



**HAL**  
open science

**IMMUNOGLOBULINES BOVINES ET  
BRUCELLOSE. II. – ACTIVITÉ DES IgG1, IgG2 ET  
IgM DU SÉRUM DANS LES RÉACTIONS  
D'AGGLUTINATION, DE COOMBS, DE FIXATION  
DU COMPLÉMENT ET DANS LE TEST AU ROSE  
BENGALE**

D. Levieux, G. Bezard

► **To cite this version:**

D. Levieux, G. Bezard. IMMUNOGLOBULINES BOVINES ET BRUCELLOSE. II. – ACTIVITÉ DES IgG1, IgG2 ET IgM DU SÉRUM DANS LES RÉACTIONS D'AGGLUTINATION, DE COOMBS, DE FIXATION DU COMPLÉMENT ET DANS LE TEST AU ROSE BENGALE. Annales de Recherches Vétérinaires, 1974, 5 (3), pp.343-353. hal-00900812

**HAL Id: hal-00900812**

**<https://hal.science/hal-00900812>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## IMMUNOGLOBULINES BOVINES ET BRUCELLOSE

II. — ACTIVITÉ DES  $IgG_1$ ,  $IgG_2$  ET  $IgM$  DU SÉRUM  
DANS LES RÉACTIONS D'AGGLUTINATION, DE COOMBS, DE FIXATION  
DU COMPLÉMENT ET DANS LE TEST AU ROSE BENGALÉ

D. LEVIEUX

avec la collaboration technique de G. BEZARD

*Station de Pathologie de la Reproduction, I. N. R. A.,  
Centre de Recherches de Tours,  
B. P. 1, Nouzilly, 37380 Monnaie*

---

### RÉSUMÉ

Les immunoglobulines  $IgG_1$ ,  $IgG_2$  et  $IgM$  ont été purifiées à partir de sérums de bovins provenant d'un troupeau expérimental Brucellose dont l'état sanitaire est connu : vaccination récente ou ancienne, infection précédée ou non de vaccination.

La comparaison du contenu en immunoglobulines spécifiques de chaque classe dans chaque type de sérum ne permet pas de montrer une répartition caractéristique en rapport avec une situation donnée ; en particulier, il est illusoire d'espérer distinguer les anticorps vaccinaux des anticorps d'infection par l'étude de l'activité des  $IgM$  opposée à celle des  $IgG$ .

L'activité des immunoglobulines est étudiée dans les réactions sérologiques d'agglutination (dans différentes conditions, fig. 1), de fixation du complément et dans le test au Rose bengalé. Les  $IgG_2$  interviennent dans l'agglutination usuelle, mais non en agglutination à pH 3,6, dans le test au Rose bengalé ou dans la fixation du complément. Inversement les  $IgG_1$  sont inactives dans l'agglutination normale, mais interviennent dans l'agglutination à pH 3,6 et dans le test au Rose bengalé ; elles fixent le complément. Les  $IgM$  sont titrées par tous les tests.

Le diagnostic sérologique de la Brucellose est discuté à la lumière de ces résultats.

---

### INTRODUCTION

La mise en œuvre d'un plan de prophylaxie sanitaire est liée au dépistage des porteurs de germes. La Brucellose peut s'exprimer cliniquement par l'avortement, ou prendre la forme d'une infection latente. Aussi le diagnostic expérimental comprend, d'une part des techniques directes de mise en évidence du germe et d'autre part des techniques basées sur des réactions sérologiques. On dispose de plusieurs tests sérologiques (MORGAN, 1967) ; parmi ceux qui sont effectués sur le sérum, la séro-agglutination lente en tube, la fixation du complément et le test de Coombs sont actuellement les plus utilisés.

Distinguer les anticorps post-vaccinaux des anticorps post-infectieux constitue un problème important ; dans l'hypothèse associant la présence d'anticorps de la classe IgM à la vaccination et la présence d'IgG spécifiques — sans IgM — à l'infection, des techniques complémentaires ont été mises au point : test d'inactivation par la chaleur (AMERULT *et al.*, 1961), test au  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui ont pour but de détruire sélectivement l'activité agglutinante des IgM.

La présence d'anticorps « non spécifiques » dans certains sérums a conduit ROSE et ROEPKE (1957) à proposer l'utilisation d'un antigène en milieu acide dans une réaction d'agglutination sur plaque. PIETZ (1967, résultats non publiés) cités par NICOLETTI, (1967) colore l'antigène avec le Rose bengale pour visualiser la réaction. Ce test est utilisé de façon extensive aux États-Unis (NICOLETTI, 1966 et 1969) et en Grande-Bretagne dans le dépistage de routine de la Brucellose (MORGAN, 1969).

