

# 7

## **La détection, au moyen de sonde(s) génétique(s), de souches potentiellement attachantes et effaçantes d'*Escherichia coli* (AEEC) isolées de veaux, de porcelets et de carnivores domestiques**

J.G. MAINIL\*, E. JACQUEMIN\*, S. BEZ\*, P. POHL\*\*, A. KAECKENBEECK\*

\* *Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Sart-Tilman, Belgique*

\*\* *Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles, Belgique*

### **Résumé**

*Certaines souches diarrhéogènes d'*Escherichia coli* possèdent la propriété d'effacer les microvillosités des entérocytes et d'y adhérer intimement : souches AEEC, lésions AE. Ces souches sont subdivisées en deux groupes : les souches vérotoxigènes ou souches VTEC-AEEC, qui produisent des toxines actives sur les cellules Véro en culture (toxines SLT1 et SLT2), et les souches entéropathogènes, ou souches EPEC-AEEC, qui ne produisent pas de vérotoxines, mais bien des adhésines ("EPEC Adherence Factor" ou EAF) leur conférant la propriété d'adhérer de manière localisée sur des cellules en culture. Les souches AEEC humaines produisent une protéine de membrane externe, l'intimine, qui est impliquée dans l'attachement intime de ces bactéries aux entérocytes. Le gène qui code pour l'intimine a été cloné à partir de souches AEEC humaines et une sonde génétique*

spécifique en a été dérivée (sonde *eae*). Cette sonde génétique a été utilisée dans un test d'hybridation ADN-ADN sur colonies, sur des collections de 798 souches canines, 113 souches félines et 781 souches porcines afin de détecter des souches potentiellement AE pour ces espèces animales. 270 souches bovines ont aussi été choisies et étudiées, dont 66 étaient des VTEC. Ces collections de souches ont ensuite été testées avec des sondes génétiques spécifiques des vérotoxines (sondes SLT1 et SLT2), de l'attachement localisé sur cultures de cellules (sonde EAF), et d'une adhésine fimbriaire produites par des souches AEEC de lapins (sonde AF/R1). Des souches potentiellement AE, positives à la sonde *eae*, ont été détectées dans toutes les espèces animales, mais à des fréquences différentes : 7% chez le chien, 5% chez le chat et 1% chez le porcelet. La proportion de souches bovines positives à la sonde *eae* n'a pas de valeur statistique étant donné que ces souches avaient été choisies au sein d'une large collection. Les souches bovines positives à la sonde *eae* étaient majoritairement des VTEC-AEEC (85%) au contraire des souches des autres espèces animales : 3% chez le chien, 1% chez le porcelet et 0% chez le chat. Les souches non-VTEC-AEEC ne peuvent cependant être qualifiées de souches EPEC-AEEC car elles n'hybridaient pas avec la sonde EAF à trois exceptions près, pas plus qu'elles n'hybridaient avec la sonde AF/R1. Par contre, certaines souches négatives à la sonde *eae* hybridaient avec la sonde EAF seule ou avec les sondes SLT1 et/ou SLT2, constituant peut-être d'autres groupes de souches potentiellement diarrhéogènes.

Les souches diarrhéogènes sont subdivisées en de nombreuses classes [18]. Les souches possédant la propriété d'effacer les microvillosités des entérocytes (souches AEEC : "attaching and effacing *E. coli*"; propriétés AE : attachement et effacement) ont été décrites dans l'espèce humaine et diverses espèces animales, dont les bovins, les chats, les chiens et les porcs [2,8,17]. Deux classes de souches AEEC sont décrites : les souches vérotoxino-gènes qui produisent des toxines actives sur cellules Véro (toxines Shiga-like, SLT), mais pas d'entérotoxines (souches VTEC/AEEC), et les souches entéropathogènes qui ne produisent pas de vérotoxines, ni d'entérotoxines (souches EPEC/AEEC).

Le modèle actuel concernant la pathogénie de ces souches comprend trois étapes [4]. La première étape est la colonisation de l'intestin grâce à une adhésine. La production d'une telle adhésine ("Bundle Forming Pili" ou BFP) par les souches EPEC/AEEC humaines se traduit par des propriétés particulières d'adhérence localisée (LA) à des cellules en culture ("EPEC Adherence Factor" ou EAF). Les souches adhérant de manière locale, diffuse ou aggrégative à des cellules en culture ont aussi été dénommées souches entéroadhérentes d'*E. coli* ou EAEC [12,15]. Une deuxième étape est constituée par la production d'un signal par la bactérie, qui provoque dans les entérocytes un réarrangement du cytosquelette, avec entre autres conséquences, la disparition des microvillosités. La troisième étape est constituée par l'adhérence intime de la bactérie à la cellule intestinale, par l'intermédiaire d'une protéine de la membrane externe appelée intimine, ce qui provoque une accentuation des réarrangements du cytosquelette avec une forte accumulation de filaments d'actine au pôle apical de la cellule, à l'endroit d'attachement intime de la bactérie. Une cupule se forme sous la cellule bactérienne.

