

Contribution à l'étude immunologique de *Pasteurella multocida*

Existence et importance d'un nouveau type, agent de la septicémie hémorragique des bovidés africains

par P. PERREAU

En 1959, plusieurs souches de *Pasteurella multocida* isolées en Afrique centrale (Cameroun et République Centrafricaine) de zébus ayant succombé à une pasteurellose suraiguë, furent envoyées au Canada, pour être typées selon la méthode de l'hémagglutination passive dans le laboratoire du Dr G. R. CARTER (6).

Ces souches étaient présumées appartenir au type B, responsable de la septicémie hémorragique vraie des bovidés ; or les hématies sensibilisées par les antigènes capsulaires de ces souches ne furent pas agglutinées par les sérums anti-B classiques ; par contre, elles étaient agglutinées par un sérum préparé avec une souche du Congo ex-belge, lequel sérum agglutinait l'antigène B (1).

C'est sur la base de cette réaction croisée que CARTER conclut à l'existence d'un variant B africain (2). *

A mesure que notre enquête sur cette maladie progressait en Afrique centrale, de nombreuses autres souches vinrent s'ajouter aux premières, ce qui permit la constitution d'un matériel de recherches valable.

Nous avons donc pu vérifier l'existence de ce sous-groupe B et apprécier son importance en

Afrique nord-tropicale ; nous pensons apporter par cet article, quelques éclaircissements à ce sujet.

La sérologie utilise actuellement deux méthodes pour classer les souches de *Pasteurella multocida* ; la séroprotection de la souris due à ROBERTS (8) et l'hémagglutination conditionnée mise au point par CARTER (3).

Les résultats obtenus par les deux techniques permettent de reconnaître comme identiques, c'est l'opinion actuelle, les types I et B et les types II et A ; pour les types III et C, et IV et D, la majorité des auteurs reste très prudente et la correspondance n'est pas encore reconnue formellement.

Ici, seul le type I de ROBERTS ou B de CARTER nous intéresse puisqu'il s'agit de septicémie hémorragique bovine.

Nous avons donc comparé nos souches africaines à des souches de référence, en utilisant trois moyens :

- L'hémagglutination passive.
- La précipitation en milieu gélifié.
- La séroprotection de la souris.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Souches de *Pasteurella multocida*.

Comme souches de référence, nous avons utilisé la souche 215 (type I) de ROBERTS, la souche N° 55129 (type B) de la collection de l'Institut Pasteur de Paris, la souche 1305-1 (type B) du laboratoire de CARTER et la souche R₂ (type I) de l'Institut d'Hessarek à Téhéran.

* Cet article était sous presse lorsque la dénomination : groupe E de *Pasteurella multocida*, fut proposée, pour ce type africain, par Carter (A new serological type of *Pasteurella multocida* from Central Africa. *Vet. Rec.* 1961, 73 (42) ; 1052).

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1961, 14, n° 3.

Reçu pour publication, octobre 1961.

Les souches africaines que nous avons étudiées sont au nombre de 21 :

11 viennent du Cameroun (plateau de l'Adamaoua).

1 de la République Centrafricaine (région de Bouar).

4 de Nigeria (reçues du laboratoire de Vom).

1 de Guinée (région de Pita).

1 de la Côte d'Ivoire (région de Khorogo)

1 du Mali (région de Tombouctou)

2 du Sénégal (région de la Casamance).

Toutes ces souches ont été conservées avec le minimum de repiquages sur milieux artificiels ; les procédés de conservation ont été réduits à la lyophilisation d'une part et au maintien en congélation à -35° de sang virulent d'autre part.

A chaque récolte d'antigène, on vérifiait qu'il s'agissait bien de colonies « iridescentes », que le test à l'acriflavine était négatif et que la suspension microbienne en sérum physiologique était stable, sans phénomène de floculation même au bout de plusieurs jours.

La présence de capsules très nettes après coloration de contraste à l'encre de Chine, l'absence de formes filamenteuses dans les hémocultures après passage sur lapin ou souris et le maintien du pouvoir pathogène originel venaient confirmer également l'absence de dégradation antigénique de ces souches.

Il faut avouer que, malgré ces précautions, nous avons vu, au terme de nos expériences, deux souches perdre de façon irréversible leur pouvoir immunigène.

2) Antigènes

Des boîtes de Roux contenant le milieu Tryptose Agar Difco auquel étaient ajouté 5 p. 100 de sérum de bœuf étaient ensemencées avec une hémoculture de 8 heures en moyenne, puis récoltées avec 25 ml de sérum physiologique au bout de 12 à 15 heures.

L'opacité des récoltes était, en général, celle du tube n° 45 de Brown.

