un tel cas il convient de laver les organismes une ou deux fois en mettant en suspension le culot et en centrifugeant dans une solution physiologique légèrement acidifiée.

Le liquide servant à remettre le culot en suspension est le suivant :

— 0,2 p. 100 de citrate de sodium, pour éviter la coagulation lors de l'exécution du test sur le sang total;

— 1 p. 100 de glycérine à la concentration finale de 1/500 dans le but de maintenir la suspension antigénique homogène;

— merthiolate à la concentration finale de 1/5.000 comme agent de conservation;

— eau physiologique : q. s. volume primitif.

L'antigène ainsi préparé est conditionné dans des flacons de type pénicilline de 50 millilitres contenant de petites perles de verre d'un diamètre de 2 millimètres. Les flacons bouchés et capsulés sont fixés sur un agitateur vibreur (Jouan) dont l'arbre est animé d'un mouvement vibratoire autour de l'axe longitudinal; l'appareil est mis en marche à une vitesse d'oscillation de 500 par minute pendant 20 minutes. On réalise ainsi une division et une homogénéisation des corps microbiens qui permettent d'obtenir des particules suffisamment petites pour avoir une bonne stabilité de l'antigène.

Parvenu au stade final de sa préparation la suspension antigénique standardisée est prête à être utilisée sans dilution pour l'exécution des tests de contrôles de spécificité et de la sensibilité après

(*) Des essais de coloration avec le bleu de tétrazolium, le vert malachite et le vert brillant sont en cours. Le but de ces recherches est d'obtenir un meilleur contraste lors de l'épreuve sur le sang total.

une maturation de 24 heures à une température de + 4°. Signalons qu'en suivant scrupuleusement cette méthode, les lots d'antigènes préparés se sont montrés égaux et que nous n'avons jamais observé d'auto-agglutination.

5. — Test de sensibilité.

A cette fin, il est procédé à des épreuves comparatives avec différents sérums de référence. Ces sérums sont de 5 sortes :

- un sérum lapin anti-mycoplasma;
- un sérum bovin hyperimmun;
- un sérum bovin, d'un animal cliniquement malade;
- un sérum bovin, d'un animal « porteur chronique »;
- un sérum bovin normal.

Les 4 premiers sérums éprouvés par le test d'agglutination rapide sur lame sont positifs à divers degrés d'agglutinabilité fonction du complexe antigène-anticorps mis en présence.

Quant au sérum normal, tous les tests doivent être (et sont) négatifs.

Des lots successifs d'antigène aucun ne suscita de réactions non spécifiques et les résultats furent sûrs et constants.

La conservation de l'antigène est bonne à + 4° comme à température ordinaire.

III. — EMPLOI DE L'ANTIGÈNE COLORÉ = TECHNIQUE, LECTURE, RÉSULTATS.

Le test d'agglutination sur lame est applicable sur le sérum comme sur le sang total. On conçoit d'emblée l'utilité de cette dernière technique en brousse.

1. — Matériel :

On se sert de lames de verre ordinaires, propres et dégraissées. L'emploi d'une boîte d'épreuve telle qu'elle est décrite dans le test standardisé d'agglutination pour la brucellose (27) est inutile : la température ambiante, en Afrique équatoriale française, est toujours suffisamment élevée pour qu'il soit inutile de chauffer les lames et notre expérience (voir plus bas) nous a montré que la température n'intervenait que d'une façon insignifiante dans la réaction.

On utilise comme agitateurs des bâtonnets de bois dont les extrémités peuvent être brisées et éliminées après chaque épreuve; c'est une discipline qu'il faut prendre dans les tests en série, car la pratique montre que la minime quantité d'anticorps transportée par l'agitateur peut suffire à faire virer une réaction négative.

Des compte-gouttes ordinaires servent à répartir sérums et antigène. Quand on utilise le sang total, on prend une goutte de sang à l'oreille du bovin par ponction de la veine auriculaire; en appliquant plus ou moins la lame sur la plaie veineuse, on s'arrange pour que la goutte de sang soit de la grosseur d'une goutte de sérum; il faut prendre soin de recueillir le sang total et non la lymphe qui s'écoule de la blessure cutanée. Avec le sang total, il ne faut pas différer la réaction, de façon à ce que le sang n'ait pas le temps de coaguler avant l'addition d'antigène.

2. — Méthode :

On dépose 1 goutte d'antigène sur la goutte de sang ou de sérum et on mélange intimement avec l'agitateur. On peut également basculer la lame deux ou trois fois d'avant en arrière. Cette dernière technique n'a vraiment d'intérêt que pour les sérums

très faiblement positifs (un + de notre notation) : les agglutinats qui se forment sont alors rejetés à la périphérie de la goutte où ils sont plus facilement visibles qu'au centre.