Les différents tests donnent des résultats parfois discordants et la négativité d'un seul de ces tests n'est pas suffisante pour exclure l'infection de façon certaine. Un choix s'impose, basé sur la rapidité et la facilité d'emploi du ou des tests à utiliser, mais également sur la sensibilité et la fidélité avec lesquelles l'infection sera révélée. Pour faire ce choix, une meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux qui régissent ces réactions est nécessaire. Trois éléments essentiels interviennent : le milieu de dilution, l'anticorps, l'antigène. L'objet de ce travail est d'apporter une analyse des deux premiers éléments, basée sur des immunoglobulines purifiées de provenance précise (animaux appartenant au troupeau expérimental de la Station) et représentant différentes modalités de contact avec l'antigène spécifique : vaccination récente ou ancienne, infection, vaccination puis infection.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — Bovins

Tous les animaux utilisés sont de race *Frisonne Pie Noire*, indemnes de Brucellose, importés des Pays-Bas. Ils constituent les troupeaux d'expérimentation « Brucellose » de la Station.

### 2. — Sérums

*Préparation* : le sang est obtenu stérilement par ponction de la veine jugulaire et laissé coaguler pendant 24 heures. L'exsudat est centrifugé à 3 000 g pendant 20 mn et stocké à — 20°C.

#### Échantillons :

- « *Sérum B VI* » : pool des sérums de 6 génisses (8 mois) prélevés 14 jours après vaccination sous-cutanée par *Brucella abortus* 19 (80 × 10<sup>9</sup>).

- « *Sérum 365* » : sérum d'une génisse appartenant au lot précédent, mais ayant un titre sérologique plus élevé que celui des autres animaux de ce lot également 14 jours après la vaccination.

- « *Sérum 820* » : vache gestante de cinq-six mois, inoculée par 12 × 10<sup>6</sup> *Brucella abortus*, souche 544, par la voie conjonctivale. L'infection expérimentale a été suivie d'avortement au 8<sup>e</sup> mois de gestation avec examens bactériologiques et sérologiques positifs (PHILIPPON *et al.*, 1971). Le sérum a été prélevé au moment de l'abattage, 6 semaines après le part.

- « *Sérum B I* » : pool des sérums de vaches vaccinées par *Brucella melitensis* H 38 ou *Brucella abortus* 19, inoculées, 16 à 20 mois après leur vaccination, par *Brucella abortus* 544 (16 × 10<sup>6</sup> bactéries, voie conjonctivale), au 5<sup>e</sup>-6<sup>e</sup> mois de gestation (PLOMMET *et al.*, 1970). A l'abattage, 6 semaines après le part, les 20 sérums à activités sérologiques les plus élevées ont été mis en pool.

● « *Sérum R. F.* » : vache ayant reçu du vaccin *Brucella melitensis* H 38 adjuvé (Aborlane Mérieux), 3 ans auparavant.

A l'abattage tous les examens bactériologiques étaient négatifs.

### 3. — Purification des immunoglobulines sériques $IgG_1$ , $IgG_2$ et $IgM$

Un schéma de purification combinant la chromatographie sur échangeurs d'ions (DEAE cellulose), la filtration sur gel (Sephadex G-200) et l'électrophorèse préparative sur bloc d'amidon a été mis au point et décrit en détail précédemment (LEVIEUX, 1974), de même que les techniques de purification et de contrôle de la pureté des produits obtenus (immunoélectrophorèse, immunodiffusion radiale simple et double, électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide), et la préparation des antisérums spécifiques.

### 4. — Techniques sérologiques

— *Préparation de l'antigène* : la suspension standardisée de *Brucella abortus* 99 (Institut Mérieux) est lavée trois fois en NaCl 0,15 M. Le culot obtenu par centrifugation à 13 000 g pendant 30 mn est remis à la concentration d'origine dans différents tampons selon la réaction utilisée.

— *Préparation des anticorps* : les immunoglobulines purifiées sont ramenées à leurs concentrations naturelles respectives dans le sérum ( $IgG_1$  : 10 mg par ml,  $IgG_2$  : 8 mg par ml,  $IgM$  : 2,5 mg par ml). Les dilutions de demi en demi du sérum total et des immunoglobulines extraites de chaque sérum sont effectuées dans les tampons propres aux diverses réactions.

— *Séroagglutination lente en tube* : la technique standard (RENOUX et GAUMONT, 1966) a été utilisée avec lecture à 24 h, 48 h et 72 h, mais différents diluants ont été étudiés :

— réaction classique : la suspension bactérienne est diluée en NaCl 0,15 M + phénol 0,15 p. 100, les anticorps en tampon Phosphate 0,01 M, pH 6,8 + NaCl 0,15 M ;

— réaction en NaCl 5 p. 100 (0,85 M) : la suspension bactérienne et les anticorps sont dilués dans ce milieu hypersalé ;

— réaction à pH 3,6 : la suspension bactérienne est diluée dans un tampon acétate 0,2 M, pH 3,6, l'anticorps en NaCl 0,15 M.

— *Test de Coombs* : technique de Foz et GARRIGA (1954).

