

Le séro-A.B.R. et l'épreuve du « Culot » (Kuppenreaktion) dans le diagnostic des Brucelloses, bovine et équine

par P. ROSSI, F. TRIOZON, Y. DUTILLOY et Th. GOGUILLOT

En 1939, FLEISCHHAUER (1) et CANIC (2) proposèrent, pour le diagnostic rapide de la Brucellose bovine, une variante de leurs méthodes de l'anneau (A.B.R.) et du « culot » (Kuppenreaktion), basée sur l'utilisation du sérum sanguin comme source des anticorps spécifiques.

Dans un récent article, FLEISCHHAUER (3) prôna les avantages du séro-A.B.R. qu'il présente comme une « simplification considérable et une accélération de la recherche des sérums brucelloses » et qui « pratiquement peut être considéré comme de valeur égale, du point de vue de ses possibilités d'application et de sécurité des résultats, à la séro-agglutination lente et à la réaction de Meinicke ».

La technique proposée se résume ainsi :

Déposer dans un tube à hémolyse 0,8 cm³ de sérum, 1 cm³ de lait cru *strictement non brucellique* et une goutte d'un antigène coloré. Après mélange, mettre le tube dix minutes dans une étuve à 37°, le centrifuger ensuite huit minutes à 2.500 tours. Examiner l'anneau de crème, puis renverser brusquement le tube afin de le vider de son contenu liquide et le placer fond en haut dans un râtelier (4).

La lecture de l'anneau crémeux, coloré ou non, de 1-2 mm d'épaisseur, qui lors de la centrifugation se forme à la partie supérieure du mélange, sérum-lait, constitue le séro-A.B.R. tandis que l'examen des caractères du « culot », qui se dépose au fond du tube, est la « Kuppenreaktion ».

(1) En cas d'utilisation d'antigène pouvant contenir des germes encore vivants, les Auteurs allemands recommandent les précautions les plus rigoureuses, au moment du renversement des tubes et ultérieurement, pour ne pas repandre de *Brucella* dans le milieu ambiant et pour éviter la souillure des mains de l'opérateur.

Nous avons contrôlé la valeur de ces deux méthodes sur 1.514 sérums bovins et 13 équins. Notre expérimentation sur plusieurs centaines de sérums ovins et caprins fera l'objet d'une note spéciale.

Nous avons comparé, avec des résultats superposables, le taux de dilution 1/2,25 (indiqué par la technique allemande) aux taux de 1/2 (1 cm³ de sérum et 1 cm³ de lait) et de 1/3 (0,4 cm³ de sérum et 1,6 cm³ de lait). D'autre part, nous avons, sans rencontrer de différences majeures, soumis la plus grande partie de nos échantillons simultanément à la centrifugation de 8 minutes à 2.500 tours à celle de 2 minutes à 4.000 tours.

A. — EPREUVE DE L'ANNEAU : SÉRO-A.B.R.

La centrifugation provoque l'ascension de la crème qui, lors de réactions positives, forme un anneau coloré, tandis que la colonne liquide, tout en gardant une légère teinte jaunâtre, tend à recouvrer sa couleur blanche. Dans les réactions négatives, l'anneau crémeux reste blanchâtre et le mélange liquide ne s'éclaircit que dans sa partie supérieure pour garder, dans sa partie inférieure, sa coloration rouge (1).

La lecture de l'anneau se fait comme dans le lacto-A.B.R. ou Ring-test classique. Les réactions + et ++ doivent être assimilées aux négatives.

Nos sérums se sont comportés de la façon suivante :

1° 1.014 sérums négatifs :

a) 349 sérums n'agglutinant même pas à 1/10.

Réaction 0	341
+	7
++	
+++	
++++	1

b) 458 sérums agglutinant à 1/10 + + +.

Réaction 0	384
+	47
++	17
+++	8
++++	2

(1) Nous employons l'antigène coloré au phényltétrazolium.

c) 207 sérums agglutinant à 1/10 + + +.

Réaction	O	126
	+	22
	++	31
	+++	19
	++++	9

Les 28 sérums de cette dernière série ayant donné un anneau positif provenaient d'exploitations où existait une Brucellose clinique et dans lesquelles une agglutination à 1/20 + + + indique très souvent une infection, déjà réalisée, sans que la sérologie ne soit encore parfaitement établie.

Dans l'ensemble des sérums négatifs, la concordance du séro-A. B. R. et du S. A. W. a été de 97 $\frac{5}{10}$ /1.014, soit de 96,1 pour cent.

2° 500 sérums positifs :

a) 108 sérums agglutinant à 1/40 + + +.

Réaction	O	16
	+	3
	++	3
	+++	32
	++++	54

b) 177 sérums agglutinant à 1/80 + + + et 1/160 + + +.