3. — Interprétation :

Le temps de réaction (ou vitesse d'apparition des agglutinats) est variable de 2 secondes à 3 minutes. On peut considérer qu'après ce temps, un sérum qui n'a pas encore agglutiné est négatif; nous ne connaissons qu'une exception sur plus de 2.000 réactions : celle d'un sérum (positif ++) qui a agglutiné en 4 minutes 10 secondes.

La réaction positive se caractérise par l'apparition dans les limites de temps indiquées, d'agglutinats colorés en bleu, formant des masses plus ou moins grosses au sein du liquide. Dans un but de standardisation de la réaction, nous notons les intensités d'agglutination de la manière suivante : (figure 1).

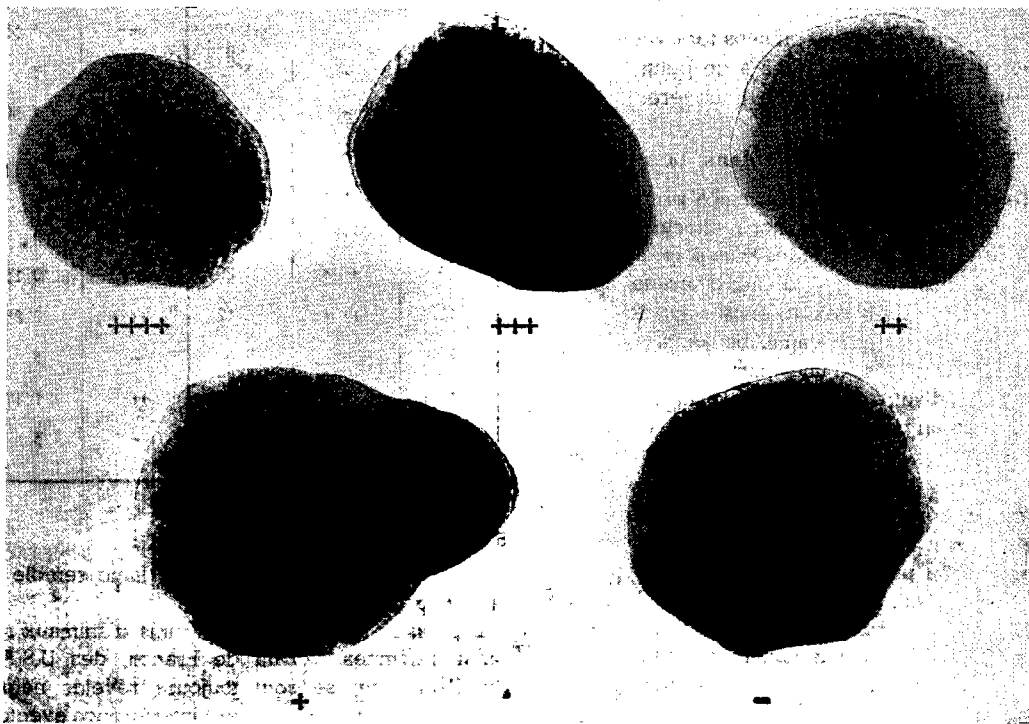


Fig. 1 — Intensité d'agglutination.

++++ : environ 100 p. 100 d'agglutination (avec de gros agglutinats).

+++ : 75 p. 100 d'agglutination (avec de gros agglutinats).

++ : 50 p. 100, agglutination poussiéreuse; mais encore facilement lisible.

+ : agglutination très faible, en grains de poussière, surtout lisible sur le bord de la goutte.

Nous avons choisi la notation adoptée pour l'agglutination sur lame dans la brucellose; le type en est le même et il a été standardisé par l'O.M.S. et la F.A.O. (26).

Il semble qu'il y ait une relation grossière, mais non absolue, entre le temps de réaction et l'intensité d'agglutination : un sérum agglutinant en quelques secondes donnera la plupart du temps de gros agglutinats; mais pour un autre sérum, l'inverse peut être vrai.

Toutes conditions étant les mêmes, (volume des gouttes, température qui n'a que peu d'importance), le temps de réaction et l'intensité d'agglutination sont des caractéristiques d'un sérum. Cependant, pour un même sérum, elles évoluent dans le temps en fonction de la transformation des anticorps de l'animal donneur.

Il faut se garder de prendre pour des agglutinats de *Mycoplasma* les petits agglutinats de plaquettes sanguines que l'on peut quelquefois observer sur les réactions faites avec du sang total : les derniers sont translucides alors que les premiers sont nettement colorés en bleu. Le bon sens fera vite éliminer les pseudo-agglutinations dues à de petits filaments de fibrine ou à des grains de poussière.

4. — Facteurs intervenant dans la réaction :

a) **Température.** — Un vétérinaire praticien nous ayant signalé que les réactions effectuées sur le sang total étaient plus rapides quand on approchait l'extrémité incandescente d'une cigarette sous la lame, nous avons fait l'expérience suivante : treize sérums inconnus (troupeau Aboukanta, Ouaddai, Tchad) furent testés d'une part en pièce climatisée (25°) et d'autre part sur une platine chauffante électrique Jouan pour histologie, donnant une température locale de 62°. Le tableau I résume les résultats.

