

Péripneumonie contagieuse bovine : test immunoenzymatique et cinétique d'apparition des anticorps au cours d'une infection expérimentale.

Relation entre la fixation du

C. Le Goff¹ | complément, l'excrétion et la
P. C. Lefèvre¹ | recherche de l'antigène circulant

LE GOFF (C.), LEFEVRE (P. C.). Péripneumonie contagieuse bovine : test immunoenzymatique et cinétique d'apparition des anticorps au cours d'une infection expérimentale. Relation entre la fixation du complément, l'excrétion et la recherche de l'antigène circulant. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, 42 (3) : 365-369.

Un protocole d'infection expérimentale de la péripneumonie contagieuse bovine a été mis en place et les animaux ont fait l'objet d'un suivi sérologique sur quatre mois. Le test immunoenzymatique IgG présenté dose les anticorps, avec un retard de quelques jours sur la fixation du complément, mais s'avère meilleur pour un dépistage tardif. La détection des anticorps précoces peut être effectuée grâce à un TIE/IgM. Du galactane circulant a pu être mis en évidence sur une vache morte d'une forme aiguë de la maladie. L'excrétion débute une à deux semaines avant que ne s'amorce une séroconversion ; le TIE/IgG reste positif pendant toute la phase d'excrétion et au-delà.
Mots clés : Bovin - Péripneumonie contagieuse bovine - Infection expérimentale - Test ELISA - Technique immunologique - Anticorps.

Sur le terrain, la séroagglutination sur lame (SAG) (5, 13), qui utilise un antigène coloré, se révèle être à l'échelon d'un troupeau une méthode facile d'emploi, dont la fiabilité est d'autant meilleure que l'on se situe dans la phase d'état de la maladie.

Une synthèse qui répertorie l'ensemble des réactions utilisées dans le diagnostic de la PPCB a récemment été publiée (11) ; elle précise pour chacune des réactions les modalités, les avantages et les limites d'emploi.

INTRODUCTION

Le diagnostic sérologique de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est dûment codifié depuis de nombreuses années, et repose sur la mise en oeuvre de trois réactions majeures.

Au laboratoire, la fixation du complément (FC) est couramment pratiquée ; elle s'effectue selon le protocole décrit par CAMPBELL et TURNER (2). Des modifications mineures ont été apportées, entre autres l'utilisation d'une microtechnique (3, 8).

L'immunodiffusion double en gélose (5, 13) est employée pour mettre en évidence l'antigène diffusible spécifique de *Mycoplasma mycoides* SC : le galactane ; elle est utilisée chaque fois qu'un résultat est négatif en FC, alors que la PPCB est suspectée.

C'est notamment en phase aiguë de la maladie que l'on observe ce phénomène car le galactane, souvent libéré en grande quantité dans l'organisme, sature rapidement l'ensemble des sites anticorps et forme des immunocomplexes (4, 12).

1. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays tropicaux, IEMVT-CIRAD, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

Reçu le 17.04.89, accepté le 28.04.89.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Différents travaux ont été entrepris avec le Laboratoire National de Pathologie Bovine (LNPB) de Lyon, sur les relations qui existent entre l'excrétion des mycoplasmes et les taux d'anticorps, mis en évidence avec les méthodes classiques de fixation du complément (FC), d'hémagglutination passive (HAP) et de séroagglutination sur lame (SAG) (9).

En ce qui concerne la spécificité des réactions, une étude, qui tente de déterminer l'origine des fausses réactions positives, a également été proposée (10).

A l'IEMVT, la cinétique d'apparition des anticorps a été étudiée grâce à un test immunoenzymatique (TIE), et la recherche d'antigène circulant a été pratiquée sur les sérums. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec l'excrétion et la FC'.