Le gène qui code pour la protéine intimine (gène *eae*) a été cloné à partir de la souche EPEC humaine de référence E2348/69 et de deux souches VTEC/AEEC humaines

(souches entérohémorragiques ou EHEC) [1, 6, 22]. Ces trois intimes montrent des différences importantes de séquence dans le dernier tiers du gène, qui peuvent être à la base de différences antigéniques et de récepteurs cellulaires.

Le diagnostic d'une infection à souches AEEC chez l'animal n'est pas facile à faire. Les signes cliniques sont vagues (diarrhée récidivante, non profuse) et les lésions macroscopiques peu typiques (entérite ou colite plus ou moins hémorragiques) ou inexistantes [13]. Les lésions microscopiques d'effacement des microvillosités pourraient être mises en évidence par examen microscopique [13], mais ces examens exigent d'effectuer les prélèvements sur un cadavre frais, ce qui est très souvent non compatible avec les conditions de la pratique. Donc, les *E. coli* isolés à partir de matières fécales ou du contenu intestinal sont à caractériser. Les souches AEEC appartiennent à quelques sérogroupes particuliers selon l'espèce animale [2, 11, 17] mais, comme pour les souches entérotoxigènes, ce seul critère est insuffisant. Les propriétés spécifiques de la virulence à mettre en évidence sont ou seraient les suivants :

- une ou des adhésines responsables de l'attachement initial. Il s'agit des pili BFP responsables de l'adhésion localisée des souches EPEC humaines à des cellules en culture, mais ces adhésines sont malheureusement encore inconnues pour les souches animales, sauf peut-être chez le lapin [4, 17];
- l'accumulation de filaments d'actine. Le test FAS ("Fluorescent-Actin-Staining") permet de visualiser l'accumulation d'actine sur cellules en culture grâce à la propriété de fixation du conjugué Phalloïdine-Isothiocyanate Fluorescéine (FITC) sur ces filaments [7]. Ce test ne peut cependant être utilisé que si les bactéries adhèrent aux cellules en culture, ce qui n'est pas le cas de toutes les souches d'origine animale (Pohl, résultats non publiés);
- la protéine intime responsable de l'attachement intime. Actuellement, la seule manière de la mettre aisément en évidence est constituée par l'emploi d'une sonde génétique spécifique dérivée du gène *eae* de la souche E2348/69 [6].

Le but de nos travaux était double :

- mettre en évidence des souches potentiellement AEEC en utilisant la sonde pour l'intime sur des collections de souches bovines, canines, félines et porcines;
- utiliser sur ces mêmes collections des sondes spécifiques pour les toxines Véro, pour l'adhérence LA sur cellules en culture et pour une adhésine de souches EPEC lapines, afin de classer les souches potentiellement AEEC d'origine animale comme VTEC ou EPEC, comme c'est le cas chez l'homme.

## Matériels et méthodes

### Souches bactériennes

270 souches d'origine bovine, 798 souches d'origine canine, 113 souches d'origine féline et 781 souches d'origine porcine ont été testées dans ce travail. Ces souches ont été isolées d'animaux souffrant de diarrhées ou de lésions d'entérite ou de septicémie soupçonnées être causées par *E. coli*. Une à cinq souches ont été isolées par animal et conservées sur milieu Dorset à l'œuf [3].

## Sondes génétiques et hybridation ADN/ADN sur colonies

Les sondes génétiques (Tableau I) ont été dérivées de plasmides recombinants après purification par ultracentrifugation en gradient de CsCl. Les hybridations sur colonies ont été accomplies à 65°C sans formamide [9].

**Tableau I.** Dérivation des sondes génétiques.

Nom	Sonde		Plasmide recombinant	Endonucléases*
	Taille	Spécificité		
eae [6] <sup>1</sup>	1000 pb	Intimine	pCVD432	<i>Sal I + Kpn I</i>
SLT1 [16]	1142 pb	Vérotoxines 1	pJN37-19	<i>BamHI</i>
SLT2 [16]	842 pb	Vérotoxines 2	pNN111-19	<i>PstI</i>
EAF [14]	1000 pb	Adhérence localisée	pMAR22	<i>BamHI + Sal I</i>
AF/R1 [21]	412 pb	Adhésine	pW9	<i>KpnI</i>

(\*) : Endonucléases de restriction à utiliser pour dériver le fragment sonde  
pb : paires de base

Les souches contrôles positives étaient les souches de référence EPEC E2348/69 (sondes eae et EAF), RDEC-1 (sondes eae et AF/R1), 1625 (sondes eae et SLT1) et 211 (sonde SLT2). Les témoins négatifs étaient constitués des mêmes souches et de la souche HS [5, 10, 20].