De l'examen du tableau il ressort :

— qu'un sérum négatif reste toujours négatif quelle que soit la température;

— qu'il n'y a pas de corrélation entre l'intensité-vitesse de réaction et l'augmentation de la température : certains sérums (2, 9) agglutinent plus vite, d'autres (3, 5, 10, 12) plus lentement. Mais ici vient s'intriquer un autre facteur que nous allons maintenant examiner.

b) **Etat hygrométrique.** — A notre avis, son importance est énorme en Afrique, spécialement dans les climats sahéliens, où le degré hygrométrique est nul ou insignifiant pendant 3 mois de l'année. De toute façon, il n'intervient jamais pour rendre positif un sérum négatif, mais a une action certaine sur la vitesse, sinon sur l'intensité de la réaction. En effet, quand le degré hygrométrique est nul ou bas, il se produit une concentration du mélange antigène-

anticorps par évaporation d'eau. L'antigène étant figuré, il ne peut se concentrer et on aboutit finalement à une concentration de l'anticorps par rapport à l'antigène, ce qui transforme un sérum faiblement positif en un sérum fortement positif. Ceci n'a aucune importance en brousse, car le devenir d'un animal sera le même dans une prophylaxie raisonnée, qu'il réagisse faiblement ou fortement.

TABLEAU I

N° DES SERUMS	REACTION A 25°		REACTION A 60°	
	Intensité	Temps en minute	Intensité	Temps en minute
1	-	3	-	3
2	+++	1 25	+++	0 25
3	+++	1 05	+++	1 55
4	-	3	-	3
5	++	1 32	++	1 30
6	-	3	-	3
7	-	3	-	3
8	-	3	-	3
9	+++	0 20	+++	0 15
10	+++	0 12	+++	0 25
11	-	3	-	3
12	++	0 30	++	1 17
13	-	3	-	3

5. — Spécificité de la réaction :

La réaction d'agglutination sur lame semble être spécifique.

Les essais faits avec des sérums d'animaux sûrement indemnes, venant de France, des U.S.A. et du Cameroun, se sont toujours révélés négatifs. Il reste cependant à préciser l'interférence éventuelle que peut apporter l'actino bacillose dans ce test, car on a signalé en Australie (7) une déviation du complément positive dans un cas d'actino bacillose. Il faut, dans cet ordre d'idée, se demander quel rôle peut jouer le farcin dans la spécificité de la réaction, car *Nocardia* et *Actinobacillus* possèdent des antigènes communs. Pour être complet, mentionnons que Heslop (8) avait signalé que les sérums des veaux atteints de cow-pox réagissaient positi-

vement en déviation du complément avec l'antigène péripneumonique. A notre connaissance, cette affection, étant inconnue au Tchad, ne peut point troubler la spécificité du test. Une publication, en cours d'étude, précisera ce point (18).

6. — Sensibilité de la réaction :

a) Détection des cas de péripneumonie confirmés.

Sur 65 animaux testés en pleine évolution de péripneumonie, 59 montrèrent des agglutinats massifs, apparaissant en quelques secondes. Six furent négatifs; ces animaux étaient à la dernière extrémité, et devaient mourir quelques heures plus tard (*). Nous ne pensons pas qu'il faille voir dans ces réactions négatives un échec. L'expérience suivante, facilement réalisable, expliquera pourquoi :

Si l'on prend une goutte de sérum d'un animal mourant de péripneumonie et qu'on le mélange sur lame avec une goutte d'un sérum positif +++ ou +++++, on voit apparaître au bout de quelques secondes des flocculats (et non des agglutinats, ainsi, qu'on peut s'en rendre compte au microscope à contraste de phase). Une seule hypothèse est vraisemblable : le sérum de l'animal mourant de péripneumonie a joué le rôle d'antigène, car son torrent circulatoire est envahi par les antigènes libérés au niveau des foyers infectieux. Cette quantité massive d'antigènes neutralise les anticorps circulants, extériorisant ainsi sur lame une réaction négative pour les animaux que nous avons signalée plus haut. Le fait que nous venons de décrire a été également rapporté par Dafaalla à la conférence de Khartoum (1957). Ceci est donc une limite à l'application de la détection des cas cliniques; la réaction détectera sûrement la péripneumonie évolutive ou à son début, mais sur un animal en mauvais état, ou mourant, une réaction négative ne devra pas faire éliminer la maladie.

b) Détection des animaux guéris et des porteurs chroniques :

Le dépistage de ces derniers a une importance particulière, car ce sont eux qui entretiennent la pérennité de la maladie dans un troupeau et essaient l'infection au cours des transhumances et des transactions.