— *Test au Rose bengale* : selon NICOLETTI (1967), avec l'antigène standardisé du commerce (Roger Bellon).

— *Fixation du complément* : microtechniques de WASSERMAN et LEVINE (1961) et de RENOUX *et al.* (1971).

## RÉSULTATS

### I. — Répartition de l'activité sérologique dans les différentes classes d'immunoglobulines selon l'origine des sérums (fig. 1, première ligne de résultats)

— Chez les animaux vaccinés depuis 15 jours (sérums B VI et 365), l'essentiel de l'activité est contenu dans les  $IgM$  ; quelques  $IgG_1$  spécifiques sont présentes dans le sérum B VI, des  $IgG_1$  et  $IgG_2$  dans le sérum 365.

— Quatre mois après une infection expérimentale (sérum 820), l'activité sérologique se manifeste dans les 3 types d'immunoglobulines.

— Le sérum provenant d'animaux vaccinés depuis 30 mois et infectés depuis 4 mois (sérum B I) n'a pratiquement plus d'activité dans les  $IgM$ , seules les  $IgG_1$  et  $IgG_2$  interviennent dans les réactions étudiées.

— Le sérum R. F., provenant d'une vache indemne de Brucellose et vaccinée trois ans auparavant par le vaccin H 38, ne possède d'activité que dans les  $IgM$  contre toute attente.

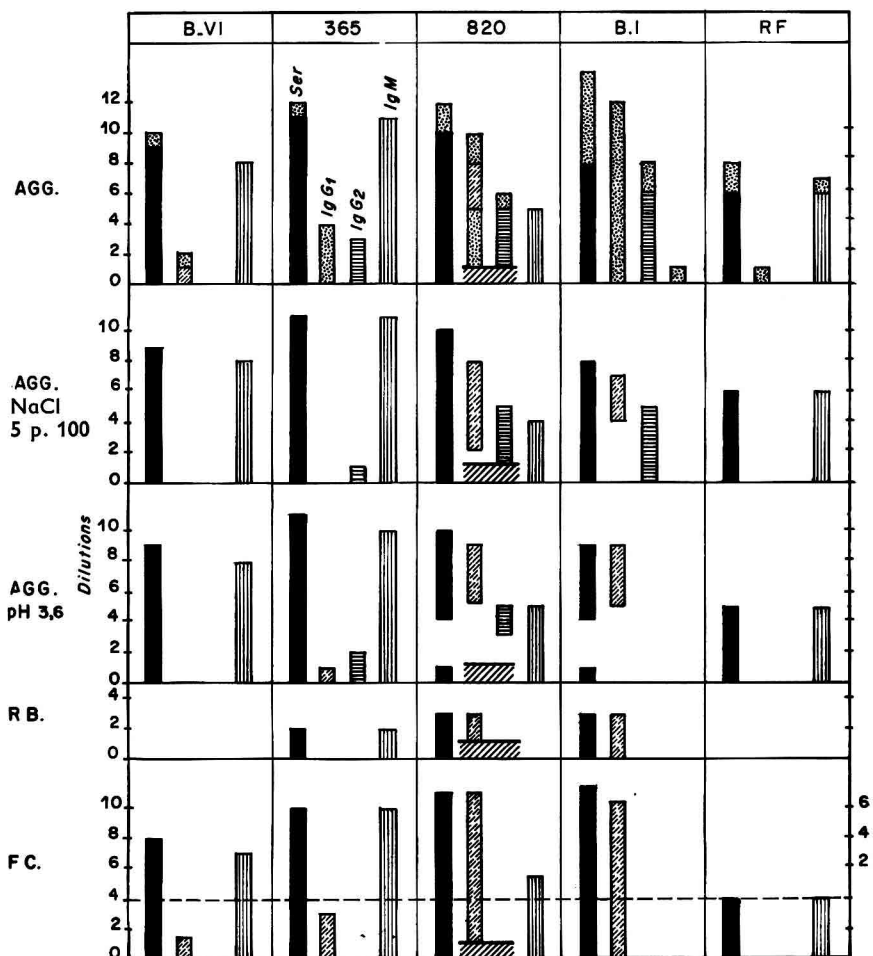


FIG. 1. — Titres de différents sérums (colonnes pleines) et des immunoglobulines extraites de ces sérums (colonnes hachurées), provenant de vaches brucelliques (B VI, 365...), dans les réactions sérologiques indiquées (AGG : Agglutination standard ; RB : test au Rose bengale ; FC : Fixation du complément).

Les titres sont donnés en numéros des tubes de dilution de demi en demi, le tube n° 1 étant égal au 1 : 10.

Dans la réaction d'agglutination standard, les colonnes en pointillé représentent les différences d'activité obtenues par le test de Coombs.

Les zones vierges correspondent à une absence de réaction (phénomène de zone).

Dans le cas du sérum 820, la zone horizontale hachurée indique les dilutions non testées.