## Résultats

Les résultats sont résumés dans le Tableau II. Il faut noter qu'aucune souche n'hybridait avec la sonde AF/R1.

## Discussion

Le diagnostic des souches AEEC est difficile. Jusque récemment, l'examen histopathologique des prélèvements de la muqueuse intestinale était le seul test possible et demandait confirmation par microscopie électronique [13]. Le développement du test FAS a permis de faciliter la recherche des souches AEEC [7], mais ce test se base sur l'expression *in vitro* de l'attachement initial des bactéries aux cellules en culture. Le test d'hybridation ADN-ADN sur colonies avec une sonde spécifique et sensible ne dépend pas des conditions de culture *in vitro* et peut être utilisé pour étudier des centaines de souches à la fois. Une sonde génétique (sonde eae) a récemment été dérivée du gène codant pour la protéine intimine qui intervient dans l'adhérence intime des souches AEEC aux entérocytes [6]. Cette sonde s'est avérée spécifique et sensible pour la détection des souches AEEC d'origine humaine, lapine et bovine [6,11, 20].

**Tableau II.** Résultats d'hybridation et pathotypes des souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine (270 souches), canine (798 souches), féline (113 souches) et porcine (781 souches).

Origine	Pathotype	Nombre de		Classe
		Souches	Animaux	
Bovine	eae+SLT1+	46	28	VTEC/AEEC
	eae+SLT1+SLT2+	2	2	VTEC/AEEC
	eae+SLT2+	1	1	VTEC/AEEC
	eae+	10	4	AEEC
	SLT1+	3	1	VTEC
	SLT1+SLT2+	8	4	VTEC
	SLT2+	4	4	VTEC
	SLT2+EAF+	2	1	VTEC/EAEC*
	EAF+	2	1	EAEC*
Canine	eae+SLT2+	2	1	VTEC/AEEC
	eae+	56	29	AEEC
	EAF+	2	1	EAEC
	EAF+	15	5	EAEC*
Féline	eae+EAF+	3	1	EPEC/AEEC
	eae+	3	3	AEEC
	SLT2	1	1	VTEC
	EAF+	4	2	EAEC*
Porcine**	eae+	10	10	AEEC
	eae+SLT2+	1	1	VTEC/AEEC
	SLT2+	164	NC	VTEC***

\* Ces souches hybridaient avec la sonde EAF mais faiblement.

\*\* La sonde EAF n'a pas encore été testée sur ces souches.

\*\*\* Nombre de ces souches étaient associées à de la diarrhée postsevrage et/ou à la maladie de l'œdème [19].

NC : non calculé.

Notre travail consistait à détecter au moyen de cette sonde génétique, des souches potentiellement AEEC dans les espèces animales bovine, canine, féline et porcine, et à en déterminer les autres propriétés de virulence retrouvées chez des souches AEEC humaines.

Les résultats ont donc montré qu'il existe bien des souches potentiellement AEEC dans ces quatre espèces animales, mais leur proportion varie selon l'espèce considérée, bien

qu'il ne faille pas tirer de conclusions définitives étant donné le biais apporté par le choix des souches (surtout pour l'espèce bovine).

Les souches AEEC bovines se répartissent en deux groupes : VTEC (85%) et non-VTEC (15%), au contraire des souches AEEC canines (à deux exceptions près, 3%), félines et porcines qui sont toutes non-VTEC. Mais, seules trois de ces souches AEEC non-VTEC d'origine féline, hybrident avec la sonde EAF et peuvent donc être qualifiées d'EPEC. Nous proposons que toutes les autres souches non-VTEC positives à la sonde eae gardent le nom de souches AEEC ou, pour être plus précis, de souches potentiellement AEEC. Des études phénotypiques doivent en effet être menées pour confirmer la correspondance entre le génotype et le phénotype.

Les souches négatives à la sonde eae et positives aux sondes SLT1 et/ou SLT2 (Tableau II) sont rarissimes ou inexistantes chez le chien et le chat. Celles qui sont positives chez le porc à la sonde SLT2 sont associées à la maladie de l'œdème[18]. Celles qui sont positives chez le veau peuvent représenter une autre classe de souches diarrhéogènes ou bien une autre classe de souches AEEC possédant un gène codant pour une protéine intimine différent de celui dont la sonde génétique fut dérivée. Nous proposons de garder le nom de VTEC pour ces souches.

Il reste à présenter un groupe de souches qui hybrident plus ou moins fortement avec la sonde EAF, spécifique de la propriété d'attachement localisé (LA) de certaines souches EAEC humaines aux cellules en culture [12,15], tout en étant négatives avec les autres sondes. Chez l'homme, ces souches sont en fait des souches AEEC qui hybrident avec la sonde eae et portent le nom de souches EPEC [18]. Mais les souches positives à la sonde EAF chez le veau, le chien et le chat sont négatives à la sonde eae et peuvent, à l'instar des souches VTEC, représenter une autre classe de souches diarrhéogènes ou bien une autre classe de souches AEEC possédant un gène codant pour une protéine intimine différent de celui dont la sonde génétique fut dérivé. Nous proposons de garder le nom de EAEC pour ces différentes souches.