Dans un lot de 13 animaux traités au Novar, 6 furent trouvés positifs. Malheureusement, il fut impossible d'abattre les animaux pour vérifier les lésions et la présence du micro-organisme.

Dans un autre troupeau de 56 têtes (voir tableau II), 32 donnèrent des réactions d'agglutination positives. Parmi ces derniers, 26 montraient des lésions attri-

buables à la péripneumonie. A partir des ganglions ou des amygdales des 6 autres animaux, nous avons pu isoler à chaque fois *M. mycoïdes*. Il s'agissait donc de porteurs chroniques. Par ailleurs, sur les 24 animaux qui avaient été négatifs à l'agglutination, 6 présentaient des lésions d'hépatisation pulmonaire, avec ou sans adhérences pleurales. Dans aucun de ces cas, nous n'avons isolé le micro-organisme de la péripneumonie. Cette observation est une bonne démonstration :

— de la sensibilité de la réaction, car elle a détecté les porteurs chroniques;

— de la spécificité, car seuls les animaux présentant des lésions de péripneumonie ou à partir desquels on a isolé le *Mycoplasma* ont réagi.

TABLEAU II

AGGLUTINATIONS	LESIONS	ISOLEMENT
32 positifs	26 : péripneumonie typique	non fait
	6 : pas de lésions	6 positifs
24 négatifs	6 : lésions hépatisées et adhérentes	6 négatifs
	18 : pas de lésions	non fait

Le cas des animaux guéris n'est pas entièrement élucidé. Nous n'avons que trop peu d'expérience avec de tels sérums pour pouvoir tirer une conclusion. Logiquement, on peut penser que la sérologie d'un animal guéri cliniquement et bactériologiquement tend peu à peu vers la négativité pour devenir tout à fait négative au bout de quelque temps. C'est à cette conclusion qu'arrivent les auteurs anglo-saxons. L'exemple des animaux vaccinés vient corroborer ce point de vue.

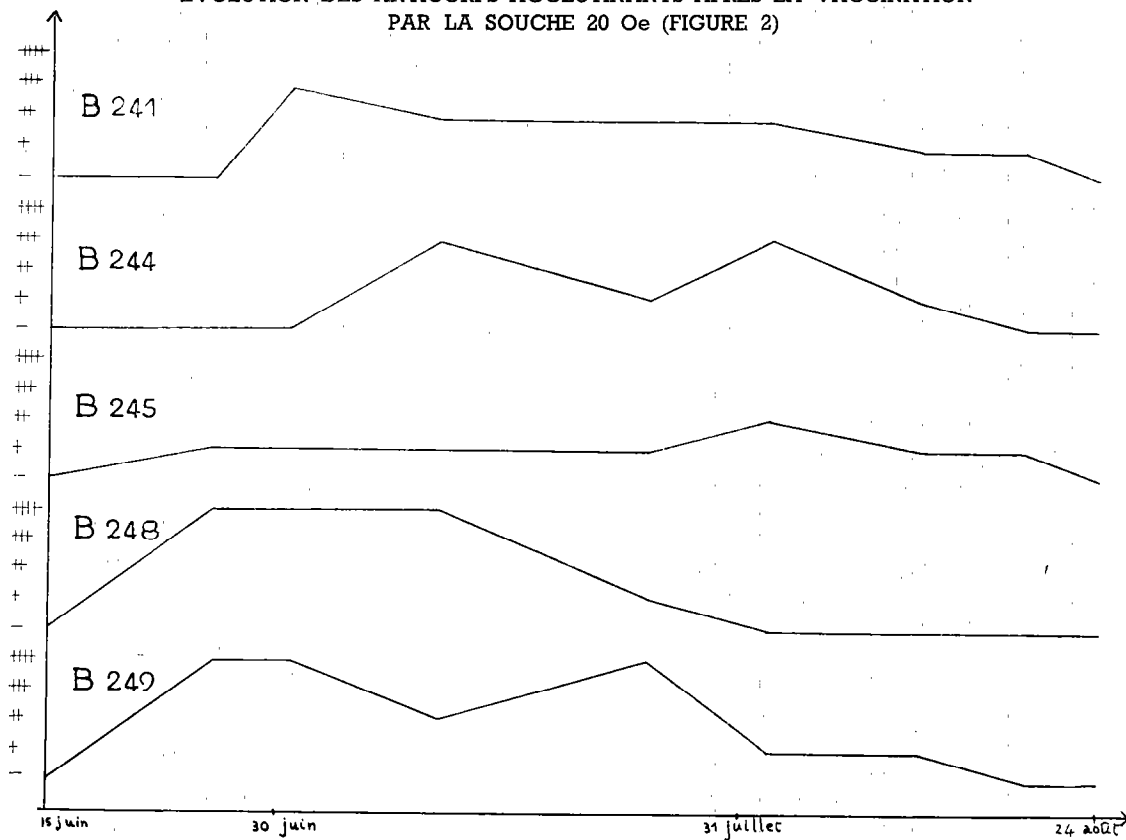
c) Devenir des anticorps agglutinants chez les vaccinés :

A l'occasion des expériences d'immunité faites avec les différents vaccins que nous produisons, nous avons suivi l'évolution des anticorps agglutinants (ainsi que des anticorps déviant le complément et bactéricides) dans les sérums des vaccinés.

