

Préparation de sérums anti-*Pasteurella multocida* monospécifiques de type

P. PERREAU

avec la collaboration technique de P. PERREAU et M. T. BOTTO

Note présentée par M. VALLÉE

La sérotypie de *Pasteurella multocida* utilise deux méthodes : un test immunologique de séroprotection de la souris (10) et un test sérologique d'hémagglutination passive (2).

Cette dernière épreuve est de loin la plus facile pour la sérotypie de routine ; rappelons qu'elle a permis la division de l'espèce en quatre sérotypes A, B, D et E (3, 6) correspondant chacun à un antigène lipopolyosidique spécifique de surface (1, 4, 5, 8), qu'il est prudent de ne pas considérer comme rigoureusement capsulaire.

La condition essentielle est bien sûr de disposer de sérums satisfaisants et c'est là que commencent les difficultés ; les sérums obtenus après hyperimmunisation des lapins ne sont pas toujours spécifiques. La même constatation est faite par les expérimentateurs qui utilisent les moutons et les chèvres pour la production de leurs sérums.

En pareil cas, l'explication communément proposée est celle des réactions croisées entre les sérotypes et le doute est donc jeté sur la valeur ou la commodité de la méthode.

Or, l'expérience montre que cette « absence de spécificité » n'est pas à rapporter d'emblée à des réactions croisées, *tout au moins avec le système antigène-anticorps mis en jeu dans l'hémagglutination passive*, mais d'abord à des infections naturelles occultes antérieures ou concomitantes au processus d'immunisation, ou encore à des vaccinations préalables.

En effet il est commun de trouver des animaux adultes normaux porteurs d'anticorps naturels à des titres non négligeables.

Les lapins ont souvent des anticorps anti-A (jusqu'à 1/160 ou 1/320) ou des anticorps anti-D à des titres plus faibles.

Sur 24 sérums de moutons acquis par notre laboratoire, avant toute immunisation, aucun n'était vraiment négatif vis-à-vis du type A et 8 étaient nettement positifs à 1/320 ; 4 l'étaient aussi vis-à-vis du type D (1/10 à 1/80).

Il est arrivé que des chèvres nous aient fourni d'emblée du sérum utilisable pour la sérotypie (1/640 pour le sérotype A), avant toute injection d'antigène. Chez les bovins, la fréquence des anticorps A est très grande et ceux-ci atteignent des titres élevés : sur 268 bovins adultes (7) dont le sérum fut éprouvé par hémagglutination passive vis-à-vis des 4 sérotypes, 51 atteignaient ou dépassaient 1/640 pour l'antigène A, 7 atteignaient 1/160 pour l'antigène D.

Cette sérologie spontanément positive ne s'observe en France qu'avec les types A et D communément répandus ; par contre, aucun des animaux introduits au laboratoire n'avait d'anticorps contre les types B et E, encore jamais isolés dans notre pays et dont l'aire géographique est presque exclusivement tropicale.

Les animaux gardés plusieurs semaines en observation ou mis en attente pour des expériences diverses ont des titres d'anticorps A et D qui évoluent avec le temps, apparaissent ou disparaissent ; c'est particulièrement net chez les agneaux nés au laboratoire dont les sérums restent négatifs pendant les semaines qui suivent leur naissance et deviennent un jour brusquement positifs (vis-à-vis du sérotype A le plus fréquemment) sans qu'aucun signe clinique même fruste ait pu être observé.

L'importance et la fréquence de ces titres d'anticorps naturels rencontrés chez les animaux domestiques parvenus à l'âge adulte rendent donc très aléatoire l'obtention après immunisation de sérums spécifiques, sans même que des réactions croisées soient en cause.

Il faudrait *a priori* n'utiliser que des animaux sérologiquement négatifs à l'égard des quatre sérotypes et pouvoir les conserver pendant leur immunisation à l'abri de toute infection naturelle, ce qui est impossible dans les conditions habituelles de travail.

Hormis les rares cas où les sérums récoltés après immunisation ne contiennent d'emblée qu'un seul type d'anticorps, la préparation des sérums monospécifiques se fera donc par absorption des anticorps hétérotypiques ; l'objet de cette note est précisément d'en décrire une méthode qui consiste à les absorber par les antigènes lipopolyosidiques correspondants. L'utilisation de ces sérums en sérotypie par hémagglutination passive montre par ailleurs que, pour un petit nombre de souches, des réactions croisées réelles peuvent exister.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — *Animaux.*

Nous avons préféré utiliser des moutons adultes (de 1 à 2 ans), bien que le lapin soit l'animal communément employé pour la production des sérums de diagnostic.