En fixation du complément, le trait horizontal pointillé montre le seuil de sensibilité de la technique de routine (dilutions sur l'échelle de droite).

FIG. 1. — Titres of different sera (black columns) and immunoglobulins purified from these sera (hatched columns) of brucella vaccinated or infected cows (B VI, 365...), in serological reactions (AGG : normal agglutination ; RB : Rose bengal test ; FC : Complement Fixation test).

Two fold dilutions are given by the number of the tube, n° 1 being 1 : 10.

In normal agglutination, dotted columns indicate the result of the Coombs test. Zone phenomenon (no reaction) is indicated by white zone.

Horizontal hatched zone (serum 820) indicates dilutions non tested.

Horizontal dotted line, in complement fixation test, gives the sensitivity of the standard technic, of which dilutions are on the right scale.

2. — *Étude comparative de l'activité des immunoglobulines purifiées dans les différents tests sérologiques*

Dans la séroagglutination lente en tube, effectuée dans les conditions standard, une réaction positive est observée avec les IgM et les IgG<sub>2</sub> des 5 sérums étudiés. Les IgG<sub>1</sub> sont très peu (sérum 820) ou pas (sérums BI et 365) actives. Au cours de différents titrages effectués avec le sérum 820 et les immunoglobulines purifiées, l'activité des IgG<sub>1</sub> s'est révélée quelquefois nulle, mais plus fréquemment deux ou trois dilutions présentaient une légère agglutination. La présence d'IgG<sub>1</sub> à la surface des *Brucella* est cependant révélée par le test de Coombs dans tous les sérums qui contiennent des anticorps de cette sous-classe. Ce test modifie peu l'activité des autres immunoglobulines et augmente d'autant plus le taux du sérum total qu'il y a davantage d'IgG<sub>1</sub> spécifiques non agglutinantes dans ce sérum (B I).

Les lectures après 24 heures supplémentaires à la température du laboratoire montrent, en général, un titre supérieur d'une dilution pour les sérums et immunoglobulines. Les IgG<sub>1</sub> du sérum B I et du sérum 820 ont parfois présenté une agglutination fine dans la majeure partie des dilutions. Les lectures à 72 heures (24 heures supplémentaires à + 4°C) n'apportent rien de plus. La séroagglutination effectuée en milieu hypersalé (5 p. 100 NaCl) ne modifie pas de façon significative l'activité du sérum total des IgG<sub>2</sub> et des IgM. Par contre, les IgG<sub>1</sub> agglutinent, mais pas systématiquement. La réaction à pH 3,6 (pH auquel est réalisé le test au Rose bengale) provoque, comme le milieu NaCl à 5 p. 100, une meilleure agglutination des IgG<sub>1</sub>, mais là encore elle ne couvre pas toutes les dilutions. Cette amélioration se fait au détriment des IgG<sub>2</sub> qui perdent tout ou partie de leur pouvoir agglutinant. Les IgM ne sont pas affectées. Le sérum total présente un phénomène de zone.

Le test d'agglutination sur plaque avec l'antigène au Rose bengale est peu sensible lorsque le sérum ou les immunoglobulines purifiées sont dilués en NaCl 0,15 M et les titres d'activité de tous les sérums sont considérablement diminués. Le test a été recommencé pour deux sérums avec des concentrations plus élevées : le sérum B VI n'est positif que pur, le sérum R. F. est positif jusqu'au demi. Les IgM de ce sérum R. F. agglutinent également aux dilutions 1/1 et 1/2. Les IgG<sub>2</sub> reconcentrées ne sont pas actives. Le test au Rose bengale révèle les mêmes immunoglobulines (IgG<sub>1</sub> et IgM) que la séroagglutination en tube à pH 3,6, mais avec une sensibilité très diminuée par rapport à cette dernière lorsque le même diluant est utilisé pour les immunoglobulines, dans les deux réactions.

Des essais effectués avec le sérum 820 dilué en tampon Mayer ou en NaCl 0,15 M + sérum albumine bovine à 10 g/litre n'ont pas amélioré cette sensibilité. Seule l'utilisation d'un sérum bovin négatif comme diluant permet de retrouver une activité du même ordre que dans les agglutinations en tube.

La réaction de fixation du complément selon la méthode sensible de WASSERMAN et LEVINE (1961), avec incubation du complément pendant 1 heure à 37°C, révèle les IgG<sub>1</sub> et les IgM. Des phénomènes anti-complémentaires ont été observés avec les IgM dans les premières dilutions (du 1/10 au 1/40 ou 1/80), selon la provenance des sérums. Aucune des IgG<sub>2</sub> purifiées n'est active.

La réaction effectuée après incubation du complément pendant 18 heures à

+ 4°C augmente de 2 à 3 dilutions le titre des IgG<sub>1</sub> et d'une seule dilution celui des IgM.