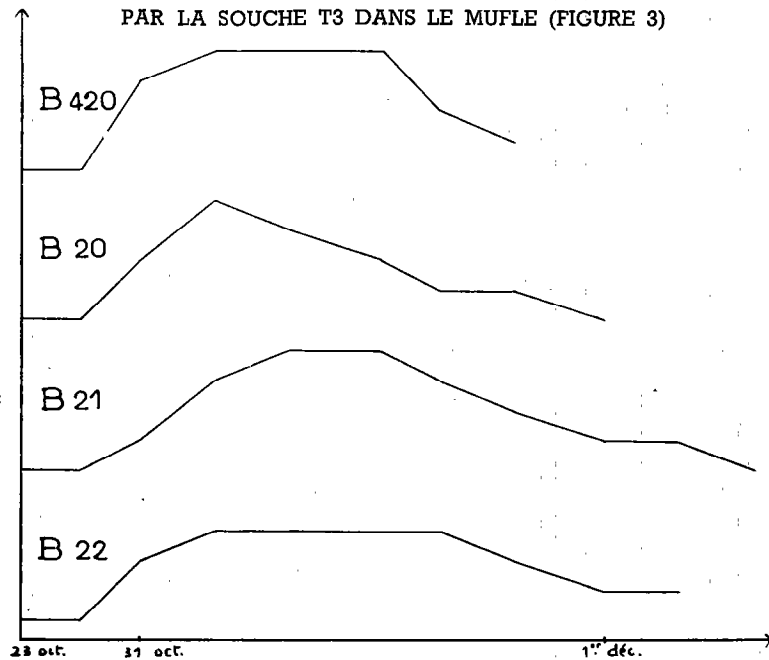
Dans une première expérience, 4 bouvillons de 8 à 10 mois furent testés et trouvés négatifs en agglutination et déviation du complément; ils furent

(*) *Mycoplasma Mycoïdes* devait être isolés de leurs ganglions médiastinaux.

ÉVOLUTION DES ANTICORPS AGGLUTINANTS APRÈS LA VACCINATION
PAR LA SOUCHE 20 Oe (FIGURE 2)



ÉVOLUTION DES ANTICORPS AGGLUTINANTS APRÈS LA VACCINATION
PAR LA SOUCHE T3 DANS LE MUFLE (FIGURE 3)



vaccinés dans le mufler (*) avec 1 ml de la 20^e sub-culture de notre souche 20 oe. Les séro-agglutinations, réalisées à intervalles réguliers, ont donné les résultats reproduits dans la figure 2.

Dans la seconde expérience, 5 bouvillons de 6 à 8 mois, à sérologie négative, furent vaccinés dans le mufler avec 1 ml de la souche T3 avianisée de Piercy et Knight, cultivée selon leur technique (15). La figure 3 montre l'évolution de leurs anticorps agglutinants.

Enfin, parmi les vaccinations faites en brousse. 54 vaches et 6 veaux furent vaccinés avec le vaccin avianisé. Trois vaches et les 6 veaux, testés deux mois plus tard, s'avérèrent négatifs en agglutination bien qu'immuns à l'épreuve faite avec de la sérosité virulente injectée par voie sous-cutanée.

On peut donc considérer, à la lumière de ces tests, que la sérologie d'un vacciné, tout au moins d'un vacciné par la technique d'inoculation dans le mufler, redeviendra négative en agglutination 3 mois après la vaccination. Un bon nombre d'entre eux seront déjà négatifs depuis le 2^e mois.

Ces résultats rejoignent ceux qu'ont exposés Newing et Field (12) qui constatèrent que 9 semaines après la vaccination, treize bêtes vaccinées sur quinze étaient redevenues négatives en agglutination (et quinze sur quinze en déviation du complément) et ceux de Priestley (17) qui estime pour sa part, qu'après la vaccination mettant en œuvre son vaccin avec adjuvant de gélose, les anticorps agglutinants persistent de 3 à 4 mois.

