

Dépistage allergique global des infections mycobactériennes

Préparation et contrôle sur cobayes de sensitines purifiées

par L. VALETTE, L. JOUBERT et J. OUDAR (*)

A mesure que se résorbe, en France, le reliquat de tuberculose bovine, sous l'influence de la prophylaxie spécifique — le taux moyen de réagissants sur l'ensemble du troupeau national oscillant, à l'heure actuelle, autour de 0,9 % — les troupeaux assainis, en dehors de toute réinfection à bacilles tuberculeux bovins, présentent de plus en plus fréquemment des réactions faussement positives ou douteuses à la tuberculine, simulant des réinfections tuberculeuses.

De telles pseudo-défaillances par excès de la tuberculine par co-ou para-allergie, rançon de l'ultime étape de la prophylaxie « de détail » (5 *bis*) semblent imputables très souvent à des infections par des mycobactéries atypiques (6, 12 *bis*), vis-à-vis desquelles les troupeaux assainis semblent devenir hypersensibles.

Parmi ces mycobactérioses atypiques, la thélite nodulaire tuberculoïde de la vache laitière (7) réclame une place de choix, bien que son étiologie, dans certains cas, au moins, probablement — mais non exclusivement — due à *Mycobacterium aquae*, demeure fort imprécise, en raison de la rareté des prélèvements opérés sur des animaux de valeur — souvent traités par surcroît. Il s'y ajoute la difficulté des isolements directs (14) nécessitant souvent un ou plusieurs passages sur embryon de poulet, par voie veineuse et vitelline et le réisolement à partir du foie.

● *Expérimentalement*, chez le cobaye, une souche de *M. aquae*, isolée d'un cas de thélite nodulaire, s'est révélée sensibilisante et allergantigène, non seulement en réaction *directe* vis-à-vis d'elle-

(*) Avec la collaboration technique de M. Paul HUGON et M^{lle} Geneviève PAILLE.

même (sensitine spécifique), mais en réactions *croisées* vis-à-vis du bacille tuberculeux bovin (tuberculine humano-bovine), du bacille de Johnne (Johnine), et surtout du bacille tuberculeux aviaire (réactions intenses et nécrose cutanée), démontrant ainsi l'existence de co-allergènes entre *M. aquae* et les autres mycobactéries pathogènes traditionnelles (12).

De même, chez la vache expérimentalement infectée par la même souche, des réactions allergiques croisées sont manifestes vis-à-vis des bacilles tuberculeux, positives avec la *tuberculine aviaire*, seulement douteuses avec la *tuberculine humano-bovine*.

● *Spontanément*, sur 6 vaches atteintes de *thélite nodulaire naturelle*, la même allergie paraspécifique, positive ou douteuse, s'est révélée après injection de tuberculines humano-bovine et aviaire. Par ailleurs, une recherche (12) à long terme (3 ans) des répercussions de la thélite nodulaire mycobactérienne sur le dépistage allergique de la tuberculose bovine a montré, sur 4.250 animaux, porteurs de lésions de thélite pour 10 p. 100 d'entre eux :

— la *fréquence* des réactions tuberculiniques humano-bovines chez les sujets atteints de l'affection (74 p. 100), s'opposant à la rareté de ces réactions sur les animaux indemnes (0,6 p. 100) ;

— l'*opportunité* de l'application d'une *réaction tuberculinique double comparative* humano-bovine/aviaire, le réactif aviaire montrant une nette *supériorité* vis-à-vis de son homologue pour révéler l'affection, puisque, à la fois, plus spécifique, plus sensible et plus fidèle.

Enfin, il paraît digne d'intérêt de compléter la tuberculination double comparative, d'application réglementaire en Grande-Bretagne depuis 1960 (8), par des injections de *sensitines* extraites des mycobactéries atypiques, en vue d'un *dépistage allergique global* des infections mycobactériennes des bovins.

I. — PRINCIPE

Il consiste :

1) dans la *préparation et le titrage de sensitines mycobactériennes purifiées*, selon une technique de culture, d'extraction et de conservation précise et homogène ;

2) dans leur *contrôle* quantitatif rationnel complet, en échiquier, sur cobaye, afin de comparer l'intensité des réactions homologues et hétérologues entre les extraits de mycobactéries atypiques d'une part, d'autre part les tuberculines humano-bovine et aviaire classiques.