Réaction	O	3
	+	1
	++	
	+++	31
	++++	142

c) 215 sérums agglutinant à 1/320 + + + et au-delà.

Réaction	O	
	+	2
	++	3
	+++	25
	++++	185

La concordance avec le S.A.W. a donc été de 469/500 : 93,8 pour cent.

2° 92 sérums de vaches vaccinées au B.A. 19.

L'épreuve a été positive chez 64 (94,1 pour cent) des 68 femelles dont la sérologie s'était positivée au moins à

1/40 + + +, et par contre négative chez 23 (95,8 pour cent) des 24 non-réagissantes. Proportion de même ordre qu'avec les catégories I et II.

4° 13 sérums de chevaux.

Tous avaient un S.A.W. supérieur à 1/160 + + + ; ils ont donné un anneau + + + +.

Avec certains sérums positifs, la crème reste blanche, mais un liseré rouge, très net quoique mince, sépare la crème du liquide. N'ont pu être précisées les causes de la formation de ce liseré qui, parfois, lors d'un nouvel essai immédiat avec le même lait ou avec un autre lait, est remplacé par un anneau normal.

Avec 3 à 4 pour cent des sérums positifs et 4-5 des sérums négatifs, la crème reste entièrement blanche sans le liseré précédent, tandis que le lait recouvre sa couleur naturelle. Le pH du sérum ne semble jouer aucun rôle.

Les sérums « paradoxaux », 12 bovins, dont le pouvoir agglutinant ne se manifestait avec le S.A.W. qu'à partir de 1/20 ou 1/40 et 6 équins, dont l'un restait négatif jusqu'à 1/160, se sont comportés comme des sérums positifs normaux.

Le séro-A.B.R. n'est pas aussi instantané que le lacto-A.B.R. Le déclenchement réclame parfois un délai de plusieurs minutes qui s'accroît davantage si, avant la manipulation, l'on ne prend pas la précaution de maintenir pendant 30 minutes à la température du laboratoire ou de réchauffer 5 minutes dans l'étuve les divers liquides, lait, sérum, antigène.

Les sérums hémolysés peuvent être utilisés.

Le séro-A.B.R. est moins sensible que le S.A.W. Dans les épreuves de dilution, l'anneau ne se forme que dans les premiers tubes et rarement au delà de 1/160, même si le S.A.W. atteint et dépasse 1/320 + + +. Ce fait a été très démonstratif avec les sérums équins dont plusieurs s'élevaient à 1/640 et même 1/280.

Sur 86 sérums bovins ou équins atteignant ou dépassant 1/320 + + +.

2	ont eu un anneau limite à la dilution	1/640
11	—	1/320
16	—	1/160
16	—	1/80
27	—	1/40
11	—	1/20
3	—	1/10

L'ancienneté du lait, c'est-à-dire le temps écoulé depuis la mulsion, n'est pas à négliger. En éprouvant 5-10 jours consé-

cutifs les mêmes sérums avec les mêmes laits, formolés ou non conservés à la glacière, nous avons vu que la crème de certains perdait plus ou moins rapidement le pouvoir d'entraîner les agglutinats. Dans les gammes de dilution, l'anneau coloré s'estompe tout d'abord dans les derniers tubes, puis les jours suivants, la dégradation gagne toute la série. Cette modification est parfois manifeste dès le 5^e jour, avec les laits formolés à 1 pour cent, qui, après le 7^e-8^e jour provoquent 10-13 pour cent d'échecs, transformant en réponses négatives des réactions, très franches les premiers jours. Les laits vieillis n'ont jamais engendré la moindre réaction positive avec les sérums négatifs.

B. — RÉACTION DU CULOT OU KUPPENREAKTION (K.R.)

D'après les caractères, aspect, dimensions, couleur, du « culot » de centrifugation, FLEISCHHAUER et CANIC (4) ont classé les réactions en 4 catégories comprenant chacune plusieurs degrés, au total 10.

Dans un précédent travail (5), nous avons reproduit la traduction littérale des descriptions allemandes dont la subtilité est telle que l'application pratique est irréalisable même pour des personnes très exercées.

En réalité, ne sont appréciables et classables que les seules réactions caractérisées, soit par un dépôt entièrement blanc ou avec petits points rouges plus ou moins nombreux, soit par un dépôt de 1-2 mm de diamètre, d'une couleur rouge constamment plus pâle que celle de l'antigène et entouré d'un halo laiteux blanc. Certaines fois, une marge rouge plus ou moins foncée et fréquemment sinueuse délimite un sédiment central rouge clair. Tous les autres degrés sont si équivoques, que leur lecture devient une véritable loterie.

La dilution à 1/5 a des réactions plus nettes que celle à 1/2.