On se rend compte d'emblée de la différence de comportement des porteurs chroniques et des vaccinés : les premiers conservent des anticorps pendant très longtemps (c'est ainsi qu'à la station d'élevage d'Abougoudam, nous avons trouvé que les vaches qui avaient eu la péripneumonie il y a 8 ans conservaient des anticorps, à un taux très faible d'ailleurs : 1+) alors que les vaccinés redeviennent négatifs en 3 mois au plus. A quoi tient cette différence ? A notre sens, au fait que les porteurs chroniques hébergent quelques micro-organismes dans leurs ganglions, c'est-à-dire sont constamment soumis à un certain stimulus antigénique, alors que chez les vaccinés dans le mufler la culture *in situ* du *Mycoplasma* est rapidement neutralisée par les mécanismes de défense (humoraux non spécifiques et spécifiques, phagocytaires ?) de l'organisme. Des études ultérieures devront préciser ce point.

d) Cas de veaux :

Nous rapportons le fait suivant, remarqué en

(*) Ce lieu d'innoculation, tout d'abord préconisé par ORUE (Rapport Laboratoire Fédéral de l'Élevage Dakar, 1955) est maintenant couramment employé au Tchad.

Afrique Equatoriale, sans vouloir préjuger sa valeur en d'autres lieux.

L'expérience montre que de jeunes veaux du Tchad et du Nord-Cameroun présentent, jusque vers l'âge de 5 mois, des anticorps agglutinants, très souvent à un taux très élevé (+++ ou ++++).

Le tableau III donne l'exemple d'un sondage.

TABLEAU III

A G E	TESTÉS	POSITIFS
4 à 6 mois	4	4
6 à 7 mois	4	1
7 à 8 mois	4	0
8 à 10 mois	4	2
1 an	4	2

Ce tableau montre que l'on peut distinguer 3 périodes :

— de la naissance à 6 mois : les veaux présentent des anti-corps agglutinants. Doit-on voir là une immunité passive transmise par le colostrum maternel où l'on trouve les anticorps concentrés à plus de treize fois leur taux sanguin? (1) Il existe cependant un fait curieux, à savoir que quelques veaux à sérologie positive ont des mères à sérologie négative (canton de Lara, Nord-Cameroun). Nous n'avons pas encore trouvé d'explication satisfaisante à ce paradoxe.

— de 6 à 8 mois : les anticorps passifs disparaissent; le veau est réceptif à la maladie.

— à partir de 8 mois : le veau commence sa vie « sociale » dans le reste du troupeau, où il rencontre des excréteurs (porteurs chroniques) de *Mycoplasma*. Quelques-uns s'infectent (ce qui ne veut pas dire qu'ils font la péripneumonie maladie) et développent des anticorps. S'ils arrivent à surmonter leur primo-infection, leur sérologie redeviendra négative; sinon ils seront des porteurs chroniques, dangereux pour les autres. En testant après un an, on se mettra donc à l'abri de toute erreur due à des anticorps maternels. Si l'on trouve des veaux positifs à cet âge on devra les retester quelques semaines plus tard; s'ils sont toujours positifs, ils devront être considérés comme porteurs chroniques.

Cette revue nous montre ce que l'on peut attendre de la réaction d'agglutination sur lame avec un antigène coloré, quelles en sont les indications, quelles en sont les limites. Le tableau IV résume notre conception actuelle du test.

nation des réagissants positifs et introduction d'éléments non contaminés, négatifs à l'agglutination; c'est la méthode appliquée dans les établissements d'élevage où les animaux vivent, en principe, en circuit fermé.

TABLEAU IV

CATÉGORIES D'ANIMAUX TESTÉS	RÉSULTATS DE L'AGGLUTINATION
1.- Animaux cliniquement atteints : animaux d'un troupeau dans lequel évolue la péripneumonie.	+++ ou ++++ sauf pour les animaux mourants qui peuvent être négatifs. Pour de tels animaux, assurer le diagnostic par la sérologie des autres malades du troupeau.
2.- Animaux guéris de péripneumonie et non porteurs.	+++ ou +++ pendant quelques mois puis négativité.
3.- Animaux cliniquement guéris, porteurs chroniques.	+, rarement ++, pendant très longtemps (plusieurs années).
4.- Vaccinés.	Tous les stades jusqu'à +++ puis négativation en 3 mois.
5.- Veaux jusqu'à 6 mois.	Tous les stades jusqu'à +++ puis négativité.
6.- Animaux sains, ou atteints d'une affection différente de la péripneumonie.	Négatifs

IV. — APPLICATION PRATIQUE : PROPHYLAXIE DE LA PÉRIPNEUMONIE

La réaction d'agglutination sur lame est désormais, en Afrique Equatoriale et au Cameroun, sortie du domaine du laboratoire pour être appliquée sur le terrain. La production d'antigène n'est limitée actuellement que par le temps de sa préparation; l'arrivée d'une super-centrifugeuse Sharples permettra de répondre à toutes les demandes.

A l'aide de la séro-agglutination, deux politiques ont été préconisées pour lutter contre la péripneumonie :

— celle tendant à créer un milieu sain, par élimi-

— l'autre méthode vise à éliminer tout de suite les animaux cliniquement malades, confirmés par la sérologie, puis à vacciner l'ensemble du troupeau. Un nouveau test, pratiqué 4 mois plus tard éliminera ceux qui réagissent positivement. On se rappelle en effet que les vaccinés, à l'inverse des porteurs chroniques, voient leurs anticorps agglutinants disparaître alors qu'ils persistent chez ces derniers.