Trois buts étaient visés :

— sur le *plan économique*, la définition préalable, sur cobaye, d'un dépistage global des infections mycobactériennes, nécessaire préalable à une application différée sur les bovins, dans le cadre de la prophylaxie de la tuberculose bovine ;

— sur le *plan hygiénique*, la définition de réactifs allergènes révélateurs des mycobactérioses atypiques de l'Homme, déjà amorcée par le Centre International de l'Enfance de Longchamp (Dr FILLASTRE, Paris) et certains directeurs d'établissements hospitaliers (Pr de LAVERGNE, Nancy, Pr BEAUCHAMP, Poitiers, Pr GERBEAUX, Paris, Dr DIEU, Romagnat, Centre Muraz en Afrique (*)) (2, 3, 4, 5), ;

— sur le *plan dogmatique*, le *complément allergologique de la classification* culturelle et biochimique proposée pour les mycobactéries atypiques (1).

II. — MATÉRIEL, MÉTHODES ET TECHNIQUES

1) *Souches de mycobactéries.*

Rangées selon une classification dichotomique (13), les souches de mycobactéries tuberculeuses, paratuberculeuses et atypiques suivantes ont été choisies comme productrices de tuberculines, paratuberculines ou sensitines (**)) (tableau I).

2) *Cultures.*

En dépit de certaines cultures difficiles, exigeant de nombreux repiquages, toutes les souches ont fourni, en 6 à 12 semaines, un matériel suffisamment abondant pour l'extraction des sensitines correspondantes, sur un milieu chimiquement défini (***) , seul apte à la préparation de réactifs purifiés.

(*) Communications personnelles.

(**) Etalons de tuberculine humano-bovine : 3^e étalon 1965 (vielle tuberculine) et 2^e étalon (P. P. D.) ; de tuberculine aviaire : 1^{er} étalon 1964 ; conservés et distribués par le Statens Seruminstitut, Copenhague, Danemark (19^e Rapport Stand. Biol. pp. 82-83).

(***) Milieu de Weybridge modifié : asparagine (L) 14 g ; glucose : 10 g ; citrate de fer ammoniacal : 0,30 g ; sulfate de magnésium 7 H₂O : 1 g ; citrate trisodique 2 H₂O : 0,90 g ; phosphate bipotassique 3 H₂O : 1,080 g ; glycérine : 100 g ; sulfate de zinc 7 H₂O : 0,03 g ; sulfate de cuivre 5 H₂O : 0,003 g ; nitrate de cobalt 6 H₂O : 0,001 5 g ; chlorure de calcium anhydre : 0,07 g ; eau distillée : q. s. p. 1.000 g.

TABLEAU n° 1. — Souches de mycobactéries utilisées pour l'obtention de réactifs allergiques spécifiques

Culture et biochimie		Espèce mycobactérienne	Réactif allergique	Référence de souche		
Croissance lente (> 6 jours)	non chromogènes	Niacine + Nitrates + Cobaye +	<i>M. tuberculosis</i> (tuberculine humano-bovine)	PN ; DT		
		Lapin + Poule + Bovins +				
		Lapin — Poule —	<i>M. bovis</i> <i>M. avium</i>	tuberculine aviaire	Vallée AN 5 Weybridge 931	
			<i>M. paratuberculosis</i> (= johnnei)	paratuberculine (= johnnine)	936	
	chromogènes	Photochromogène	<i>M. battey</i>	sensitine sp.	1409	
		Scotochromogène	<i>M. kansasii</i> (= <i>luciflavum</i>)	sensitine sp.	1220	
Croissance rapide (2 à 3 jours)	chromogènes	Photochromogène	<i>M. aquae</i> (= <i>scrofulaceum</i>)	sensitine sp.	1344	
		Scotochromogène	Thermo-résistant orange Thermo-sensible rouge brun	<i>M. balnei</i> (= <i>marinum</i>)	sensitine sp.	1221
				<i>M. phlei</i> (= <i>lacticola</i>)	sensitine sp.	P
	non chromogènes	Culture 45° C + Culture 45° C —	<i>M. pellegrino</i>	sensitine sp.	1337	
			<i>M. smegmatis</i>	sensitine sp.	1336	
			<i>M. fortuitum</i>	sensitine sp.	1339	

3) *Extraction.*

Elle est opérée selon la technique d'extraction mise au point pour l'obtention de la P. P. D., grâce à la précipitation purificatrice par l'acide trichloro-acétique.