Avec cette suspension, l'antigène capsulaire destiné à la sensibilisation des hématies était préparé par la méthode de CARTER (3) sans aucune modification : après 30 minutes de chauffage à 58° , une forte centrifugation (1/2 heure à 8000 tours/minute) permettait de séparer le sur-nageant du culot microbien.

Cet antigène limpide était merthiolaté à 10 p. 1000 et utilisé pur pour l'hémagglutination et la précipitation en milieu gélifié.

La suspension microbienne récoltée, ajustée à l'opacité N° 2 de Brown servait à l'immunisation des lapins par voie intraveineuse.

3) Immunsérums

Ceux-ci étaient obtenus selon le protocole d'immunisation suivant :

Après une première injection, sous la peau, de 0,5 ml de la suspension concentrée formolée, sept injections intraveineuses de 1 ou 2 ml de suspension formolée ajustée au tube n° 2 de Brown, étaient effectuées à raison de deux par semaine ; après sept jours de repos, on pratiquait une injection de rappel (2 ml de cette dernière suspension) et les lapins étaient saignés quatre jours après.

Si la suspension antigénique est correcte, on obtient par ce protocole des sérums qui agglutinent en moyenne les hématies sensibilisées au 1/640 et quelquefois jusqu'au 1/1280 (dilution non terminale du sérum).

Ces sérums servent également à la précipitation en milieu gélifié.

Ils protègent les souris contre une dose infectante de culture homologue allant, selon les lots de sérum, de 1.000 à 100.000 D.S.M.

Leur titrage terminé, tous ces sérums sont lyophilisés et conservés ensuite à -15° C. afin d'éviter toute baisse du titre des anticorps, notamment des précipitines.

4) Technique d'hémagglutination passive

Nous ne la décrivons pas ici puisqu'elle est classique (3). CARTER préconise deux lectures de la réaction, la première au bout de 2 heures de séjour à la température ambiante, la seconde après une nuit au réfrigérateur.

Au cours des quelques centaines d'hémagglutinations que nous avons pratiquées pour ce travail, nous n'avons jamais trouvé de bien grandes différences entre les résultats des deux lectures et nous avons attaché la plus grande importance à la première, bien qu'en général le séjour au réfrigérateur ait augmenté d'une dilution le titre d'hémagglutination.

5) Précipitation en milieu gélifié

Nous avons utilisé deux méthodes :

a) la précipitation en cuves à faces parallèles selon la technique de OUDIN (7), c'est-à-dire la diffusion double, dans le milieu suivant :

gélose noble Difco 6 g
 merthiolate 0,1 g à pH 7
 CINa 8,5 g
 eau distillée QS 1.000 ml

b) la précipitation en plaque de gélose coulée en boîtes de Pétri. Sérums et antigènes sont distribués dans des alvéoles distantes de 6 mm les unes des autres.

Le milieu gélosé est ici celui qui est décrit par

E. J. LAZEAR et Coll. (4) ; il contient, par litre, 17,5 g de gélose noble Difco, seule modification par rapport au milieu précédent. Aucun colorant n'y est incorporé.

Plaques et cuves sont laissées à la température du laboratoire et la lecture n'est jamais faite avant 48 heures ; c'est souvent au bout de 3 à 4 jours que les lignes de précipitation sont les plus nettes.

6) Séroprotection de la souris

Nous avons appliqué intégralement la méthode de ROBERTS (8) ; l'inoculation virulente

TABLEAU I

Réactions croisées entre les souches de référence du type I ou B utilisées.

Antigènes capsulaires des souches :	Dilution des sérums :									
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
1°) Sérum anti-215 (I Roberts)										
215	4	4	4	4	4	4	4	4	1	0
1305-1	4	4	4	4	4	4	4	4	1	0
55129	4	4	4	4	4	4	4	1	0	0
R ₂	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
2°) Sérum anti-55129 (B I P.)										
55129	4	4	4	4	4	4	3	2	2	2
215	4	4	4	4	4	4	3	2	1	0
1305-1	4	4	4	4	4	4	4	1	0	0
R ₂	4	4	4	4	4	4	3	0	0	0
3°) Sérum anti-R ₂ (I Hessarek)										
R ₂	4	4	4	4	4	4	4	4	2	1
215	4	4	4	4	4	4	4	2	0	0
55129	4	4	4	4	4	4	4	2	0	0
1305-1	4	4	4	4	4	4	4	4	2	0
4°) Sérum anti-1305-1 (B Carter)										
1305-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
215	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
55129	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
R ₂	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

N. B. : La notation du degré d'hémagglutination est indiquée par un chiffre correspondant au nombre de croix

++++ = 4 ++ = 2

Dans ce tableau et ceux qui suivent, les dilutions de sérum indiquées ne sont pas terminales ; le mélange antigène-sérum se faisant à volume égal, la dilution terminale est double de celle indiquée en haut du tableau.

est faite par voie intra-péritonéale 24 heures après l'injection sous-cutanée du sérum à tester et les résultats sont notés au bout de 3 jours. L'inoculation d'épreuve peut se faire aussi par voie sous-cutanée, mais la période d'incubation est plus longue et le test se prolonge pratiquement une semaine avant que ses résultats rejoignent ceux que l'on obtient en infectant les souris par la voie péritonéale.