Conditions d'expérience

Le protocole de reproduction expérimentale de la maladie se trouve exposé en détail par BELLI et collab. (1). Rappelons que cinq vaches ont été inoculées par voie endobronchique avec 3.10^9 mycoplasmes ; cinq autres ont servi de témoins-contacts ainsi que cinq chèvres. Des prises de sang bihebdomadaires ont été effectuées jusqu'à l'abattage.

Tests sérologiques utilisés

Immunodiffusion double en gélose

Afin de la rendre plus facile d'exécution, cette méthode a subi quelques modifications de forme (8). Des disques de papier pour antibiogrammes(*) de 7 mm de diamètre sont imbibés de sérums par capillarité, puis déposés sur une fine couche de gélose.

La lecture des résultats est effectuée 24 et 48 heures après. Les lignes de précipité nettes sont notées +, les autres, très fines, peu visibles ou floues et souvent d'apparition fugace, sont notées ±.

Test immunoenzymatique

Depuis sa publication (6), le test a été affiné et les modifications, dont il a fait l'objet, nécessitent un bref rappel du protocole :

— tous les réactifs sont employés à raison de 50 µl par cupule ;

— des plaques(**) sont sensibilisées une nuit à 4 °C avec une suspension d'antigène membranaire. Obtenues par l'action des ultra-sons et du dodécyl sulfate de sodium à 0,2 p. 100, ces membranes sont récoltées après 30 mn de centrifugation à 20 000 g. La dilution d'emploi retenue est de l'ordre du 1/300, pour une concentration en protéines de 10 à 15 µg/ml ;

— pour titrer les IgG, les sérums sont dilués au 1/800 et au 1/8 000 pour les IgM. Examinés en double, ils sont déposés 1 heure à 37 °C ;

— le conjugué anti-bovin couplé à la peroxydase est employé au 1/8000 ;

— le substrat est composé d'une solution de 1-2 phénylènediamine (OPD) en tampon citrate pH 5 additionné de 15 p. 100 d'H₂O₂ à 10 volumes. Après 10 mn à l'abri de la lumière, la réaction est arrêtée avec 10 µl d'H₂SO₄ 1M, et la densité optique (DO) est enregistrée à 492 nm.

RÉSULTATS

Vaches inoculées

Hormis la vache 15, qui fera l'objet d'un développement particulier, les résultats observés sur ces animaux ne seront pas pris en compte car il est probable que la stimulation de leur système immunitaire soit non conforme à celle observée lors de la maladie naturelle, et des biais importants peuvent conduire à une interprétation hasardeuse des résultats.

(*) BioMérieux

(**) Flow Linbro.

Cas de la vache 15

Cet animal est mort d'une forme aiguë de la maladie, un mois après l'inoculation ; il est le seul sur lequel a été mis en évidence de l'antigène circulant diffusible. Ce dernier est apparu moins d'une semaine après le début de la montée des anticorps et a persisté jusqu'à la mort de l'animal.

A ce moment, une chute nette et brutale du taux d'anticorps s'est amorcée et il n'a pas été possible de vérifier si elle irait jusqu'à la négativité totale comme il est logique de le penser.

Vaches témoins contacts

La séroconversion de ces animaux est décelée en FC entre la 4ème et la 7ème semaine après l'inoculation avec des titres élevés pouvant atteindre le 1/5 120.

On peut noter le comportement de la vache 16, dont la réponse a été la plus tardive et où le taux ne dépasse pas le 1/160.

Tous ces animaux possèdent encore des anticorps au moment de l'abattage pratiqué quatre mois après le début de l'expérience.

Détermination du seuil de positivité

Lorsque la fixation du complément est négative, les densités optiques enregistrées avec le TIE/IgG sont comprises entre 0,05 et 0,15. Pour le TIE/IgM, elles se situent entre 0,10 et 0,20. Les moyennes sont respectivement de 0,10 et 0,15 ; le seuil de positivité, évalué à deux fois la valeur moyenne, sera donc égal à 0,20 pour les IgG et 0,30 pour les IgM.