Cette technique, applicable aux troupeaux « de brousse », peut s'inscrire aisément dans les actuels programmes de vaccination, la première opération (dépistage, sérologique et vaccination) se faisant lors de la vaccination pestique annuelle. C'est pour ce faire et afin de gagner du temps lors

de cette opération, que nous étudions actuellement la possibilité de la vaccination mixte, en une seule injection, peste bovine-péri-pneumonie : les résultats sont, jusque là, très prometteurs. Le second test aurait lieu lors de l'immunisation mixte contre les charbons, en début de saison des pluies. Ainsi les animaux aborderaient cette saison, pendant laquelle on constate le maximum des cas de péri-pneumonie, vaccinés et dans l'environnement le plus sain possible.

Un début de réalisation a pris corps.

1. — Etablissements d'Élevage du Tchad.

a) **Ranch expérimental de l'Ouaddi Rimé** : Ce ranch situé en pleine zone sahélienne, au nord-est d'Ati, est destiné à faire de l'élevage et de l'embouche. Les animaux y sont répartis en troupeaux d'environ 200 têtes sous la conduite de bouviers. Le ranch est entièrement clos de barbelés, et plusieurs forages y sont faits (ou prévus) pour assurer le ravitaillement en eau. Les bovins vivent donc en circuit fermé, sans contact, en principe, avec l'extérieur : ils y sont introduits à l'achat et n'en ressortiront que pour aller à l'abattoir.

Le troupeau a été constitué par des achats d'animaux sur les marchés de bestiaux du Batha ; on a choisi les beaux sujets, puis ils ont été dirigés sur le ranch. Quand l'antigène coloré fut disponible, on décida d'employer le test d'agglutination rapide pour faire la prophylaxie de la péri-pneumonie. On opéra sur deux fronts :

— élimination des réagissants positifs du troupeau du ranch ;

— achat d'animaux négatifs.

Cette méthode demande un isolement parfait des bovins, sans aucun contact avec les troupeaux extérieurs où l'endémicité de la maladie est élevée. Si l'on ne se soumet pas à cette règle stricte, des catastrophes pourront se produire, car la péri-pneumonie évoluera sur un terrain neuf. Un exemple tout récent vient de le prouver.

b) **Etablissement d'élevage d'Abougoudam** : Cet établissement est dévolu à la sélection du zébu arabe par la méthode du « progeny-test ». Aucun bétail n'est introduit, et là encore les bêtes vivent en circuit fermé.

Une épizootie de péri-pneumonie s'était déclarée à Abougoudam en 1949, avec les premiers achats. De temps à autre depuis cette date, une bête faisait une péri-pneumonie. L'intérêt du test utilisé dans ce troupeau a été :

— de déceler les porteurs chroniques parmi les vieux animaux et parmi ceux qui depuis firent la maladie ;

— de trouver les jeunes qui se sont infectés au contact des malades.

Les animaux à sérologie positive ont été constitués en un troupeau séparé, isolé du reste des animaux. On peut espérer qu'en refaisant le test tous les six mois on arrivera à se débarrasser de la péri-pneumonie dans cet élevage et à constituer un milieu sain.

2. — Troupeaux de « brousse ».

La seconde politique n'a vu qu'un début de réalisation, mais nous espérons que la prochaine campagne de vaccination verra le renforcement de cette action.

Dans le canton de Lara (Cameroun), pour des bœufs de travail d'un paysannat cotonnier, la méthode fut employée : test sur l'ensemble des animaux, vaccination des réagissants négatifs.

On fit de même à la station d'agriculture de Guétalé (Cameroun) pour des animaux sensiblement dans les mêmes conditions que les précédents.

Nous ne voulons pas nous cacher les difficultés humaines que soulèvent cette méthode. Il est à peu près probable que, bien que la commercialisation de la viande s'effectue très facilement en Afrique Centrale, les éleveurs ne voudront pas se séparer de leur bétail à sérologie positive, ceci pour deux raisons :

— ils ne comprendront pas le but final à atteindre et on sait combien en Europe, en France, il est difficile de persuader un paysan de se défaire d'une vache ;

— le bétail représente plus qu'un capital ; c'est un signe de puissance et la diminution du nombre de têtes fera rétrograder d'autant le propriétaire dans la considération de ses voisins.

C'est pourquoi, quoique disposant maintenant des armes de valeur que sont les tests sérologiques et de méthodes de vaccination de plus en plus efficaces, la péri-pneumonie reste encore un problème, car on touche le problème social qu'a si bien brossé Receveur (20) :

nécessité de la transhumance, échanges d'animaux lors des dots de mariage, répugnance à l'abattage et encore plus à la vente d'un animal.