RÉSULTATS

Ce sous-groupe B ayant été mis en évidence par la technique sérologique d'hémagglutination, c'est cette méthode que nous avons d'abord employée pour dégrossir le problème ; les autres tests sont venus ensuite confirmer les conclusions de celle-ci.

A. Sérotypie par hémagglutination

Les sérums de référence sont les sérums anti-215, anti-R₂, anti-55129 et anti 1305-1 ; ils peuvent s'employer indifféremment à des fins de contrôle, car les réactions croisées sont parfaites

entre ces souches, ainsi qu'en témoignent les épreuves résumées dans le tableau I.

Ces sérums, considérés donc comme des réactifs spécifiques du groupe sérologique de *Pasteurella multocida* responsable de la pasteurellose septicémique des bovins, n'agglutinent pas (ou à des titres bien faibles) les hématies O sensibilisées par les antigènes capsulaires de nos souches africaines, comme le montre le tableau II, où sont consignés les résultats obtenus avec le sérum anti-55129.

Avec les trois autres sérums de référence, les résultats sont identiques, les réactions sont négatives.

Lorsque nous effectuons la réaction inverse, hémagglutination par un sérum anti-variant africain, les résultats s'inversent à leur tour de façon très régulière.

Le tableau III résume les tests d'hémagglutination effectués avec le sérum anti-P₂ :

Pratiquement, on n'observe aucune hémagglutination avec les antigènes des souches classiques de type B ; parfois, et surtout après un séjour

TABLEAU II - Agglutination par le sérum anti-55129 (anti-B) des hématies sensibilisées par les antigènes africains.

Antigènes capsulaires des souches :	Dilutions du sérum :									
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
1) de référence										
55129 (B I.P.)	4	4	4	4	4	4	3	2	2	2
215 (I Roberts)	4	4	4	4	4	4	4	4	1	0
2) africaines										
C ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₂	traces	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₅	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₇	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₈	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₁₁	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bouar	traces	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H ₁	traces	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H ₃	traces	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N ₁	traces	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N ₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU III - Agglutination par le sérum anti-P₂ des hématies sensibilisées par les antigènes africains.

Antigènes capsulaires des souches :	Dilutions du sérum :									
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
1) de référence										
1305-1 (B Carter)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55129 (B I.P.)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215 (I Roberts)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R ₂ (I Hessarek)	1	1	traces	0	0	0	0	0	0	0
2) africaines										
C ₁	4	4	4	4	4	4	4	traces	0	0
P ₂	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
P ₃	4	4	4	4	4	4	4	2	0	0
P ₄	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
P ₅	4	4	4	4	4	4	4	4	1	0
P ₇	4	4	4	4	4	4	4	4	traces	traces
P ₈	4	4	4	4	4	4	4	3	0	0
P ₁₁	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Bouar	4	4	4	4	4	4	4	3	2	2
H ₁	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
H ₃	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3
N ₁	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
N ₄	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2

d'une nuit au réfrigérateur la réaction est positive à un titre faible, au $\frac{1}{10}$, au $\frac{1}{20}$ et même au $\frac{1}{40}$, ce qui est sans commune mesure avec les titres obtenus avec les antigènes des souches africaines.

Ces résultats sont très réguliers ; les sérums anti-P₇, P₈ et P₁₁ nous ont fourni des résultats identiques.

L'« hémagglutinogène » de ces souches est donc bien différent de celui des souches de référence du groupe B, ce qui est confirmé par les épreuves d'absorption des sérums.

L'absorption du sérum anti-B (1305-1) a été faite successivement par les souches P₂ et P₁₁, en mélangeant immunsérum et antigènes selon des proportions variables afin d'obtenir un optimum d'absorption, selon le protocole suivant :

Sérum anti-1305-1

—
1 ml
1 ml
1 ml
1 ml

Suspension bactérienne concentrée (opacité n° 45 Brown)

—
1 ml
2 ml
3 ml
4 ml

Après un séjour de 4 heures à l'étuve à 37° (avec agitation à intervalles réguliers) et une forte centrifugation, le sérum surnageant ne montre, dans tous les mélanges, aucune baisse du titre d'hémagglutination pour l'antigène 1305-1.