Comparaison TIE/FC' (Fig. 1)

Pour tous les animaux, les courbes obtenues avec la FC et le TIE/IgM sont caractérisées par une montée rapide des anticorps. Cette constatation reste valable avec le TIE/IgG pour les vaches 14 et 16 ; la mise en place de la réponse des trois autres animaux se fait progressivement avec un profil de pente faible.

L'ensemble de ces résultats est consigné dans le tableau I où le premier jour d'apparition des anticorps, mis en évidence par la FC, est noté J. Comparativement, le délai observé avec les réactions de TIE/IgM et IgG sera enregistré J+ ou - un certain nombre de jours.

Cette étude montre que la détection des IgM, tant en FC qu'en TIE, précède de 4 à 7 jours celle des IgG, sauf pour la vache 14 où le délai d'apparition est le même.

Le cas particulier de la vache 16, où la mise en évidence des IgG devance de 4 jours celle des IgM, reste sans explication.

Fig. 1 : Cinétique TIE/FC.

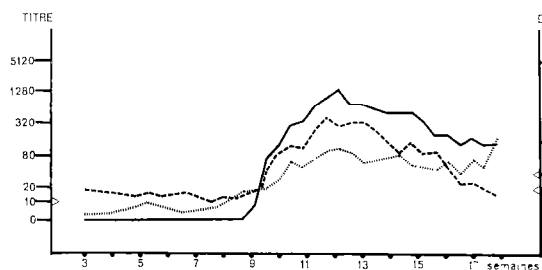
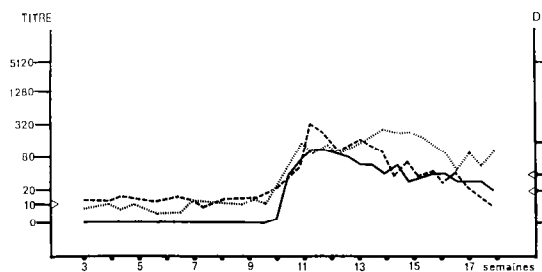
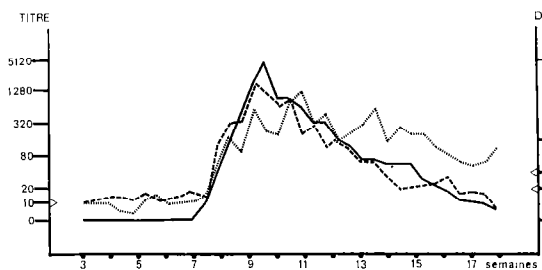
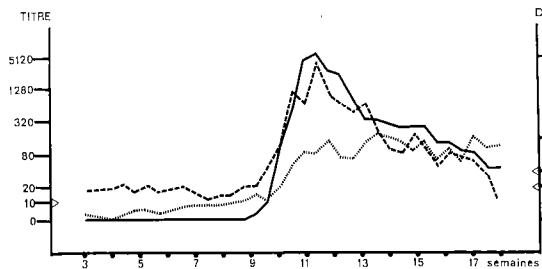
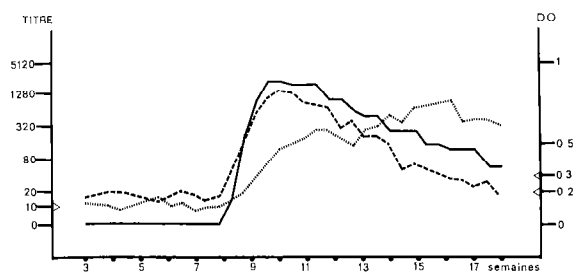
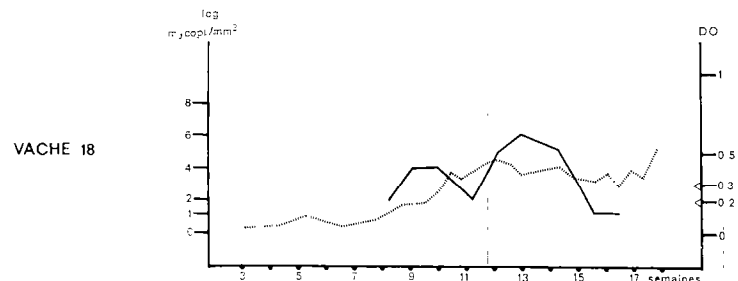
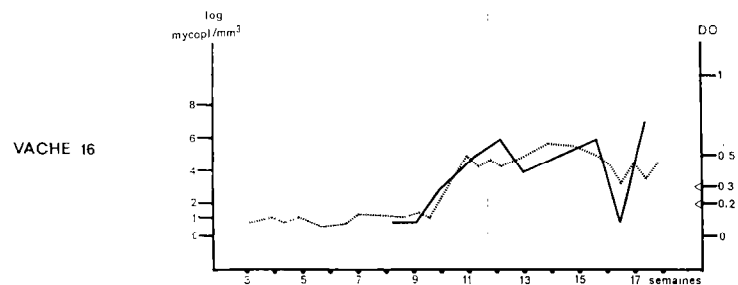
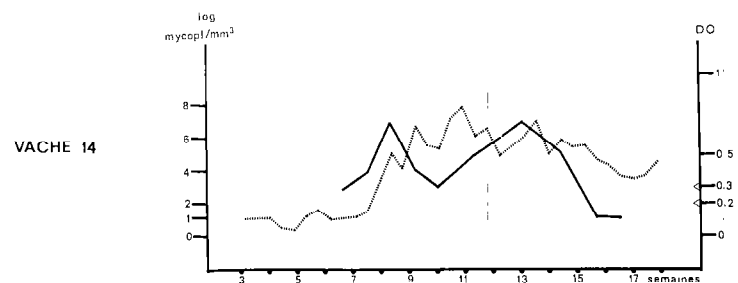
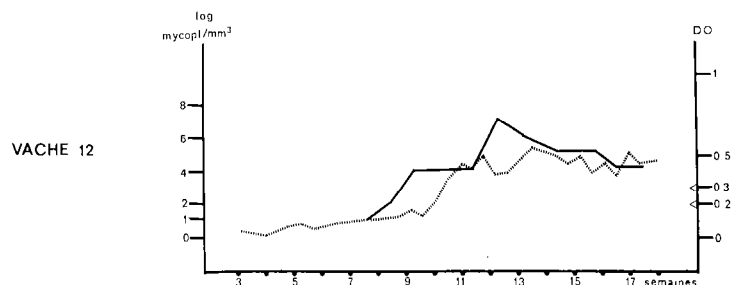
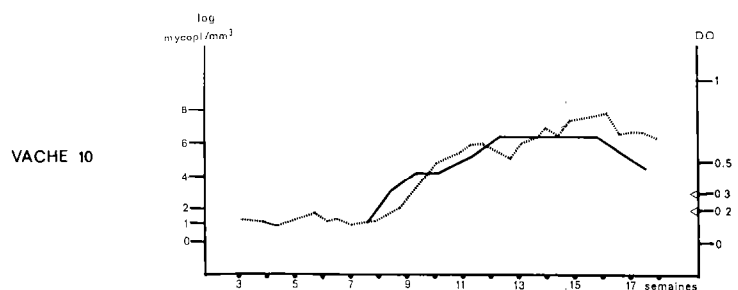


Fig. 2 : Cinétique TIE/excrétion.



— EXCRETION ou FC² TIE/IgG

--- TIE/IgM

TABLEAU I Résultats sérologiques.