En effet, les petits ruminants (moutons et chèvres) répondent mieux à l'injection des antigènes pasteurelliques et fournissent des titres d'anticorps plus élevés que ne le font les lapins ; en outre, les quantités de sérum recueillies sont évidemment beaucoup plus importantes.

II. — *Souches de P. multocida.*

Après un certain nombre d'essais préliminaires, pour la préparation des sérums, ce travail n'a mis en œuvre que 4 souches, choisies dans notre collection pour leur comportement sérologique bien défini :

- Souche A. 14, d'origine caprine (pneumonie, Niger) ;
- Souche B. 850, d'origine bovine (pasteurellose septicémique, Cambodge) ;
- Souche D. 1, d'origine porcine (pneumonie, Congo) ;
- Souche E. 15, d'origine bovine (pasteurellose septicémique, Cameroun).

Sur milieu gélosé, les souches A. 14 et D. 1 sont muqueuses (de façon modérée), comme c'est la règle eu égard à leur type ; les deux autres sont très iridescentes.

Ensuite, 41 souches d'origines très diverses servirent à éprouver les sérums.

III. — *Protocoles d'immunisation.*

L'antigène d'immunisation est une simple suspension de bactéries en sérum physiologique contenant soit du formol à 3 p. 1.000 soit du merthiolate de sodium à 1 p. 5.000.

Ces germes ont été récoltés après 18 à 20 heures de culture sur gélose Tryptose-Extrait de levure contenant 5 p. 100 de sérum de cheval ; on s'est assuré qu'ils étaient en phase S (colonies iridescentes). L'opacité de la suspension bactérienne est celle du tube n° 20 de Brown.

On injecte d'abord aux moutons par la voie sous-cutanée 4 ml d'un mélange à parties égales de cette suspension et d'adjuvant

complet de Freund ; 3 à 4 semaines après commence une série d'injections intraveineuses de la suspension ajustée au tube n° 10 de Brown, à raison de 2 injections par semaine et sous les volumes suivants : 1, 1, 2, 2, 3, 3, 4 et 4 ml.

La montée du titre des anticorps est suivie par hémagglutination passive ; il arrive que des animaux aient un titre satisfaisant avant la fin de cette série et aussi que d'autres animaux aient, après la dernière injection, un titre très insuffisant.

En ce dernier cas, on peut laisser les moutons au repos pendant deux à trois mois et, soit recommencer une série d'injections, soit les infecter avec la souche vivante par voie sous-cutanée ou par la voie respiratoire au moyen d'un aérosol. En général, cette « infection de rappel » donne de bons résultats, mais il est prudent de surveiller son évolution afin d'intervenir avec des antibiotiques le cas échéant.

IV. — Hémagglutination passive.

La sensibilisation des hématies de mouton, qui utilise exclusivement les lipopolyosides spécifiques, s'effectue pendant une heure au moins à 37 °C, à raison de 0,1 ml de culot pour 1 ml de solution d'antigène et la concentration optimale de celui-ci est déterminée vis-à-vis d'un sérum positif au moyen d'un titrage très classique, dont on trouvera un exemple dans le tableau qui suit :

TABLEAU I
Titrage de l'activité sérologique d'un lipopolyoside spécifique de *Pasteurella multocida*

Lipopolyoside A. 2478 Dilutions	Dilutions du sérum anti-A						
	1/20	1/40	1/80	1/100	1/320	1/640	1/1.280
1/20	4 (*)	4	4	4	4	4	—
1/40	4	4	4	4	4	4	2
1/80	4	4	4	4	4	3	—
1/160	1	1	1	1	—	—	—

(*) Système de notation à 4 croix.

En ce cas, le lipopolyoside A. 2478 sera donc utilisé au 1/40 pour sensibiliser les hématies.

Le protocole de la réaction est classique (6).

V. — *Lipopolyosides spécifiques.*

Ils sont extraits par la méthode de Westphal selon un protocole qui a été déjà décrit (8).

Toutefois, pour cet usage précis, ils n'ont pas été lyophilisés et sont donc conservés en solution aqueuse ; en outre, après la dialyse qui élimine le phénol, les extraits de type A et de type D sont soumis à l'action de l'hyaluronidase (*) afin de les rendre sérologiquement actifs.

VI. — *Absorption des sérums.*

Le sérum des moutons immunisés est d'abord titré par hémagglutination passive vis-à-vis de l'antigène homologue et des trois hétérologues.

Les absorptions n'ont pas été systématiques, mais ont visé exclusivement les anticorps hétérologues gênants (anti-A dans la majorité des cas).