Les sédiments blancs sans agglutinats colorés sont en nombre particulièrement important avec les sérums à 1/320 ++; nous n'en avons pas observé aux taux inférieurs.

Tous les sérums négatifs, sauf 2 pour cent, ont régulièrement donné un culot négatif. 80 pour cent des sérums positifs ont eu une réponse positive. Après vaccination par 2 injections sous-cutanées de B.A. 19, les résultats ont paru encore plus élevés

(1) Dans les réactions négatives, les marges sont plus arrondies et délimitent un sédiment très coloré.

que dans l'infection naturelle, mais le nombre d'échantillons examinés n'est pas suffisant pour permettre une opinion définitive.

Sur 68 vaches ayant un S.A.W. égal ou supérieur à $1/40$ + + +, 65 (95 pour cent) ont eu une réaction positive.

Les 24 femelles, dont le S.A.W. était négatif, ont toutes eu un K.R. négatif.

Avec les sérums positifs, réaction du « culot » et anneau ont concordé 78 fois sur 100. Toutefois, nous avons eu 3 culots indéniablement positifs avec des anneaux négatifs.

La décoloration totale du lait et de la crème, que nous avons signalée plus haut, est toujours suivie de la formation d'un culot rouge uniforme qui, par son importance et son aspect, tranche sur les autres réactions négatives.

Comme pour le séro-A.B.R., température du sérum et du lait d'une part, dose d'antigène d'autre part, influent considérablement.

L'ancienneté du lait, surtout formolé, joue un grand rôle, car dès le 5-6^e jour, tout en perdant une partie de ses qualités, la crème reste encore capable de retenir et d'entraîner quelques agglutinats qui formeront un anneau lisible, tandis que la majeure partie des *Brucella*, même si elles ont subi l'action des anticorps, se dépose au fond du tube en un « culot » franchement négatif.

Les deux méthodes que nous venons de contrôler sont-elles susceptibles d'application pratique?

Le séro-A.B.R. peut, le cas échéant, suppléer ou même remplacer le S.A.W.

Ses avantages :

Ne nécessite qu'un seul tube et partant beaucoup moins d'antigène, d'où économie de temps et d'argent.

Ses inconvénients :

Non concordance avec le S.A.W. dans 6-7 pour cent des cas avérés de Brucellose.

3-7 pour cent des anneaux obtenus avec des sérums nettement positifs sont impossibles à interpréter.

Obligation de disposer continuellement de lait cru non brucellique que l'addition d'1 pour cent de formol et le maintien à la glacière permettent de conserver utilement au moins 4 à 5 jours, mais qu'avant chaque épreuve, il est bon de contrôler avec quelques sérums positifs.

Le séro-A.B.R. doit être réservé à de simples sondages et à des circonstances exceptionnelles, en particulier si l'on veut une

réponse immédiate et si l'on n'est pas familiarisé avec l'agglutination d'Huddleson, à notre avis plus sûre.

Nous avons eu recours à la séro-A.B.R. pour plusieurs centaines d'animaux, lors d'une grève des P.T.T. nous ayant empêché de recevoir les antigènes nécessaires à la séro-agglutination lente.

La réaction du « culot » n'a de valeur que si elle est nettement positive. Elle peut renforcer ou confirmer celle de l'anneau.

(Laboratoire départemental de Saône-et-Loire.)

BIBLIOGRAPHIE

1. FLEISCHHAUER (G.). — Über eine weitere Methode zur Untersuchung von Blütseren auf Abortus Bang. *Berl. und Munch. Tier. Woch.*, 1939, p. 399-400.
 2. CANIC (R.). — Über die Verwendungsmöglichkeit der A.B.R. zentrifugierprobe bei der Untersuchung von Blütseren auf Abortus Bang. *Berl. and Munch. Tierarztl. Woch.*, 1939, p. 646.
 3. FLEISCHHAUER (G.). — Zur Verwendungsmöglichkeit der Abortus-Bang-Ring probe (A.B.R.) bei der Untersuchungen von Blutseren auf Abortus-Bang. *Berl. u. Munch. Tierarztl. Moch.*, 1933, p. 373-376.
 4. FLEISCHHAUER (G.) et CANIC (R.). — Über weitere Versuche mit der Abortus Bang-Ringprobe (A.B.R.) zur Untersuchung von Milchproben auf Abortus-Bang. *Berl. und. Munch. Tierarzt. Woch.*, 1939, p. 238-240.
 5. ROSSI (P.), TRIOZON (F.), DUTILLOY (Y.), GOGUILLOT (Th.). — La réaction du culot ou Kuppenreaktion dans le diagnostic de la Brucellose bovine. *Bull. Acad. Vét. France*, T. XXVII 1934, à l'impression.
-