4) *Titrage chimique.*

Les réactifs ont subi un *premier titrage chimique des protéines brutes* du filtrat par la méthode Kjeldahl, après 3 h d'autoclave à 100° C, puis un *second titrage chimique portant sur les protéines après purification* par précipitation à l'acide trichloro-acétique. Après lyophilisation en ampoules de 1 ml, leur teneur en protéines peut, enfin, être exprimée en γ (tableau II).

Ce taux de protéines est quintuple (5) de celui généralement utilisé, et correspond, pour les tuberculines P. P. D. humano-bovine et aviaire purifiées — sur la base de 2 mg = 100.000 U. I. ou 2 γ / ampoules = 100 U. I., — à 10 γ /ampoule, soit 500 U. I. En outre, la lyophilisation s'oppose à l'adsorption des protéines réactives sur la paroi de verre et paraît supérieure au conditionnement en ampoules liquides ou additionnées de Tween 80, pour la validité et l'homogénéité des résultats (3).

III. — OPÉRATIONS

Elles ont consisté dans le *contrôle biologique quantitatif, en équilibre, sur cobaye (11), de l'activité homologue directe et hétérologue croisée de ces divers réactifs*, selon la méthode classique du titrage de la tuberculine. Les cobayes albinos de lignée K, pesant 500 g et préalablement sensibilisés par l'injection intramusculaire de 4 mg de bacilles vivants, ont été testés 5 semaines plus tard par l'injection intradermique, sous volume de 0,1 ml dans le derme de la peau rasée du dos, de 5 U. I. et de 10 U. I., soit 0,01 γ et 0,02 γ , des divers réactifs.

La lecture a été exprimée, après 48 h, en diamètres (en mm) de la réaction allergique obtenue (9, 10).

IV. — RÉSULTATS

Ils sont contenus dans les tableaux nos 3 et 4 par comparaison, pour certains d'entre eux, avec les réactifs fournis par le laboratoire de Bethesda (Atlanta, Georgie, U. S. A.) (3).

TABLEAU n° 2

Taux protéique des réactifs allergiques spécifiques

Remarquer l'amélioration du taux protéique du filtrat brut des sensitines après nombreuses subcultures et utilisation d'un milieu industriel de production

Caractères		Durée de culture (en semaines)	Taux protéique du filtrat brut, en ‰		Taux protéique après purification, en ‰	Taux protéique par ampoule 1 ml lyophilisée, en γ
Réactifs			Primo-culture	Cultures industrielles		
Tuberculine humano-bovine . . .		6		0,50	9,62	10 = 500 U. I.
Tuberculine aviaire		6		0,50	9,62	10 = 500 U. I.
Paratuberculine (johnine)		12		0,50	1,31	14
Sensitines	Batley	6	0,12	0,12	1,1	12
	kansasii	6	0,14	0,48	6,10	12
	aqueae	6	0,15	0,19	2,05	11,4
	balnei	6	0,43	0,34	5,25	10
	phlei	6	0,79	3,41	6,56	12,3
	pellegrino	6	0,10	0,08	0,61	12
	smegmatis	6	0,77	3,80	6,12	12,5
	fortuitum	6	0,039	2,49	6,12	14

Il ressort de leur lecture :

1) la *réactivité* très satisfaisante des divers réactifs utilisés (tableau III), à l'exception de la sensitine *M. pellegrino*, extraite probablement d'une *Mycobactérie* n'entrant pas dans le genre *Mycobacterium*, mais peut-être *Nocardia* ; cette réactivité se révèle régulièrement *supérieure* à celle procurée par les réactifs de Bethesda pour 5 U. I., sauf pour *M. fortuitum* ; quant aux réactions de référence à 10 U. I., elles sont spectaculaires et ne laissent pas de place au doute.