Au début de nos essais, pour des raisons de commodité, chaque sérum était dilué au 1/2 dans du P. B. S. avant d'être absorbé ; cela n'a rien d'obligatoire.

L'absorption se fait selon le protocole suivant :

- 1° addition d'un volume de solution de lipopolyoside égal au 1/10 du volume de sérum dilué au 1/2 ou non,
- 2° mélange et mise à l'étuve durant 2 heures,
- 3° élimination de l'immun-précipité par centrifugation.

Après prélèvement d'un échantillon qui est soumis au test d'hémagglutination pour vérifier la diminution du titre des anticorps hétérotypiques, la seconde absorption commence et ainsi de suite. Après un nombre d'opérations variable (3 à 8) avec chaque sérum, mais toujours proportionnel au titre initial des anticorps à absorber, la disparition de ceux-ci est annoncée par l'absence de précipité visible, mais doit être contrôlée par hémagglutination.

Il est commode, lorsque des volumes importants de sérum sont à absorber, de dégrossir le problème au préalable sur un petit échantillon, de façon à juger de la quantité globale de lipopolyoside nécessaire et à écourter ensuite la série des absorptions.

(*) Hyaluronidase Choay lyophilisée, 10 unités par ml d'antigène.

Une fois devenu spécifique, l'antisérum peut être ramené à son volume initial ou même concentré par mise en dialyse contre du polyéthylèneglycol.

RÉSULTATS

Les sérums obtenus sont devenus monospécifiques en hémagglutination passive et les tableaux qui suivent illustrent ce résultat :

TABLEAU II

*Absorption par le lipopolyoside A d'un sérum anti-E,
à haut titre d'anticorps A*

		Dilutions du sérum à absorber (inverses)								
		20	40	80	160	320	640	1.280	2.560	5.120
Sérum initial E. 15	Titre E (homologue)	4	4	4	4	4	4	4	4	tr.
	Titre A (hétérologue)	4	4	4	4	4	4	3	1	—
Après 3 absorp- tions	— E (homologue)	4	4	4	4	4	4	4	2	—
	— A (hétérologue)	4	4	4	4	4	—	—	—	—
Après 6 absorp- tions	— E (homologue)	4	4	4	4	4	4	3	—	—
	— A (hétérologue)	4	4	4	4	2	—	—	—	—
Après 9 absorp- tions	— E (homologue)	4	4	4	4	4	tr.	—	—	—
	— A (hétérologue)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

L'exemple du tableau II est un cas limite : il a fallu 9 absorptions pour éliminer des anticorps A d'un titre presque égal à celui des anticorps homologues ; ceux-ci ont diminué, mais sont restés en quantité satisfaisante pour l'usage que l'on destine au sérum.

Rien ne prouve que cette diminution des anticorps homologues soit le résultat d'une absorption d'ordre sérologique ; on peut aussi, en toute vraisemblance, la rapporter à un phénomène purement physique d'entraînement par l'immun-précipité.

Dans la majorité des cas, 2 à 4 absorptions suffisent.

Les sérums actuellement utilisés dans notre laboratoire pour la sérotypie de routine ont les titres suivants :

	Sérum anti-A 14	Sérum anti-B 850	Sérum anti-D 1	Sérum anti-E 15
Antigène A	1/2.560	—	—	—
Antigène B	—	1/640	—	—
Antigène D	—	—	1/320	—
Antigène E	—	—	—	1/320

Le sérum anti-A a un titre beaucoup plus élevé que les 3 autres car il était *monospécifique d'emblée* et n'a pas été absorbé.

Cette monospécificité des sérums est évidemment liée à la spécificité des lipopolyosides de surface, que d'autres auteurs (4) ont aussi vérifiée.

Nous avons déjà dit que, *dans le système antigène-anticorps mis en jeu dans l'hémagglutination passive*, l'existence de réaction croisée était peu probable et qu'en cas de polyvalence d'un immun-sérum de type il fallait songer en premier lieu aux anticorps des infections naturelles ; cette opinion est étayée par le fait que, sur un grand nombre d'animaux immunisés selon le protocole décrit, quelques-uns ont fourni d'emblée un sérum monospécifique et cela s'est vu pour chacune des souches employées. Ces sujets, par chance, étaient vraiment *neufs* sérologiquement lorsqu'ils reçurent les injections d'antigène.

Il restait à éprouver la valeur de ces sérums monospécifiques sur les souches de *P. multocida* de notre collection en dehors des souches retenues pour la production de sérums ; pour chacune d'entre elles, un antigène fut préparé selon la méthode de Westphal, adsorbé sur des hématies de mouton et soumis simultanément à l'action des quatre sérums ;

Les résultats furent les suivants :

- pour 10 souches de type A, l'hémagglutination fut positive avec le sérum anti-A et parfaitement négative avec les trois autres sérums.