En résumé, à côté des souches ETEC, une deuxième classe de souches potentiellement pathogènes dans l'intestin existe donc chez les animaux domestiques : celles des souches AEEC. Le pathotype (et probablement les sérotypes) de ces souches diffèrent selon l'espèce animale envisagée. Chez les bovins, le chien et le chat, l'importance de ces souches est approximativement 5%, tandis qu'elle est beaucoup plus basse chez le porc (1%) [Mainil et Pohl : résultats non publiés, 5,8]. L'existence d'autres classes de souches, VTEC et EAEC est à reconnaître. Leur pouvoir et leur rôle pathogènes sont suggérés par la présence de nombreuses souches positives dans les matières fécales (Tableau II), mais doivent cependant être confirmés par des études sur l'animal.

## Références

1. Beebakhee G., Louie M., De Azavedo J., *et al.* (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype 0157 : H7. *FEMS Microbiol Lett* ; 91 : 63-68.
2. Broes A. (1993). Les *Escherichia coli* pathogènes du chien et du chat. *Ann Méd Vét* ; 137 : 377-384.
3. Cowan S.T., Steel K.J. (1993). *Manual for identification of medical bacteria*. Barrow G.I., Feltham R.K.A. eds; 2<sup>ème</sup> édition, Cambridge University Press; UK: 194.

4. Donnenberg M.S., Kaper J.B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* ; 60 : 3953-3961.
5. Fairbrother (1993).
6. Jerse A.E., Yu J., Tall B.D. *et al.* (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for production of attaching and effacing lesions on tissue culture *Proc Natl Acad Sci USA* ; 87 : 7839-7843.
7. Knutton S., Baldwin T., Williams P.H., *et al.* (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells : basis for a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* ; 57 : 1290-1298.
8. Mainil J. (1993). Les colibacilloses dans l'espèce bovine. *Ann Méd Vét* ; 137 : 343-350.
9. Mainil J.G., Bex F., Jacquemin E., *et al.* (1990). Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* ; 51 : 187-190.
10. Mainil J.G., Duchesnes C.J., Whipp S.C., *et al.* (1987). Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am J Vet Res* ; 48 : 743-748.
11. Mainil J.G., Jacquemin E., Kaeckenbeeck A., *et al.* (1993). Association between the effacing (eae) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* ; 54 : 1064-1068.
12. Matthewson J.J., Johnson P.C., Dupont H.L., *et al.* (1985). A newly recognized cause of travelers diarrhea : enteroadherent *Escherichia coli*. *J Infect Dis* ; 151 : 471-475.
13. Moon H.W., Whipp S.C., Argenzio R.A., *et al.* (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbits intestines. *Infect Immun* ; 41 : 1340-1351.
14. Nataro J.P., Baldini M.M., Kaper J.B., *et al.* (1985). Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis* ; 152 : 560-565.
15. Nataro K.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., *et al.* (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-II cells. *Pediatr Infect Dis J* ; 6 : 829-831.
16. Newland J.W., Neill R.J. (1988). DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting phages. *J Clin Microbiol* ; 26 : 1292-1297.
17. Peeters J. (1993). Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) du lapin. *Ann Méd Vét* ; 137 : 361-368.
18. Pohl P. (1993). les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann Méd Vét* ; 137 : 325-333.
19. Pohl P., Lintermans P., Mainil J., *et al.* (1989). Production de vérocytotoxine par les *escherichia coli* du porc. *Ann Méd Vét* ; 133 : 29-37.
20. Pohl P., Peeters J., Jacquemin E., *et al.* (1993). Identification of eae-sequences in rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Infect Immun* ; 61 : 2203-2206.
21. Wolf M.K., Boedeker E.C. (1990); Cloning of the genes for AF/R1 pili from rabbit enteroadherent *Escherichia coli* RDEC-1 and DNA sequence of the major structural subunit. *Infect Immun* ; 58 : 1124-1128.
22. Yu j., Kaper J.B. (1992). Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* ; 6 : 411-417.