Les titrages réalisés avec la microtechnique de routine de RENOUX *et al.* (1971) reproduisent ces résultats, mais avec une sensibilité plus faible, dont le seuil est indiqué par un trait pointillé sur la fig. 1 (les dilutions sont alors celles portées sur l'échelle de droite de la fig. 1). L'activité du sérum R. F. n'est pas décelée dans ce cas.

## DISCUSSION

A partir de sérums d'animaux dont l'état sanitaire est connu, avec une purification poussée des immunoglobulines IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> et IgM du sérum, il a été possible de montrer que les différents tests détectent souvent des classes ou sous-classes d'immunoglobulines différentes.

Les IgG<sub>2</sub> sont des anticorps qui interviennent essentiellement dans l'agglutination standard. Les IgM sont actives dans tous les tests. Les IgG<sub>1</sub> sont actives dans la fixation du complément, dans les agglutinations effectuées en milieu acide (Rose bengale, séroagglutination en tube à pH 3,6) ou hypersalé (5 p. 100) et responsables de phénomènes de zone.

— Les travaux de RICE et BOYES (1971) sont confirmés par les résultats obtenus en agglutination normale (NaCl 0,15 M) et en fixation du complément pour les IgG<sub>1</sub> et les IgG<sub>2</sub>. Cependant, les IgM n'étaient pas suffisamment purifiées chez ces auteurs qui reconnaissent ne pas pouvoir les séparer complètement des IgG par filtration sur gel.

— Ce travail développe les résultats préliminaires de DIAZ et LEVIEUX (1972), qui avaient montré pour la première fois le rôle essentiel des IgG<sub>1</sub> dans la réaction au Rose bengale, liée au pH de la réaction. Cet effet de l'activité avait échappé à RICE (1967) qui n'avait travaillé que de pH 8,0 à pH 4,5 seulement. Ces résultats préliminaires obtenus à partir d'immunoglobulines semi-purifiées ont été confirmés par CORBEL (1972 *a* et *b*) avec des produits de qualité équivalente, ce qui ne permettait pas de tirer des conclusions très affirmatives. Cet auteur reconnaît que, à l'exception des IgG<sub>2</sub>, ses fractions ne sont pas homogènes. Avec des immunoglobulines de plus grande pureté, il est maintenant possible d'approfondir l'étude du mécanisme de ces réactions sérologiques sur des bases plus solides.

— L'activité des IgM est un fait marquant de ces résultats car elles agglutinent dans toutes les conditions et fixent le complément. Ceci est en désaccord avec les travaux de CORBEL (1972 *b*) qui ne trouve pas d'activité liée aux IgM dans le test au Rose bengale. L'explication de cette « non activité » des IgM observée par CORBEL vient probablement de la faible quantité d'anticorps spécifiques appartenant à cette classe dans les sérums étudiés par cet auteur.

— L'activité agglutinante des IgG<sub>1</sub> dépend étroitement de la nature du diluant utilisé. La présence de NaCl à 5 p. 100 ou d'un pH bas augmente cette activité de façon caractéristique. TURNER (1972), en utilisant le sulfate de zinc à 0,025 p. 100 ou le sulfite de sodium à 36 p. 100, augmente considérablement le titre agglutinant des sérums présentant une fixation du complément positive et une séroagglutination douteuse. Selon toute vraisemblance, ce sont les IgG<sub>1</sub> qui sont concernées.

— Le comportement des IgG<sub>1</sub> dans les différents tests étudiés montre également qu'il faut très peu de chose pour les rendre agglutinantes, tout au moins dans les dilutions proches de l'équivalence. En NaCl 0,15 M, les IgG<sub>1</sub> du sérum 820 agglutinent sur trois dilutions, mais en renouvelant cette réaction le phénomène de zone a parfois couvert toutes les dilutions. Inversement, la même solution d'IgG<sub>1</sub> provenant du sérum B I, confiée à quatre opérateurs travaillant dans les mêmes conditions matérielles, a donné des résultats allant de la non-agglutination jusqu'à une agglutination couvrant les deux ou trois dilutions proches de l'équivalence. Ainsi, non seulement des changements de force ionique ou de pH du milieu réactionnel interviennent dans l'activité des IgG<sub>1</sub>, mais des facteurs moins faciles à contrôler — par exemple la façon de diluer ou d'agiter les tubes — peuvent influencer les propriétés agglutinantes *in vitro* des IgG<sub>1</sub>.

Ces données semblent peu compatibles avec l'éventualité d'une action du milieu sur l'antigène plutôt que sur l'anticorps, d'autant plus que la réaction à pH 3,6 retire aux IgG<sub>2</sub> les dilutions qu'elle apporte en supplément d'activité aux IgG<sub>1</sub>. Il faudrait en effet supposer qu'un déterminant antigénique correspondant aux IgG<sub>1</sub> devient « agglutinogène » en milieu NaCl 5 p. 100 ou pH 3,6 tandis que le déterminant antigénique propre aux IgG<sub>2</sub> serait rendu non agglutinogène. L'antigène primordial dans ces réactions sérologiques étant le lipopolysaccharide (DIAZ et LEVIEUX, 1972), la structure rigide de celui-ci rend ces hypothèses peu vraisemblables.