Le sérum anti-215, absorbé par les souches P₈, P₁₁, H₁ et H₃ selon le même procédé, se révèle autant hémagglutinant pour l'antigène homologue qu'avant l'absorption.

Inversement, les sérums anti-P₇ et anti P₁₁ absorbés par les souches 215 et 1305-1 conservent

TABLEAU IV - Hémagglutination par le sérum anti-P₇ absorbé.

Sérums	Dilutions des sérums									
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
P ₇	4	4	4	4	4	4	4	1	0	0
P ₇ absorbé par la souche 215	4	4	4	4	4	4	4	2	0	0
P ₇ absorbé par la souche 1305-1	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0
P ₇ absorbé par la souche H ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

leur titre hémagglutinant, alors que leurs anticorps disparaissent si l'absorption est faite par une souche africaine, H₃ par exemple, comme le montre le tableau IV.

Dans cet exemple, l'absorption du sérum P₇ par la souche H₃ a été totale ; avec d'autres souches du même type, l'absorption a été partielle, importante certes mais non totale, le titre d'hémagglutination tombant de $\frac{1}{1280}$ à $\frac{1}{40}$ ou $\frac{1}{80}$.

Il est cependant possible, par une seconde absorption, de faire disparaître complètement les agglutinines.

A notre avis, si toutes nos souches du type africain possèdent qualitativement le même antigène capsulaire, elles n'en sont pas également riches, peut-être simplement parce que nous les conservons depuis des époques différentes, qu'elles n'ont pas subi toutes le même processus de conservation ou le même nombre de subcultures et que par conséquent des variations quantitatives de leurs antigènes communs existent vraisemblablement.

C'est pourquoi des quantités égales de germes de souches différentes, mais du même type africain, ne parviennent pas à absorber de façon identique les agglutinines d'un même sérum.

B. Sérotypie par précipitation en milieu gélifié

Cette méthode met bien en évidence la différence de nature des antigènes capsulaires et confirme exactement ce qui vient d'être décrit au sujet de la sérotypie par hémagglutination.

Les résultats obtenus en cuves à faces parallèles ne diffèrent aucunement de ceux obtenus en

boîtes de Pétri, mais celles-ci sont plus commodes, étant donné que l'on peut opposer dans la même plaque de gélose un plus grand nombre d'antigènes à un même sérum ou inversement un plus grand nombre de sérums à un même antigène.

Comme le montrent les photographies ci-contre (fig. 1, 2 et 3), un sérum de type I classique (anti-215) donne un arc de précipitation très net avec les antigènes capsulaires des souches de référence, mais aucun avec les antigènes capsulaires des souches africaines.

Inversement, l'arc de précipitation est net lorsque les sérums anti-P₂, P₇, P₈ et P₁₁ sont opposés aux antigènes des autres souches africaines et n'existe pas lorsqu'ils sont opposés aux antigènes des souches de référence.

En outre, l'identité de l'antigène capsulaire s'affirme très sûrement entre toutes ces souches de provenance bien différente, mais toujours africaine.

L'arc de précipitation peut être « deviné » au bout de 24 heures ; c'est le plus souvent en 48 à 72 heures qu'il se constitue de façon nette, pour les sérums de titre précipitant moyen.

Il arrive cependant, c'était le cas de notre sérum anti-P₁₁, d'obtenir des lignes de précipitations très nettes en 24 heures ; le sérum doit alors être considéré comme excellent.

Pour la grande majorité de nos sérums, un seul arc de précipitation apparaît lorsqu'ils sont opposés aux antigènes capsulaires préparés selon la méthode de CARTER ; il est très dense et bien dessiné, mais il est fréquent de le voir se résoudre au bout d'un temps assez long (une semaine environ) en un faisceau de plusieurs lignes étroitement accolées, qu'il est souvent difficile de dénombrer (en général, 3 lignes).