## 8

# **Etudes épidémiologiques sur la theilériose bovine à *Theileria annulata* : application à la caractérisation du type endémique et à la définition d'une stratégie de lutte\***

M.E.A. DARGHOUTH\*, A. BOUATTOUR\*\*, L. BEN MILED\*, M. KILANI\*,  
C.G.D. BROWN\*\*\*

\* *E.N.M.V., Sidi Thabet, Tunisie*

\*\* *Institut Pasteur de Tunis, Tunisie*

\*\*\* *C.T.V.M., Université d'Edimbourg, Ecosse, Grande-Bretagne*

En Tunisie, la theilériose bovine à *Theileria annulata* est une des dominantes pathologiques estivales affectant l'élevage bovin et en particulier, les animaux de races améliorées. Cette protozoose revêt une grande importance économique, du fait du coût élevé du traitement (70 Dinars Tunisiens, environ 70\$), et de la lutte antivectorielle, des risques de mortalité et enfin des répercussions des formes cliniques et des états d'infections sub-cliniques sur la productivité des animaux.

L'amélioration de l'efficacité des modalités actuelles de prévention (lutte contre les tiques vectrices), et l'utilisation raisonnée de nouveaux moyens de prophylaxie (vaccin vivant atténué) passent obligatoirement par une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la theilériose bovine en Tunisie. C'est dans ce contexte qu'a été développé au Service de Parasitologie de l'E.N.M.V. un travail d'investigations épidémiologiques

\* Travail financé par la DGXII de la CEE (projet STD2/106/1049) et la Fondation Nationale pour la recherche scientifique, Tunisie (projet MD7/89).

s'intéressant aux trois zones les plus affectées par cette parasitose : les étages bioclimatiques sub-humide, semi-aride et aride supérieur.

Dans cet exposé, nous nous intéresserons exclusivement à la première phase de ce travail, menée dans la région de Sidi Thabet (zone semi-aride).

## **Protocole général du travail**

De 1988 à 1992, 4 enquêtes ont été menées sur des élevages bovins de la région de Sidi Thabet.

### **Enquête n°1 (juin-octobre 1988)**

#### *Echantillon*

112 veaux en première saison estivale issus de 19 étables à antécédents de theilériose.

#### *Suivi*

Identification des animaux et réalisation de prélèvements de sérums au début (début juin) puis à la fin de la saison de theilériose (octobre) pour la détection de l'infection par *T. annulata*.

#### *Dépistage de l'infection*

Technique d'immuno-fluorescence indirecte (I.F.I.) utilisant les antigènes schizontes de culture cellulaire et mérozoites érythrocytaires produits *in vivo*, aux dilutions seuils respectives de 1/160 et 1/40.

### **Enquête n°2 (été 1990)**

#### *Echantillon*

50 veaux en première saison estivale et 50 bovins adultes issus de 16 élevages de races laitières à antécédents de theilériose.

#### *Suivi*

Après identification des animaux, les élevages ont été visités en moyenne une fois par semaine entre les mois de juillet et août 1990 pour la collecte dans les parties d'éclive, puis l'identification des espèces du genre *Hyalomma*.

### **Enquête n°3 (avril-mai 1991, avril-mai 1992)**

#### *Echantillon*

404 bovins issus de 51 étables choisies aléatoirement (groupe 1) et 3 élevages retenus pour un parasitisme important par les tiques *Hyalomma* (groupe 2).

#### *Suivi*

Identification des animaux et classement en quatre classes d'âge en fonction du nombre de saisons antérieures de theilériose (Tableau I). Réalisation de prélèvements de sérums et de frottis de sang à 3 reprises, avant la saison de theilériose (avril-mai 1991), après cette

saison (septembre-octobre 1991), et enfin au bout d'un an (avril-mai 1992). Durant l'été, un suivi clinique avec identification des cas de theilériose au laboratoire a été instauré.

**Tableau I.** Résultat de l'enquête sérologique sur les 51 élevages choisis aléatoirement (groupe 1) et les trois étables à forte infestation par les tiques (groupe 2).

Classe d'âge	Saisons antérieures de theilériose	groupe 1		groupe 2	
		séro-incidence d'automne (%)	séro-prévalence* d'automne (%)	séro-incidence d'automne (%)	séro-prévalence* d'automne (%)
0 - 7 mois	0	6,6	11	46,15	56
7 - 15 mois	1	25,8	34,36	100	100
15 - 30 mois	2	35	38,75	100	100
≥ 30 mois	≥3	29,14	53,46	100	100
Total		22,5	36,72	55,56	79,37

\* Séro-prévalence estimée en tenant compte des résultats de la première visite (avril-mai 1991)

### *Dépistage*

Par I.FI avec les antigènes schizontes et mérozoïtes érythrocytaires et par examen des frot-tis de sang avec lecture de 20 champs de microscope (G x 1000) pour la recherche des mérozoïtes érythrocytaires de *T. annulata*.

### **Enquête n°4**

#### *Echantillon*

Trois élevages des groupes 1 et 2 présentant un parasitisme important par les tiques *Hyalomma*.

#### *Suivi*

Identification des animaux, visite des élevages deux fois par mois durant l'été avec collecte de toutes les tiques *Hyalomma* présentes sur les animaux et identification de l'espèce au laboratoire.