- pour 10 souches de type B, la réaction fut de la même façon positive seulement avec le sérum anti-B ;

- pour 13 souches de type E, la réaction fut positive seulement avec le sérum anti-E ;

- pour 6 souches de type D, la réaction fut positive seulement avec le sérum anti-D.

Mais deux souches préalablement classées dans le type A fournirent des antigènes qui, adsorbés sur les hématies, provoquèrent

une hémagglutination positive, bien que de degré inégal, aussi bien avec le sérum anti-A qu'avec le sérum anti-D :

Souche A. 7 (chien)	A+ 1/2.560	et	D+ 1/80
Souche A. 9 (volaille)	A+ 1/160	et	D+ 1/80

En résumé, sur 41 souches de *P. multocida* les antigènes lipopolysidiques se montrent rigoureusement spécifiques pour 39 d'entre elles, sans réaction croisée aucune.

Pour les deux autres, il existe une réaction croisée véritable avec les antisérums A et D ; c'est-à-dire que ces bactéries possèdent à leur surface soit les deux types de lipopolysides soit un seul lipopolyside possédant dans la même molécule les deux motifs antigéniques A et D. On peut penser raisonnablement, à la vue des différences de titres, que l'antigène A y existe en quantité plus importante que l'antigène D.

On peut noter aussi que cette existence de réaction croisée n'est observée que dans le groupe A : toutefois le nombre des souches D est trop faible pour que l'on puisse exclure l'éventualité d'un tel phénomène parmi les souches de ce type.

CONCLUSIONS

1° La fréquence des infections naturelles occultes à *P. multocida* chez les espèces animales utilisées au laboratoire rend aléatoire la production directe de sérums monospécifiques de type, avant même d'envisager des réactions croisées authentiques.

2° Il est néanmoins possible de préparer des sérums monospécifiques en partant de souches choisies pour leur comportement sérologique bien défini et leur bon état antigénique à condition d'absorber les anticorps hétérotypiques rencontrés par les lipopolysides de type correspondants.

3° L'essai de ces sérums sur 41 souches de *P. multocida* d'origines diverses montre que les antigènes mis en jeu dans l'hémagglutination passive sont parfaitement spécifiques pour 39 d'entre elles. Pour les deux autres souches, il faut bien admettre que les antigènes A et D coexistent à la surface de la même bactérie.

4° Il apparaît donc qu'à côté des types spécifiques A, B, D et E existent des souches mixtes où l'on retrouve à la fois les antigènes A et D, l'antigène A étant vraisemblablement dominant et ces souches pouvant rester rattachées au type A.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAIN (R. V. S.) et KNOX (K. W.). — The antigens of *Pasteurella multocida*, type I. II. Lipopolysaccharides. *Immunology*, 1961, **4**, 122-129.
 2. CARTER (G. R.). — Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Amer. J. vet. Res.*, 1955, **16**, 481-484.
 3. CARTER (G. R.). — Proposed modification of the serological classification of *Pasteurella multocida*. *Vet. Rec.*, 1963, **75** (47), 1264.
 4. CARTER (G. R.) et RAPPAY (D. E.). — A haemagglutination test employing specific lipopolysaccharide for the detection and measurement of pasteurilla antibodies to *Pasteurella multocida*. *Brit. vet. J.*, 1963, **119** (2), 73-7.
 5. LENNAN (A. P. Mac) et RONDLE (C. J. M.). — *Pasteurella septica* : the occurrence of type-specific polysaccharides containing aldoheptose sugars. *Nature*, 1957, **180**, 1045-1046.
 6. PERREAU (P.). — La sérotypie de *Pasteurella multocida*. *Bull. Ass. Vét. Microbiol.*, 1967, n° 1, 25-37.
 7. PERREAU (P.). — Travaux non publiés.
 8. PERREAU (P.) et PETIT (J. P.). — Antigène lipopolyosidique de *Pasteurella multocida* type E. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1963, **16**, 5-18.
 9. PRINCE (G. H.) et SMITH (J. E.). — Antigenic studies on *Pasteurella multocida* using immunodiffusion techniques. III. Relationships between strains of *Pasteurella multocida*. *J. comp. Path.*, 1966, **76**, 321-332.
 10. ROBERTS (R. S.). — An immunological study of *Pasteurella septica*. *J. comp. Path.*, 1947, **57**, 261-278.
-