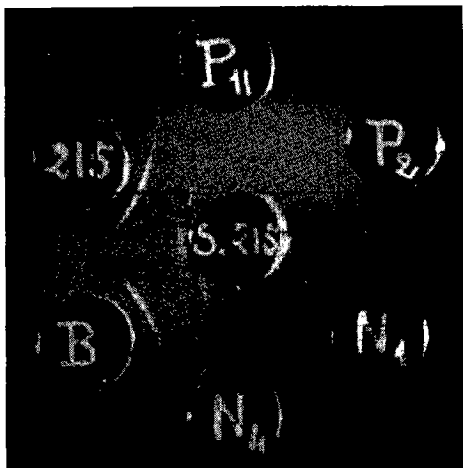


FIG. 1

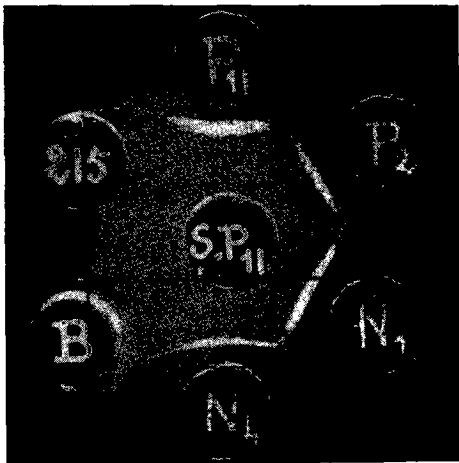


FIG. 2

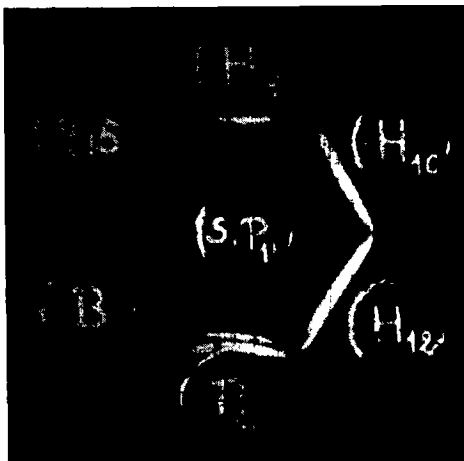


FIG. 3

FIGURES 1, 2 et 3.

Précipitation en milieu gélifié (boîtes de Pétri).

Les sérums sont centraux : anti-215 pour la figure 1, anti-P₁₁ pour les figures 2 et 3.

Les antigènes spécifiques sont périphériques : l'antigène 215 est celui de la souche 215 de Roberts (type I), l'antigène B est celui de la souche 1305-1 de Carter (type B).

Les souches P proviennent du Cameroun, les souches N de Nigeria, la souche H₉ du Sénégal, la souche H₁₀ de Côte d'Ivoire et la souche H₁₂ de Guinée.

Pour quelques sérums (anti-P₂ et anti-P₇ par exemple), il existe d'emblée un faisceau très régulier de 3 arcs de précipitation, comme si l'antigène « capsulaire » utilisé pour la sérotypie pouvait se décomposer en 3 fractions antigéniques distinctes auxquelles correspondent 3 anticorps élaborés par le lapin lors de son immunisation, ce qui rejoindrait l'observation faite par LONDON et YAW (5) selon laquelle il y aurait deux ou trois substances polyosidiques capsulaires.

Mais il est impossible d'affirmer, étant donné le mode de préparation assez grossier de l'antigène servant à l'hémagglutination, que les trois lignes de précipitation observées ici correspondent à 3 antigènes rigoureusement capsulaires ; il serait bien étonnant que des antigènes somatiques solubles ne soient pas présents, en très faible quantité sans doute, dans le surnageant employé.

Quoi qu'il en soit, la précipitation en milieu gélifié met très bien en évidence la non identité des antigènes utilisés pour la sérotypie selon la méthode de CARTER : elle montre aussi l'absence, dans ces derniers, de tout antigène commun au type I et au variant africain.

L'absorption des sérums de type I classique par les antigènes africains (et inversement des sérums africains par les antigènes de type I) ne modifie pas les lignes spécifiques de précipitation.

C. Sérotypie par protection de la souris

Les différences antigéniques mises en évidence par la précipitation en gélose et l'hémagglutination passive utilisant une même préparation (l'antigène « capsulaire » de CARTER) étaient-elles révélées également par la séro-protection des souris ?

Nous pensions initialement que des fractions antigéniques somatiques immunigènes, communes au type B et au variant africain, devaient provo-

TABLEAU V

Test de séroprotection
Souris éprouvées par la souche P₂ (Cameroun)

Sérum testé et quantité utilisée	Nombre de souris	Souche infectante : P ₂ Doses d'épreuve	Résultats + = mort - = survie
anti-215 .. 0,05 ml	5	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+++++
	5	0,1 ml " " 10 ⁻⁶	+++++
	5	0,1 ml " " 10 ⁻⁷	++++-
anti-R ₂ ... 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+++++
	5	0,1 ml " " 10 ⁻⁶	++++-
	5	0,1 ml " " 10 ⁻⁷	++++-
anti-P ₂ ... 0,02 ml	2	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	--
Témoins	4	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁸	----
	4	0,1 ml " " 10 ⁻⁷	++++

N. B. : Le nombre des souris protégées par le sérum anti-P₂ (à titre de contrôle) est ici très insuffisant ; c'est un de nos premiers essais de dégrossissage.