Réaction		Vache				
		10	12	14	16	18
FC'	Jour	J	J	J	J	J
	Dilution	++ 1/20	+++ + 1/10	++++ 1/10	++++ + 1/40	+++ + 1/80
TIE/IgM	Jour	J	J	J + 4	J	J
	D.O.	0,30	0,30	0,47	0,32	0,32
TIE/IgG	Jour	J + 7	J + 4	J + 4	J - 4	J + 4
	D.O.	0,28	0,21	0,30	0,24	0,23

Comparaison TIE/excrétion

L'excrétion a été effectuée au LNPN de Lyon, et les résultats comparatifs avec le TIE sont enregistrés dans la figure 2.

Trois vaches continuent à excréter jusqu'à la fin de l'expérience ; il s'agit des vaches 10, 12 et 16, quant aux vaches 14 et 18, l'excrétion est de plus courte durée puisqu'elle s'arrête 15 jours avant l'abattage. Or, ces distinctions nettes ne se retrouvent pas dans le profil des courbes du TIE où l'aspect en plateau de la réponse, à ce stade de l'expérimentation, est remarquable.

L'apparition des IgG décelables en TIE est en retard d'une à deux semaines sur le début de l'excrétion, temps nécessaire pour la mise en place de la réponse immunitaire.

Étude du rôle des chèvres-contacts

L'analyse des cinq sérums de chèvres n'a pas montré d'anticorps dirigés contre *Mycoplasma mycoides* SC, les valeurs du TIE n'ayant jamais dépassé une DO supérieure à 0,10.

DISCUSSION

En fixation du complément, les pics maximums de réponse sont atteints en deux à quatre semaines après l'apparition des premiers anticorps ; ensuite, et jusqu'à l'abattage des vaches, les courbes amorcent une décroissance plus ou moins rapide suivant les animaux.

La mise en évidence précoce des anticorps par le TIE/IgM et la bonne corrélation des résultats obtenus en FC est normale puisque cette dernière dose indifféremment IgG et IgM.

En ce qui concerne le test immunoenzymatique, les IgM restent positives pendant un à deux mois après l'infection, alors que les IgG le sont encore au bout de quatre mois avec des valeurs de DO en plateau comprises entre 0,4 et 0,6.

Le bon maintien de ces données est favorable à la détection plus tardive des anticorps que ne le fait la FC. Pour juger de la valeur du TIE/IgG dans le temps, il aurait fallu prolonger l'expérience de quelques mois.

Néanmoins, si peu de travaux sur la PPCB ont encore été menés avec le TIE, cette méthode très sensible a permis à ONOVIRAN et TAYLOR-ROBINSON (7) de révéler la présence d'anticorps dix-neuf mois après la guérison clinique de la maladie, et vingt-trois mois après la vaccination.

Sa grande simplicité d'exécution après standardisation permet l'analyse d'un grand volume d'échantillons, notamment dans les pays où les conditions de réalisation de la FC ne sont pas toujours réunies.

CONCLUSION

Si le choix du moyen de diagnostic reste possible entre TIE/IgM et FC, il est conseillé de préférer le TIE/IgG pour déceler les anticorps tardifs.

LE GOFF (C.), LEFEVRE (P. C.). Contagious bovine pleuropneumonia : enzyme linked immunoassay and kinetic assay of the immune response during an experimental infection. Relationships with complement fixation test and presence of circulating antigen. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 365-369.

An experimental reproduction of CBPP was implemented and the animals were surveyed for serology during 4 months. The ELISA/IgG test detects the antibodies few days after the CF test but is more precise for detection on the longer term. The early antibody detection can be done with the ELISA/IgM test. Circulating antigen (galactan) has been detected in a cow that died of an acute form of CBPP. Excretion of mycoplasmas starts 1 to 2 weeks before the seroconversion : the ELISA/IgG test remains positive during the excretion phase and even longer. *Key words* : Cattle - Contagious bovine pleuropneumonia - Experimental infection - ELISA test - Immunological technique - Antibody.

LE GOFF (C.), LEFEVRE (P. C.). Perineumonia contagiosa bovina : prueba inmunoenzimática y cinética de aparición de los anticuerpos durante una infección experimental. Relación entre la fijación del complemento, la excreción y la búsqueda del antígeno circulante. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 365-369.