TABLEAU n° 3

*Réactions homologues de référence
des réactifs allergiques spécifiques*

Réactions Réactifs		Diamètre moyen de la réaction en mm		
		avec 5 U.I.	avec 5 U.I. Bethesda (U.S.A.)	avec 10 U.I.
Tuberculine HB		13	13	15
Tuberculine A		11,25	8	13,25
Paratuberculine		10,5	—	12,5
Sensitines	Batley	8,25	4,5	13,5
	kansasii	9,75	7,75	14
	aquae	11	4	14,5
	balnei	6	—	15
	phlei	—	—	12
	pellegrino	0	—	trace
	smegmatis	—	—	12
	fortuitum	4	5,75	11

2) *L'intensité* très satisfaisante des réactions directes homologues (tableau IV), toujours très nettement supérieures aux réactions hétérologues croisées, sauf pour la sensitine *M. pellegrino*, que ces tests allergiques permettent d'exclure du cadre des mycobactéries atypiques.

3) Dans le cadre des tuberculines humano-bovine et aviaire et de la johnine, la *haute spécificité qualitative* séparant les deux tuber-

TABLEAU n° 4

Réactions homologues directes et hétérologues croisées des réactifs allergiques (10 U. I.) spécifiques sur cobayes sensibilisés correspondants

Une notation pratique peut être proposée :

R > 10 mm = + ou ++

R < 10 mm = douteuse

Souches sensibilisantes Réactifs		Diamètre moyen de la réaction en mm										
		M. tuber- culosis + bovis	M. avium	M. johneï	M. Battey	M. kan- sasii	M. aquae	M. balnei	M. phlei	M. pelle- grino	M. smeg- matis	M. for- tui- tum
Tuberculine HB.....		16	0	14	0	0	0	3	0	0	0	0
Tuberculine A.....		3	17	12	2	0	0	8	0	0	0	0
Paratuberculine.....		7	11	15	4	5	0	7	0	0	0	0
Sensitives	Battey.....	0	0	0	13,5	0	0	0	0	0	0	0
	kansasii.....	5	6	12	8	14	10	12	0	0	0	0
	aquae.....	6	8	10	5	11	14	10	0	0	0	0
	balnei.....	12	0	13	0	0	8	15	0	0	0	0
	phlei.....	6	0	10	4	0	0	6	12	0	10	0
	pellegrino.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	smegmatis.....	10	0	10	3	0	6	5	10	0	12	0
	fortuitum.....	7	0	0	0	0	6	5	8	0	5	11

culines, par opposition avec la *non-spécificité* de la johnine, chargée de fortes réactions hétérologues avec la tuberculine. Ainsi la réaction double comparative permet l'exploration de deux allergies très nettement différentes, d'origine humano-bovine d'une part, aviaire d'autre part, sans réactions douteuses croisées notables. En outre, l'utilisation de la johnine n'apporte aucun avantage dans un dépistage dont la difficulté apparaît clairement, au sein des troupeaux infectés à la fois de tuberculose et de paratuberculose.

4) *L'inaptitude des tuberculines humano-bovine et aviaire à révéler*, hormis l'allergie paratuberculeuse, les allergies mycobactériennes atypiques, même l'infection à *M. battey* ou *M. balnei* ; il en découle la nécessité de compléter la tuberculination aviaire, spécifique de *M. avium*, parasécifique de *M. johnei*, par des injections de sensitines diverses, correspondant à la pathologie mycobactérienne régionale. Ce résultat s'oppose en partie avec ceux obtenus chez les bovins (12) atteints de thélite nodulaire, d'étiologie indéterminée, mais supposée mycobactérienne et, par ailleurs, sensible à l'isoniazide.

5) La séparation des sensitines en deux catégories :

— l'une *spécifique*, ne fournissant que peu de réactions croisées — telle celle de *M. battey* ;

— l'autre *non spécifique*, possédant de multiples co-allergènes avec les autres espèces — telle *M. scrofulaceum-aquae*.

C'est dans cette catégorie que pourraient être choisies des *sensitines de groupe*, à spectre allergologique élargi, révélant une allergie homologue et de nombreuses allergies hétérologues.