L'immunoglobuline possède par contre une région charnière flexible (*Hinge Region*) qui pourrait permettre à la molécule de passer d'une forme Y non agglutinante à une forme T agglutinante. Cette torsion de la molécule semble d'ailleurs nécessaire pour la fixation du complément et peut être suscitée par l'union de l'anticorps à l'antigène.

Sur un plan moins fondamental, la répartition de l'activité anticorps parmi les différentes immunoglobulines souligne l'apparition précoce des IgG après vaccination (sérum B VI et 365) et la persistance d'IgM quatre mois après une infection (sérum 820) ou même trois ans après une vaccination (sérum R. F.). Cette dernière constatation n'est pas imputable à une anomalie de concentration des protéines sériques car en électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide et en immunoelectrophorèse ce sérum est normal.

RICE (1971) note également la présence d'anticorps thermolabiles de type macroglobuline dans certains troupeaux infectés de façon chronique, et AMERAULT *et al.* (1961) ont montré la persistance d'IgM agglutinantes chez des génisses vaccinées au B 19.

Il paraît donc tout à fait illusoire d'essayer de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés à partir du titrage des IgM.

La comparaison des différents tests sérologiques étudiés montre clairement qu'aucun test sérologique, pris isolément, n'est capable de détecter toutes les classes d'immunoglobulines. La séroagglutination lente en NaCl 0,15 M ne révèle pas les IgG<sub>1</sub> et l'addition de NaCl à 5 p. 100 — bénéfique dans l'ensemble — ne permet pas d'obtenir la disparition complète du phénomène de zone dû aux IgG<sub>1</sub> (sérum 365 par exemple). L'agglutination à pH 3,6 améliore l'agglutination par les IgG<sub>1</sub> mais diminue celle des IgG<sub>2</sub>. La fixation du complément ne titre pas les IgG<sub>2</sub>.

D'après ces résultats, il est nécessaire d'associer deux tests pour titrer toutes les classes d'immunoglobulines spécifiques : séroagglutination (NaCl 0,15 M) et test de



Coombs, séroagglutination (NaCl 0,15 M) et fixation du complément, ou séroagglutination (NaCl 0,15 M) et test Rose bengale.

L'obligation, pour des raisons économiques, de faire un dépistage de masse à partir d'une seule épreuve sérologique, a orienté les règlements administratifs vers l'attitude suivante : dépistage par séro-agglutination, complété par une fixation du complément dans les cas douteux. Les IgG<sub>1</sub> sont donc ignorées au niveau du test de masse. Les Britanniques, par contre, basent leur dépistage sur le test au Rose bengale, les sérums positifs étant ensuite confirmés par fixation du complément. Dans ce cas, les IgG<sub>2</sub> sont ignorées dans les deux épreuves et la fixation du complément ne devrait pas contredire les résultats du Rose bengale, puisque chacun de ces deux tests titre simultanément les IgG<sub>1</sub> et les IgM.

La question est donc de savoir s'il est préférable de titrer les IgG<sub>2</sub> + les IgM ou les IgG<sub>1</sub> + les IgM. La cinétique de l'évolution dans la Brucellose des classes d'immunoglobulines spécifiques n'étant pas connue, force est de se référer aux analyses statistiques sur l'activité comparée des différents tests sérologiques, rapportée aux résultats bactériologiques et cliniques.

NICOLETTI (1966), sur un millier d'échantillons de sérum provenant de bovins à bactériologie positive, montre que la séroagglutination standard détecte 61 p. 100 des animaux infectés, l'agglutination sur plaque à pH 4 (ROSE et ROEPKE, 1957), 96 p. 100 et la fixation du complément, 97 p. 100.

Le pourcentage élevé d'animaux infectés non décelés par la séro-agglutination, de même que la corrélation très étroite entre les résultats du test Rose bengale et ceux de la fixation du complément ont été également signalés par divers auteurs (MORGAN, 1969; DAVIES, 1971; CORBEL, 1972 *b*; FENSTERBANK, 1973). Ce dernier point cadre bien avec les résultats présentés dans ce travail, puisque dans les deux tests les mêmes classes d'immunoglobulines sont titrées.