TABLEAU VI

Test de séroprotection.
Souris éprouvées par la souche P₁₁ (Cameroun)

Sérum testé et quantité utilisée	Nombre de souris	Souche infectante : P ₁₁ Doses d'épreuve	Résultats + = mort - = survie
anti-215(I) 0,05 ml	16	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+++++
	6	0,1 ml " " 10 ⁻⁷	++++-
anti-1305-1(B) 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+++++
anti-P ₇ 0,05 ml	6	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁷	-----
	6	0,1 ml " " 10 ⁻⁴	-----
anti-P ₈ 0,05 ml	6	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁷	-----
	6	0,1 ml " " 10 ⁻⁴	-----
Témoins	9	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁸	+++++
	9	0,1 ml " " 10 ⁻⁷	+++++
	6	0,1 ml " " 10 ⁻⁶	+++++

N. B. : La quantité de sérum utilisée par souris (0,05 ml) dans nos expériences est celle qui nous a fourni, compte tenu de la valeur protectrice moyenne de nos sérums, les résultats les plus significatifs, c'est-à-dire la plus nette

différence entre la protection contre la souche homologe et la protection contre la souche hétérologue, pour une dose infectante de 10.000 DSM.

quer chez le lapin la formation d'anticorps protecteurs communs et donc rendre difficile, sinon impossible, l'appréciation d'une différence dans le degré de protection des souris : « a priori », nous nous attendions donc à une résistance croisée partielle importante.

L'expérience montra qu'il n'en était rien ; la méthode de ROBERTS peut servir aussi à distinguer le type I classique du type africain.

Comme l'indiquent les tableaux V et VI, les sérums de référence anti-215, anti-R₂ et anti-1305-1 ne protègent pas contre les souches africaines, alors qu'ils protègent contre 10.000 DSM en moyenne de n'importe quelle souche de type I.

D'autre part, les sérums anti-variant africain ne protègent pas ou peu contre les souches de type I (voir le tableau VII), alors qu'ils sont très efficaces contre l'infection homologue.

TABLEAU VII

Test de séroprotection.

Souris éprouvées par la souche 215 (I de Roberts)

Sérum testé et quantité utilisée	Nombre de souris	Souche infectante : 215 Doses d'épreuve :	Résultats + = mort - = survie
anti-215 ... 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+ - - - - - - - - -
anti-1305-1 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+ + - - - - - - - -
anti-P ₁₁ ... 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+ + + + + + + + + -
anti-P ₇ 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+ + + + + + + + + -
anti-P ₈ 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+ + + + + + + + + +
Témoins	5	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁸	+ + + - -
	5	0,1 ml " " 10 ⁻⁷	+ + + + +

TABLEAU VIII

Pouvoir protecteur du sérum anti-P₁₁ absorbé par l'antigène B.

Sérum testé et quantité utilisée	Nombre de souris	Souche infectante : P ₁₁ Doses d'épreuve	Résultats + = mort - = survie
anti-P ₁₁ ... 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	- - - - - - - - - -
anti-P ₁₁ absorbé par la souche 1305-I(B)	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	- - - - - - - - - -
anti-B 0,05 ml	10	0,1 ml d'une dilution 10 ⁻⁴	+ + + + + + + + + +

N. B. : La dose sûrement mortelle est la même que dans l'expérience du tableau VI : 0,1 ml à la dilution 10⁻⁸ et la dose d'épreuve est donc ici de 10.000 DSM.

Le sérum anti-P₁₁, absorbé par la souche 1305-1 (B) ne semble pas avoir perdu ses anticorps protecteurs, comme l'indique l'essai du tableau VIII ; aussi peut-on croire qu'il existe bien des anticorps protecteurs spécifiques du groupe africain.

De façon parallèle, le sérum anti-R₂ absorbé par la souche P₁₁ conserve tout son pouvoir protecteur contre l'infection par une souche de type I, tandis qu'il le perd après absorption par la souche 1305-1 (B).

COMMENTAIRES

Les 21 souches étudiées au cours de ce travail ne diffèrent aucunement, rappelons-le, par leurs caractères biochimiques et leur pouvoir pathogène (6) des souches de type B.

Elles constituent un groupe très homogène par leur comportement antigénique ; aucune d'entre elles ne nous a permis d'obtenir un immunosérum agglutinant les hématies sensibilisées par l'antigène B (sinon à un taux très faible), comme ce fut le cas pour la souche du Congo ex-belge qui permit à CARTER de formuler l'hypothèse d'un variant B africain et donc d'apparenter ce variant au groupe B classique (1).