#### *Dépistage de l'infection des tiques par T. annulata*

Par coloration des glandes salivaires au vert de méthyle-pyronine (V.M.P.) après dissection. Seuls les mâles de *H. detritum* et les *Hyalomma* femelles en phase précoce de gorgement ont été disséqués.

## **Résultats et discussion**

Les résultats principaux obtenus au cours de ces investigations épidémiologiques sont rapportés pour chacune des enquêtes :

### Enquête n°1

Sur les 19 étables visitées, seules 6 ont présenté des veaux à sérologie positive. Après la saison de theilériose, la séro-prévalence de l'infection au sein de l'échantillon de veaux présents à la deuxième visite (n=92) est de 22%. Dans les étables à veaux sérologiquement positifs, la séro-prévalence a varié de 36,3% à 66,7%. Enfin, trois veaux ont présenté une theilériose clinique dans une seule des 18 étables suivies, d'où une incidence clinique de 3,2% relativement au nombre de veaux présents à la seconde visite.

### Enquête n°2

*H. detritum* a été retrouvée uniquement dans 2 des 18 étables suivies. Cette tique représente environ 9,5% de l'ensemble des tiques *Hyalomma* collectées, et constitue de ce fait une espèce mineure par rapport à *H. marginatum* et *H. excavatum*. Les veaux en première saison estivale ont présenté un parasitisme moyen par les *Hyalomma* 4 à 5 fois plus faible que les bovins adultes.

### Enquête n°3

L'I.FI à l'antigène schizonte apparaît plus fiable pour le dépistage de l'infection par *T. annulata*. Elle détecte jusqu'à 4 fois plus d'animaux infectés que l'antigène érythrocytaire et 5 fois plus que les frottis de sang colorés au Giemsa. Cependant, dans les trois étables du groupe 2, ces 2 types d'antigènes présentent la même fiabilité après la saison de theilériose. De plus, à l'exception de deux animaux, tous les individus sérologiquement positifs avec l'antigène érythrocytaire ont aussi réagi positivement avec l'antigène schizonte. Les résultats obtenus dans les 2 groupes d'étables par I.FI à l'antigène schizonte sont rapportés dans le Tableau I.

Dans le groupe 1, le taux de séro-conversion chez les veaux en première saison estivale est significativement plus faible que dans les classes d'âge supérieur (test Chi-2,  $p < 0,01$ ), alors que parmi ces dernières, aucune différence significative n'a été notée. De plus, la majorité des étables (47 des 51 exploitations visitées) hébergeaient des bovins infectés, même lorsque les locaux d'élevage bien entretenus paraissaient peu favorables à la tique vectrice.

Dans le groupe 2, l'exposition à l'infection par *T. annulata* est plus fréquente. En effet, près de 60% des veaux passent le cap de la première saison estivale en contractant une infection généralement sub-clinique. A partir de la deuxième saison estivale, tous les individus sont prémunis contre la theilériose. Cette situation est poussée à l'extrême dans deux étables de ce groupe où, dès leur premier été, l'ensemble des veaux se trouvent infectés.

Au total, 9 cas de theilériose ayant nécessité une consultation vétérinaire ont été confirmés au laboratoire. 8 cas ont été enregistrés parmi les élevages du groupe 1, sur des bovins des classes d'âge 2, 3 et 4 avec une incidence relative de 3,56%. Par ailleurs, l'incidence clinique maximale, soit 8,9% a été notée dans la classe des bovins en troisième saison estivale (classe 3).

Enfin, dans le groupe 2, un seul cas de theilériose subaiguë a été diagnostiqué sur une velle en première saison estivale. De plus, dans 1 des 3 élevages, 4 taurillons acquis durant l'été et non inclus dans ce travail ont tous développé une theilériose clinique.

## Enquête n°4

Au total, 4830 tiques *Hyalomma* ont été collectées dont 2260 disséquées pour l'examen des glandes salivaires. *H. detritum* est l'espèce dominante avec environ 87% du total récolté, suivie de *H. marginatum* (11%), et enfin de *H. excavatum* (2,75%). Seules les tiques *H. detritum* ont présenté des images typiques d'infection par *T. annulata*. Cependant, pour les 2 autres espèces, un faible effectif de tiques a été disséqué, respectivement 33% pour *H. marginatum*, et 10% pour *H. excavatum*. 12,8% des tiques *H. detritum* ont été trouvées infectées avec en moyenne 4 acini infectés par tique.

Les résultats obtenus dans les 3 étables visitées sont rapportés dans le Tableau II. Dans le cas de l'élevage 3, ces résultats restent peu fiables du fait de l'utilisation d'acaricide par l'éleveur suite à l'apparition de cas de theilériose sur les taurillons récemment introduits dans l'élevage.