Il semblerait également que, d'après ces auteurs, le Rose bengale devienne positif plus précocement que l'agglutination standard ou la fixation du complément. PILET *et al.* (1972) l'ont confirmé sur des sérums humains et des sérums de rat. Cette précocité du Rose bengale pourrait s'expliquer, vis-à-vis de l'agglutination, par une apparition plus rapide des IgG<sub>1</sub>. Vis-à-vis de la fixation du complément, il faut insister sur le fait que le Rose bengale est standardisé à une sensibilité plus élevée que la fixation du complément. Le rôle du diluant est primordial pour la sensibilité : en NaCl 0,15 M, en tampon MAYER ou en tampon phosphate 0,01 M, pH 6,8 + NaCl 0,15 M (confirmé par BEH, 1973), le test au Rose bengale est beaucoup moins sensible que lorsqu'il est effectué avec des dilutions en sérum non immun. Le cas du sérum R. F. est caractéristique : dans les analyses de routine du laboratoire, il est déclaré Rose bengale positif et fixation du complément négative. La technique de fixation du complément de WASSERMAN et LEVINE montre cependant que ce sérum possède des IgM actives selon ce test et que le Rose bengale n'est positif que sur le sérum pur et dilué au demi dans NaCl 0,15 M.

Il ressort également de ce travail qu'un seul sérum ne peut tenir lieu de sérum international de référence pour la standardisation des différents tests sérologiques.

D'après les chiffres précédemment cités, le test au Rose bengale semble donc offrir le maximum de garanties, et la fixation du complément n'y ajoute rien (il est en effet très rare d'observer une fixation du complément positive et un Rose bengale négatif). Il reste néanmoins une marge d'erreur, probablement due à la non détection

des IgG<sub>2</sub>. Comme la signification d'une activité dans cette sous-classe n'est pas connue, il peut être imprudent de ne pas titrer cette immunoglobuline.

Une étude fondamentale sur le mécanisme responsable de l'agglutination ou de la non-agglutination des IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2</sub> pourrait conduire à la mise au point d'un nouveau test titrant l'activité de toutes les classes et sous-classes d'immunoglobulines présentes dans l'échantillon. Actuellement, seul le test de Coombs répond à cette exigence, mais les manipulations qu'il nécessite ne permettent pas de l'utiliser dans la pratique courante. Il serait souhaitable que le nouveau test soit d'exécution aussi simple et rapide que le test au Rose bengale.

*Reçu pour publication en juin 1974.*

## SUMMARY

### BOVINE IMMUNOGLOBULINS AND BRUCELLOSIS.

#### II. — ACTIVITY OF IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> AND IgM OF SERUM IN AGGLUTINATION, COOMBS, COMPLEMENT FIXATION REACTIONS AND IN THE ROSE BENGAL TEST

The highly purified immunoglobulins IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> and IgM were obtained from bovine sera of an experimental herd of known brucellosis states : early or late vaccination, infection with or without previous vaccination. Comparisons between the content of specific immunoglobulins of each class, in each type of serum, do not show a characteristic pattern for a given situation ; particularly it is clear that the differentiation of antibodies resulting from infection and those from vaccination is not possible by comparative studies of the IgM and IgG activities.

Serological properties of immunoglobulins were studied in agglutination reaction (with different conditions, fig. 1), complement fixation and Rose Bengal tests. IgG<sub>2</sub> is active in normal agglutination but not in agglutination at pH 3,6 or in Rose Bengal and complement fixation tests. IgG<sub>1</sub> is inactive in normal agglutination, but efficient in agglutination at pH 3,6 and in the Rose Bengal test ; they fix complement. IgM is efficient in all these tests.

Serological diagnosis of brucellosis is discussed in the light of these results.

## РЕЗЮМЕ

**Иммуноглобулины рогатого скота и бруцеллёз. — II, Деятельность IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM сыворотки в реакциях агглютинации, Кообса, фиксации дополнительного вещества и в опыте поглощения розового бенгальского красителя.**

Иммуноглобулины IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM очистились на основе сывороток происходящих от стада, экспериментально поражённого бруцеллёзом, его санитарное состояние известно : старая или недавняя вакцинация, которая предшествовала или не предшествовала поражению.

Сравнение содержания специфических иммуноглобулинов каждого класса и в каждом виде сыворотки не показывает характерного распределения в соответствии с данным положением в особенности, нельзя надеяться отличить вакцинные антитела от инфекционных антител с помощью изучения деятельности IgM, противной деятельности IgG.

Деятельность иммуноглобулинов изучается в серологических реакциях агглютинации (в разных условиях, фиг. I), фиксации дополнительного вещества и с помощью теста поглощения розового бенгальского красителя. IgG<sub>2</sub> участвуют в обычной агглютинации но не участвуют в агглютинации при pH 3,6, в тесте поглощения розового бенгальского красителя или в фиксации дополнительного вещества. Наоборот, IgG<sub>1</sub> не участвуют в обычной агглютинации но принимают участие в агглютинации при pH 3,6 и в опыте поглощения розового бенгальского красителя; они фиксируют дополнительное вещество. В каждом опыте, титруются IgM.