6) *La divergence* entre les pouvoirs révélateur et sensibilisateur des souches étudiées, c'est-à-dire entre la révélation allergique par les sensitines d'infections mycobactériennes diverses et la sensibilisation procurée chez le cobaye par ces infections. Ainsi, la sensitine de *M. smegmatis* révèle la para-sensibilisation tuberculeuse humano-bovine et paratuberculeuse, *M. battey*, *M. aquae*, *M. balnei*, *M. phlei*, alors que la sensibilisation par *M. smegmatis* n'est révélée que par la sensitine correspondante, celles de *M. phlei* et de *M. fortuitum*.

7) Enfin, la *divergence* entre les classifications culturelles et biochimiques proposées et l'échiquier allergique, en particulier pour *M. pellegrino*, à exclure de ce domaine. Il est donc indispensable de réajuster la systématique mycobactérienne, en respectant le caractère allergène des souches, par ailleurs si important dans le dépistage des infections mycobactériennes en général.

CONCLUSIONS

1) *La préparation et le contrôle sur cobaye* des tuberculines humano-bovine et aviaire, de la paratuberculine et des huit principales sensitines extraites de souches répertoriées de mycobactéries atypiques se sont adressés à des techniques de haute précision.

2) *Une confrontation allergique rationnelle complète, en échiquier*, de ces réactifs incite à adopter non seulement la réaction double comparative humano-bovine/aviaire, mais encore l'injection de sensitines choisies en accord avec la pathologie mycobactérienne régionale.

3) *Le caractère allergène des mycobactéries atypiques*, sans coïncidence avec la classification culturelle et biochimique du groupe bactérien, incite au remaniement de la systématique spéciale.

(*Institut Mérieux-Marcy
et Ecole Vétérinaire Lyon.*)

BIBLIOGRAPHIE

1. BOISVERT (H.). — *Soc. Méd. Passy*, 1965, **31**, 159.
2. FREOUR (P.), SERISE (M.), COUDRAY (P.), LE SCOUZEC, GUIDI (C.). — *J. de Méd. de Bordeaux*, 1966, **11**, 1707.
3. EDWARDS (L. B.), KROHN (E. F.). — *Am. J. Hyg.*, 1957, **66**, 253.
4. GERNEZ-RIEUX (Ch.), TACQUET (A.) et DEVULDER (B.). — *Méd. et Hyg.*, 1964, **22**, 514.
5. GERVOIS (M.) et (S.), LEBLOIS (J.), BESAN (J.) et DECOCQ (J. R.). — *Rev. Hyg. Méd. Soc.*, 1967, **15**, 129.
- 5 bis. GORET (P.) et TOMA (B.). — *Rec. Méd. Vét.*, 1967, **143**, 619.
6. HAUDUROY (P.). — *Presse Méd.*, 1965, **73**, 1583.
7. JOUBERT (L.), FERNEY (J.), OUDAR (J.) et VAN HAVERBEKE (G.). — *Rev. Méd. Vét.*, 1963, **114**, 87.
8. LESSLIE (L. W.) et BIRN (K. J.). — *Vet. Rec.*, 1967, **80**, 559.
9. MAGNUSON (M.). — *Ann. Rev. Resp. Dis.*, 1961, **83**, 57.
10. MAGNUSON (M.), ENGRAEK (H. C.) et BENTZON (M. W.). — *Ann. Rev. Resp. Dis.*, 1961, **83**, 69.
11. MAGNUSON (M.). — *Ann. Rev. Resp. Dis.*, 1962, **86**, 395.
12. OUDAR (J.), JOUBERT (L.) et VALETTE (L.). — *Bull. Soc. Sci. Vét.*, Lyon, 1968.
- 12 bis. OUDAR (J.), JOUBERT (L.), VIALIER (J.), CAILLÈRE (F.) et GORET (P.). — *Rev. Path. Comp.*, 1966, **66**, 477.
13. RUNYON (E. H.). — *Bull. Union Int. Tub.*, 1959, **29**.
14. VIALIER (J.), OUDAR (J.), JOUBERT (L.), FERNEY (J.), CORDIER (M. T.) et AUGAGNEUR (J.). — *Bull. Soc. Sci. Vét.*, Lyon, 1963, **65**, 241.