**Tableau II.** Résultats de l'enquête 4 sur les tiques *H. detritum*.

Etable	Nombre moyen de tiques <i>H. detritum</i> collectées / animal / été			Pourcentage de tiques infectées	Nombre de tiques infectées / animal / été	
	<6 mois	6-18 mois	>18 mois		<6 mois*	>18 mois*
1	8	54	>150	12,8	1,02 (100%)	19,2 (100%)
2	0,5	24	35	18,9	0,09 (0%)**	6,6 (93%)
3	8		50	2		

\* Séroprévalence en fin d'été

\*\* Calculée sur 5 veaux

Cette enquête confirme que les jeunes en première saison estivale sont moins réceptifs aux tiques *Hyalomma*, et en particulier à *H. detritum* avec de 6 à 70 fois moins de tiques que chez les adultes, et montre que les jeunes en deuxième saison estivale restent relativement moins parasités que les individus plus âgés.

Les travaux réalisés sur les tiques vectrices (enquête n°3) confirment que *H. detritum* est le vecteur unique ou principal de *T. annulata* en Tunisie, étant données la superposition de l'activité de son stade adulte avec la saison de theilériose, l'absence d'infection chez les autres espèces de *Hyalomma* disséquées, et enfin la corrélation entre les probabilités d'infection (contact avec des tiques infectées) des animaux et les résultats sérologiques obtenus.

L'endémie de theilériose à *T. annulata* apparaît régie par un facteur clé : la probabilité d'infection des jeunes en première saison estivale, ce facteur étant à son tour conditionné par l'importance du parasitisme des jeunes par les tiques et le taux d'infection du vecteur par *T. annulata*. De ces deux éléments dépendent les deux situations rencontrées en zone endémique : l'endémie stable et l'endémie instable.

### La situation d'endémie stable

Ce type endémique est rencontré dans les deux premiers élevages du groupe 2 (enquête 3) où l'ensemble des veaux s'infectent pendant leur première saison estivale en développant

habituellement une theilériose sub-clinique. Cette évolution favorable de l'infection s'explique probablement par les niveaux limités d'inoculation auxquels sont exposés les veaux étant données, d'une part leur réceptivité plus faible aux tiques *Hyalomma*, et d'autre part l'intensité modérée de l'infection du vecteur par *T. annulata*. D'ailleurs, il est possible d'induire expérimentalement des formes atténuées de theilériose en administrant aux animaux de faibles doses de broyats de tiques infectées [5]. Il est de plus probable que chez les jeunes veaux l'immunité colostrale et notamment les anticorps anti-sporozoïtes représentent un facteur supplémentaire modérant les conséquences de l'infection.

A partir de la seconde saison estivale, l'immunité développée au cours des saisons précédentes se trouve régulièrement renforcée. Cependant, l'augmentation graduelle de l'infestation par les tiques de la première saison estivale aux saisons suivantes limiterait les risques de surinfection en permettant au système immunitaire de s'adapter graduellement aux infections plus lourdes auxquelles s'exposent les individus adultes.

Sur un plan pratique, l'endémie stable peut être reconnue par :

- l'apparition occasionnelle de cas subaigus de theilériose sur les jeunes en première saison estivale,
- un parasitisme élevé des adultes par les tiques *Hyalomma* en plein été (pic d'activité de *H. detritum*).

### **La situation d'endémie instable**

Ce contexte endémique est en partie illustré par l'exemple de l'étable 3 (Tableau II) où, malgré l'importance de la population de *Hyalomma detritum* trouvée sur les adultes, les jeunes en première saison estivale restent, étant donné leur moindre réceptivité, pratiquement épargnés par les tiques vectrices, dépassant ainsi le cap de la première saison estivale sans acquérir d'immunité. Au cours des saisons suivantes, ces animaux, du fait de l'augmentation du parasitisme par les tiques, seront soumis à des risques de theilériose clinique.

De plus, en fonction de l'importance du parasitisme par *H. detritum*, il est possible de reconnaître deux situations d'endémie instable :

#### ***Situation 1***

Dans ce contexte, seuls les animaux en deuxième et troisième saison estivale sont régulièrement affectés par la maladie, les animaux plus âgés étant en totalité prémunis et les individus plus jeunes très peu exposés à la tique vectrice, d'où les faibles taux de séro-conversion notés dans l'enquête n°1.

#### ***Situation 2***

Cette situation, la plus fréquente dans la région concernée par ce travail, se caractérise par une population très réduite de la tique vectrice (voir les résultats de l'enquête n°2), une séro-prévalence limitée chez les animaux les plus âgés, et l'apparition occasionnelle de theilériose, en particulier chez les individus en troisième saison estivale et plus. Chez les jeunes en première saison estivale, les risques d'infection sont pratiquement nuls.

Par ailleurs, dans ce type d'élevage, la population "péri-domestique" de *H. detritum* liée aux abris entourant l'étable, voire en dehors de l'exploitation, et éventuellement

même sur les pâturages, mérite d'être mieux étudiée. En effet, des résultats préliminaires obtenus au cours de l'été 1993 indiquent l'existence de sources de tiques de *H. detritum* entre l'étable et les pâturages.