Nos expériences d'hémagglutination et de séroprotection croisées nous conduisent actuellement à établir les relations du type B et du type africain selon le schéma suivant :

Sérum anti-B + antigène T. africain = réaction négative.

Sérum anti-B contre souche T. africain = aucune protection.

Sérum anti-T. africain + antigène B = réaction faiblement positive.

Sérum anti-T. africain contre souche B = protection minime, mais non nulle.

Tout se passe donc comme si l'équipement antigénique du variant africain était un peu plus complet que celui du type B classique, puisqu'il semble induire la formation d'un faible taux d'anticorps anti-B, anticorps que nous n'avons d'ailleurs pas réussi à mettre en évidence par la précipitation en gélose.

La très grande netteté des résultats obtenus par cette dernière méthode, étayés par ceux que fournissent les deux techniques actuelles de sérotypie, nous conduit à penser que ce type africain n'est sans doute pas un sous-groupe du

type B, mais une entité sérologique réelle qui doit s'ajouter aux 4 types classiques connus.

Par ailleurs, les premiers résultats d'une étude immuno-électrophorétique que nous poursuivons actuellement nous indiquent la disparité des antigènes du type africain et de ceux du type B.

Du point de vue pratique, la distinction entre le type B et le type africain nous apparaît très importante.

Tout d'abord il est nécessaire que les laboratoires de diagnostic où la sérotypie des *Pasteurella* est effectuée, puissent reconnaître au moyen d'un immunosérum spécifique les souches africaines bovines qui risquent d'être classées non typables si l'on emploie les quatre sérums-types classiques, qu'il s'agisse de ceux de ROBERTS ou de ceux de CARTER.

Ensuite, la préparation du vaccin contre la pasteurellose septicémique des bovins en Afrique devra utiliser les souches locales, ce qui est d'ailleurs l'habitude dans nombre de laboratoires ; mais il arrive que des souches de référence du type I de Roberts, d'origine non africaine, connues pour leur pouvoir pathogène et immunigène, soient employées.

Le meilleur exemple que nous connaissons est celui de la souche Insein, d'origine asiatique, révélée par les travaux de Bain et fort utilisée par la suite pour la production du vaccin anti-pasteurellique bovin dans de nombreux pays ; nous savons, pour l'avoir testée en 1958 en Afrique Centrale sur de jeunes zébus, que les résultats ne furent pas très satisfaisants : il n'y avait pas une réelle immunité croisée conférée par la souche Insein vis-à-vis des souches du Cameroun et inversement. Ce semi-échec fut alors mis au compte d'une dégradation du pouvoir immunigène de certaines souches, mais nous croyons aujourd'hui que l'explication réelle est trouvée : les types antigéniques sont différents.

Nous savons aussi que dans d'autres pays où la même souche Insein fut employée, des résultats peu favorables, comparables aux nôtres, furent observés ; tout en faisant la part des risques de dégradation de la souche, due à des repiquages intempestifs ou de mauvais procédés de conservation, il est permis de supposer, à la base de ces déceptions, le même processus : la souche vaccinale n'est pas antigéniquement semblable aux souches locales.

CONCLUSIONS

L'étude sérologique de 21 souches de « *Pasteurella multocida* », isolées dans divers pays africains, chez des bovidés morts de pasteurellose septicémique, montre que ces souches ne sont pas identifiables au type I de ROBERTS ou B de CARTER, jusqu'alors considéré comme le seul responsable de la septicémie hémorragique vraie du bétail.

L'hémagglutination passive, la précipitation en milieu gélifié et la séroprotection de la souris fournissent des résultats concordants qui font conclure à l'existence d'un type africain de « *Pasteurella multocida* », antigéniquement très différent du type I classique.

Ce type africain est rencontré dans les pays suivants : Sénégal, Mali, Guinée, Côte d'Ivoire, Nigéria, Cameroun et Centrafrique, pour ce qui est de l'Afrique nord-tropicale.

Il est possible que le type B classique existe également dans ces régions ; mais jusqu'à présent nous n'en avons isolé ou recueilli aucune souche.

Sur le plan pratique, il en découle deux conséquences importantes :

1) la sérotypie de ces souches exige l'emploi d'un immunosérum spécifique, car elles ne sont

pas typables par la méthode d'hémagglutination de CARTER, ni par la méthode de séroprotection de ROBERTS.

2) la préparation du vaccin contre la pasteurellose bovine africaine exige l'utilisation des souches locales qui ne peuvent être remplacées par les souches du type I ou B classique, étant donné l'absence d'immunité croisée.