Se puso en puesto un programa de infección experimental de la perineumonia contagiosa bovina y se observaron los animales desde el punto de vista serológico durante cuatro meses. La prueba inmunoenzimática IgG presentada dosifica los anticuerpos, con un retraso de algunos días con relación a la fijación del complemento, pero se revela mejor para una detección tardía. Se puede efectuar la detección de los anticuerpos precoces gracias a una PIE/IgM. Se pudo evidenciar galactano circulante en una vaca muerta de una forma aguda de la enfermedad. La excreción empieza una a dos semanas antes del principio de una seroconversión ; el PIE/IgG queda positivo durante la fase de excreción y más allá. *Palabras claves* : Bovino - Perineumonia contagiosa bovina - Infección experimental - Prueba ELISA - Técnica inmunológica - Anticuerpo.

BIBLIOGRAPHIE

1. BELLI (P.), POUMARAT (F.), PERRIN (M.), LONGCHAMBON (D.), MARTEL (J. L.). Reproduction expérimentale et évolution de la péripneumonie contagieuse bovine dans un groupe de bovins et de caprins : aspects anatomo-cliniques. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 349-356.
2. CAMPBELL (A. D.), TURNER (A. W.). Studies on contagious pleuropneumonia of cattle. IV. An improved complement-fixation test. *Aust. vet. J.*, 1953, **29** : 154-163.
3. DANNACHER (G.), PERRIN (M.), MARTEL (J. L.), PERREAU (P.), LE GOFF (C.). Report of evaluation of the European comparative trial concerning complement fixation test for diagnosis bovine pleuropneumonia. *Annls Rech. vét.*, 1986, **17** (1) : 107-114.
4. GOURLAY (R. N.). Comparison between some diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia. *J. comp. Path.*, 1965, **75** : 97-109.
5. GRIFFIN (R. M.). A gel diffusion precipitin test for contagious bovine pleuropneumonia. *J. comp. Path.*, 1965, **75** (2) : 223-231.
6. LE GOFF (C.). Technique immunoenzymatique appliquée au diagnostic sérologique de la péripneumonie. Note préliminaire. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1986, **39** (2) : 171-173.
7. ONOVIRAN (O.), TAYLOR-ROBINSON (D.). Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Rec.*, 1979, **105** : 165-167.
8. PERREAU (P.). Le diagnostic sérologique de la péripneumonie. Progrès techniques actuels. *Bull. Off. int. Épizoot.*, 1975, **84** : 349-358.
9. POUMARAT (F.), PERRIN (M.), BELLI (P.), MARTEL (J. L.). Corrélation entre l'excrétion des mycoplasmes et les cinétiques des anticorps mis en évidence par fixation du complément, hémagglutination passive et séroagglutination rapide, au cours d'une infection expérimentale de bovins par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 357-364.
10. POUMARAT (F.), PERRIN (M.), BELLI (P.), LONGCHAMBON (D.), LE GOFF (C.), MARTEL (J. L.). Recherche sur l'origine des fausses réactions positives dans le diagnostic sérologique de la péripneumonie contagieuse bovine. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 371-378.
11. PROVOST (A.), PERREAU (P.), BRÉARD (A.), LE GOFF (C.), MARTEL (J. L.), COTTEW (G. S.). Péripneumonie contagieuse bovine. *Revue scient. tech. Off. int. Épizoot.*, 1987, **6** (3) : 565-624.
12. TURNER (A. W.), ETHERIDGE (J. R.). Slide agglutination tests in the diagnosis of bovine contagious pleuropneumonia. *Aust. vet. J.*, 1963, **39** : 445-451.
13. WHITE (G.). Agar double diffusion precipitation reaction applied to the study of *Asterococcus mycoides*. *Nature*, 1958, **181** : 278-279.