C'est l'élévation du niveau de vie, la pénétration humaine de plus en plus grande, qui permettront d'assurer avec succès le plan projeté :

Section de virologie
Laboratoire de Farcha
Fort-Lamy Tchad.

BIBLIOGRAPHIE

1. BLAKEMORE et GARNER. — *J. comp. Path.* (1956), **66**, 287.
2. CAMPBELL. — *J. Coun. Sci. Ind. Res. (Australie)*. (1938), **11**, 112.
3. DOLE et COTZIAS. — *Science* (1951), **113**, 552.
4. DUJARDIN-BEAUMETZ in: Levaditi, Lépine et Verge: **Les ultra-virus des maladies animales**. Maloine, Paris, (1943), p. 1135.
5. EDWARD et FITZGERALD. — *J. Path. Bact.* (1954), **68**, 23.
6. FREUNDT. — *Acta Path. Mic. Scand.* (1952), **31**, 508.
7. GREGORY. — *FAO/OIE/CCTA. Meeting on Pleuropneumonia Paper Khartoum 1957.*
8. HESLOP. — *Proceed. Roy. Soc. Victoria.* (1920), **33**, 180 et (1921) **34**, 180.
9. ITO, YAMAGIWA et ANBO. — *J. Jap. Soc. Vet. Sci.* (1931), **10**, 9.
10. MORNET et ORUE. — *Bull. Acad. Vétér.* (1950), **23**, 279.
11. NAKAMURA, FUTAMURA et WATANUKI. — *J. Jap. Soc. Vet. Sci.* (1926), **5**, 296.
12. NEWING et FIELD. — *Brit. Vet. J.* (1953), **109**, 397.
13. NEWING. — *Brit. Vet. J.* (1955), **111**, 387.
14. NEWING. — *Bull. Epiz. Afr. (I.B.E.D.)*, (1956), **4**, 197.
15. PIERCY et KNIGHT. — *Joint FAO/OIE/CCTA Meeting on Pleuropneumonia Paper Khartoum 1957.*
16. PRIESTLEY. — *Vet. Rec.* (1951), **63**, 427.
17. PRIESTLEY. — *Bull. Epiz. Afr. (I.B.E.D.)*. (1957), **5**, 177.
18. PROVOST. — *Ann. Inst. Pasteur. A publier.*
19. PROVOST et QUEVAL. — *A publier.*
20. RECEVEUR. — *Bull. Off. Int. Epiz.* (1949), **32**, 122.
21. RODWELL et RODWELL. — *Nature* (1953), **172**, 254.
22. SEELEMANN. — *Arb. Reichsgesundh Amt.* (1923), **53**, 711.
23. TANG et al. — *J. Path. Bact.* (1935), **40**, 391.
24. TITZE, GIESE et WEDEMANN. — *Arb. Reichsgesundh Amt.* (1923), **53**, 711.
25. TURNER, CAMPBELL et DICK. — *Aust. Vet. J.* (1935), **11**, 63.
26. WHO publication: 2nd january. 1952.
27. ZOONOSES. — *Etude agricole de la F.A.O.*, n° 25. Pedone, Paris, p. 101.

SUMMARY

Studies on immunity in contagious bovine pleuropneumonia. 1. The Agglutination Test.

Agglutination and haemagglutination tests used for the diagnosis of Contagious Bovine Pleuropneumonia are briefly described together with a medium capable of producing a satisfactory culture of *Mycoplasma mycoides*. The preparation of a stained antigen is also fully described.

The agglutination test, specific and quite sensitive, can be easily applied either in the laboratory or in the field. Chronic carriers and clinical cases can be detected, except those in the last stage of the disease. Reactions in vaccinated animals can be easily differentiated from those in infected ones. Reactions in calves are discussed.

A policy of control measures using the stained antigen is suggested but its application might be impeded by the human factor.

RESUMEN

Investigaciones inmunológicas sobre la perineumonía. 1. Reacción de aglutinación.

Los autores después de una breve historia sobre la sero y la hemo-aglutinación aplicada al diagnóstico de la perineumonía investigan la preparación de un medio de cultivo propio y que asegure una buena producción de *Mycoplasma mycoides*. Se proporcionan todos los detalles técnicos para la preparación del antígeno coloreado.

La realización de la prueba tanto en el laboratorio como en el campo es fácil; la reacción es sensible y específica: es capaz de descubrir los animales clínicamente enfermos salvo en casos extremos, así como los portadores crónicos.

La vacunación contra la perineumonía no impide la interpretación de la reacción.

El caso de los terneros está aún en discusión.

Finalmente describen las líneas generales para una profilaxia de la perineumonía empleando la prueba del antígeno coloreado sin ignorar las dificultades que se puedan encontrar por parte del personal empleado para realizarla.