Серологический диагноз бруцеллёза обсуждается при свете этих результатов.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMERHAULT T. E., MANTHEI C. A., GOODE E. R., LAMBERT G., 1961. A heat-inactivation test for differentiating specific and non specific agglutination reactions for bovine brucellosis. *Amer. J. veter. Res.*, **22**, 564-569.
- BEH K. J., 1973. Distribution of Brucella antibody among immunoglobulin classes and low molecular weight antibody fraction in serum and whey of cattle. *Res. veter. Sci.*, **14**, 381-384.
- CORBEL M. J., 1972 a. Characterisation of antibodies active in the Rose Bengal plate test. *Veter. Rec.*, **90**, 484-485.
- CORBEL M. J., 1972 b. Identification of the immunoglobulin class active in the Rose Bengal plate test for bovine Brucellosis. *J. Hyg. Camb.*, **70**, 779-795.
- CUNNINGHAM B., 1971. The occurrence of agglutinating, complement-fixing, and incomplete antibodies to *Brucella abortus* in milk, and their relationship to the milk ring test. *Veter. Rec.*, **88**, 244-250.
- DAVIES G., 1971. The Rose Bengal Test. *Veter. Rec.*, **88**, 447-449.
- DIAZ R., LEVIEUX D., 1972. Rôle respectif en sérologie de la Brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. *C. R. Acad. Sci.*, **274 D**, 1593-1596.
- FENSTERBANK R., 1973. Appréciation de la valeur de la réaction au Rose bengale sur les sérums de génisses infectées expérimentalement avec *B. abortus*. *Bull. Off. internation. Epizoot.* (sous presse).
- FOZ A., GARRIGA S., 1954. Relation entre la fixation du complément et les anticorps « incomplets » (test de Coombs) dans la brucellose humaine. *Rev. Immunol.*, **18**, 288-298.
- LEVIEUX D., 1974. Immunoglobulines bovines et Brucellose. I. Purification des immunoglobulines et préparation de leurs antisérums spécifiques. *Ann. Rech. vétér.*, **5** (3), 329-342.
- MORGAN W. J., 1967. The serological diagnosis of bovine brucellosis. *Veter. Rec.*, **80**, 612-621.
- MORGAN W. J., MacKINNON D. J., LAWSON J. R., CULLEN G. A., 1969. The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of Brucellosis. *Veter. Rec.*, **85**, 636-643.
- NICOLETTI P., 1966. Bacteriologic evaluation of serologic test procedure for the diagnosis of Brucellosis in problems cattle herds. *Amer. J. veter. Res.*, **27**, 689-694.
- NICOLETTI P., 1967. Utilisation of the Card Test in brucellosis eradication. *J. amer. veter. med. Ass.*, **151**, 1778-1783.
- NICOLETTI P., 1969. Further evaluations of serological test procedures used to diagnose Brucellosis. *Amer. J. veter. Res.*, **30**, 1811-1816.
- PHILIPPON A., PLOMMET M., RENOUX G., GESTIN J., FENSTERBANK R., 1971. Brucellose bovine expérimentale. VII. Influence sur l'évolution de l'infection d'une faible concentration d'oxytétracycline dans l'organisme au moment de l'inoculation. *Ann. Rech. vétér.*, **2**, 147-157.
- PILET Ch., TOMA B., ANDRÉ G., 1972. Diagnostic sérologique de la Brucellose par l'épreuve à l'antigène tamponné (E. A. T.) ou card test. *Cah. Méd. vétér.*, **41**, 5-19.
- PLOMMET M., RENOUX G., PHILIPPON A., LORENTZ C., GESTIN J., 1970. Brucellose bovine expérimentale. I. Comparaison de l'efficacité des vaccins B 19 et H 38. *Ann. Rech. vétér.*, **1**, 189-201.
- RENOUX G., GAUMONT G., 1966. Méthodes de diagnostic biologique des brucelloses animales. *Cahiers techniques du C. N. C. E. R. N. A., C. N. R. S., Paris.*
- RENOUX G., PLOMMET M., PHILIPPON A., 1971. Microréactions d'agglutination et de fixation du complément pour le diagnostic des Brucelloses. *Ann. Rech. vétér.*, **2**, 263-269.
- RICE C. E., ALEXANDER D. C., BARRETT B. B., 1967. Chromatographic studies of sera from calves vaccinated with *Brucella abortus* Strain 19. *Canad. J. comp. Med. veter. Sci.*, **31**, 114-121.
- RICE C. E., BOYES B., 1971. Serum immunoglobulins in bovine Brucellosis. *New Zeal. veter. J.*, **19**, 146-154.

- ROSE J. E., ROEPKE M. H., 1957. An acidified antigen for the detection of non specific reactions in the Plate-Agglutination Test for bovine Brucellosis. *Amer. J. veter. Res.*, **18**, 550-555.
- TURNER G. R. J., 1972. The effect of zinc sulphate and sodium sulphite on titres of the serum agglutination test for Brucellosis. *Veter. Rec.*, **16**, 631-632.
- WASSERMAN E., LEVINE L., 1961. Quantitative micro-complement fixation and its use in the study of antigenic structure by specific antigen-antibody inhibition. *J. Immunol.*, **87**, 290-295.
-