*Service de microbiologie
Institut d'élevage et de médecine
vétérinaire des pays tropicaux
(Alfort, Seine).*

REMERCIEMENTS

Nous remercions très vivement le Dr R. S. ROBERTS (Evans Biological Institute, Runcorn, Cheshire), le Dr G. R. CARTER et le Dr John MUYSSON (Animal Diseases Research Institute, Hull, Québec) et M. le professeur P. THIBAUT, Institut Pasteur de Paris, de nous avoir aimablement fourni leurs souches de référence ; et nous sommes très reconnaissant à notre confrère G. MEMERY (Laboratoire central du service de l'Élevage, Dakar) qui a contribué pour une large part à la constitution de notre collection de souches.

SUMMARY

A Contribution to the Study of Immunology in *Pasteurella multocida* Infections The existence and importance of a Sub-group B, the cause of bovine Pasteurellosis in Africa.

Twenty-one strains of *P. multocida* from several countries in Africa, isolated from fatal cases of the disease in bovines, have been studied serologically. This has shown that these strains were not identifiable as type I Roberts or type B (Carter) hitherto believed to be the sole causes of true bovine haemorrhagic septicaemia.

Passive haemagglutination, agar-gel precipitation and mouse protection tests have provided corroborative evidence which leads to the conclusion that there exists an African type of *P. multocida* which differs considerably antigenically from the classical type I.

This African type has been recovered from the following northern tropical areas of Africa viz. Senegal, Mali, Guinée, Ivory Coast, Nigeria, Cameroun and the Central-African Republic.

It is possible that the classified type 'B' may also occur in these countries but to-date, no strain has been isolated or received by us.

Two points of practical importance emerge from these facts.

(i) Serotyping of this strain will require the specific immune serum since they cannot be typed by Carter's method of haemagglutination nor by Robert's sero-protection method.

(ii) As there is no cross-immunity between this new strain and that of the type I or B classical strains, bovine pasteurellosis vaccine for use in Africa should be prepared from local isolates.

RESUMEN

Contribucion al estudio inmunológico de *Pasteurella multocida*.

Existencia e importancia de un sub-grupo B agente de la pasterelosis de los bovidos africanos.

El estudio serológico de 21 cepas de *Pasteurella multocida*, aisladas en diversos países africanos de bovidos muertos de septicemia hemorrágica, demostró que tales cepas no se identifican con el tipo I de Roberts o B de Carter, hasta entonces reconocida como la única responsable de la verdadera septicemia hemorrágica de los animales.

La hemoaglutinación pasiva, la precipitación en medio sólido y la seroprotección del ratón, proporcionan resultados concordantes que conducen a la conclusión de la existencia de un tipo africano de *Pasteurella multocida* muy próximo sin duda al tipo B clásico, pero antigénicamente diferente.

Este tipo africano se encuentra en los países siguientes : Senegal, Mali, Costa de Marfil, Nigeria, Camerun y África Central en lo que se refiere al África tropical nórdica.

Es posible que el tipo B clásico exista igualmente en estas regiones pero hasta el presente nosotros no hemos aislado ni recibido ninguna cepa.

Prácticamente se desprenden dos consecuencias importantes :

1) La tipificación sérica de estas cepas exige el empleo de un suero inmune específico, pues ellas no se identifican por el método de hemoaglutinación de Carter, ni por el método de seroprotección de Roberts.

2) La preparación de vacuna contra la pasterelosis africana de los bovidos exigirá la utilización de cepas locales ; las que no pueden ser reemplazadas por las cepas del tipo I o B clásico, dada la ausencia de inmunidad cruzada.

BIBLIOGRAPHIE

1. CARTER (G. R.) 1959. — Communication personnelle.
2. CARTER (G. R.) et BAIN (R. V. S.) — **Pasteurellosis (*Pasteurella multocida*). A review stressing recent developments.** *Vet. Rev. Annotat.*, 1960, **6** (2) : 105-28.
3. CARTER (G. R.). — **Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types.** *Amer. J. vet. Res.*, 1955, **16** : 481-4.
4. LAZEAR (E. J.) et Coll. — **The gel precipitin test. I. Its technique and applications in veterinary medicine.** *Vet. Med.*, 1958, **53** : 229-35.
5. LONDON (S.A.) et YAW (K. E.). — **Antigenic analysis of dissociants and serological types of « *Pasteurella multocida* »** *Canad. J. Microbiol.*, 1957, **3** : 1021-9.
6. PERREAU (P.). — **La septicémie hémorragique des bovidés dans le Centre-Afrique.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1960, **13** : 27-42.
7. OUDIN (J.). — **L'analyse immuno-chimique par la méthode des gels. Moyens et techniques d'identification des antigènes.** *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89** : 531-55.
8. ROBERTS (R. S.). — **An immunological study of *Pasteurella septica*.** *J. comp. Path.*, 1947, **57** : 261-78.