En pratique, la situation d'endémie instable peut être reconnue ou suspectée par :

- l'apparition plus ou moins régulière de cas de theilériose sur les animaux en deuxième saison estivale et plus,
- l'existence en plein été, sur les bovins adultes, d'une population modérée (une dizaine de tiques) à faible, voire difficilement détectable de *H. detritum*.

Les résultats recueillis au cours de ces investigations épidémiologiques permettent d'adapter les actions de prophylaxie en fonction du contexte endémique :

### ***En endémie stable***

Les traitements acaricides sont à employer avec précautions, de façon à ne pas déstabiliser l'endémie de theilériose. Il est recommandé :

- de ne pas traiter les jeunes en première saison estivale, sauf lors de sortie massive des tiques à la suite de chaleurs inhabituelles (situation observée au cours de l'été 1993),
- de ne traiter les adultes que lors de parasitisme important. Compte tenu des taux d'infection de tiques observés dans ce travail, ces traitements seront à envisager au delà d'un parasitisme moyen de 10 à 20 tiques adultes par animal,
- de proscrire la lutte d'automne contre les nymphes qui, du fait de son efficacité plus élevée, risque de destabiliser l'endémie.

Enfin, la vaccination par vaccin vivant atténué, en cours de développement à l'E.N.M.V. Sidi Thabet, serait à réserver uniquement aux jeunes en première saison estivale et aux individus nouvellement acquis.

### ***En endémie instable***

Les traitements acaricides d'été seront appliqués aux bovins à partir de la seconde saison estivale suivant un calendrier adapté aux risques encourus par l'élevage. Pour les étables en endémie instable de type 1 (voir plus haut), la lutte acaricide doit obligatoirement tendre vers l'éradication du vecteur du fait des risques de glissement de l'âge à risque vers les animaux plus âgés habituellement prémunis contre la theilériose.

Enfin, dans l'éventualité d'utilisation d'un vaccin atténué, la campagne de vaccination devra toucher toutes les tranches d'âge des élevages à risque.

## **Bibliographie**

1. Burridge M.J., Brown C.G.G., Kimber C.D. (1974). *Theileria annulata* : cross reactions between a cell culture antigen and antigens of East Africa species in the Indirect fluorescent antibody test. *Exp Parasitol* ; 35 : 375-380.
2. Bouattour A., Darghouth M.E.A. (1992). Study of the *Hyalomma* ticks population on cattle and their salivary glands infection by *T. annulata* in an endemic region of Tunisia. EEC Contractant Workshops on Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology and Diagnostic Methods. 2-6 novembre 1992, Rethymo, Ile de Crète, Grèce.
3. Darghouth M.E.A. (1991). Tropical theileriosis in Tunisia : status of the disease and research being undertaken at the E.N.M.V. Sidi Thabet (Tunisia). In : D.K. Singh, B.C. Varshney Eds

*Proceedings of the second E.E.C. Workshop on Orientation and Coordination on Tropical Theileriosis.* N.D.D.B., Anand, Inde.

4. Darghouth M.E.A., Bouattour A., Ben Miled L., Kilani M. (1992). Results of a sero-epidemiological survey on tropical theileriosis on 54 farms in the region of Sidi Thabet (Tunisia). EEC Contractant Workshops on Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology and Diagnostic Methods. 2-6 novembre 1992, Rethymo, Ile de Crête, Grèce.
5. Dolan T.T., Young A.S., Losos G.J., Mc Millian I., Minder C.E., Soulsby K. (1984). Dose dependant responses of cattle to *Theileria parva* stabilate. *Intern J Parasit* ; 14 : 89-95.

## 9

# **Identification d'un antigène cytoplasmique de bas poids moléculaire de *Brucella* potentiellement utilisable pour le diagnostic allergique de la brucellose**

PH.A.. DENOEL\*, M.S. ZYGMUNT\*\*, V.E. WEYNANTS\*, A. TIBOR\*,  
G. DUBRAY\*\*, J.N. LIMET\*, J.J. LETESSON\*

\* *Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, Namur, Belgique.*

\*\* *Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, INRA, Nouzilly, France.*

### **Résumé**

*Au cours du fractionnement du CPE (mélange de protéines cytoplasmiques de *Brucella*) sur séphacryl S-200 en présence de 0,1% SDS, une fraction (F56) a été obtenue. Cette fraction contient quatre ou cinq protéines dont une protéine majeure dans la zone présentant le maximum d'activité en T cell blotting. L'injection intradermique de cette fraction chez le cobaye infecté engendre une réaction très proche de celle engendrée par le brucellergène (Rhône-Mérieux) à la même dose. Les différentes bandes protéiques observées en SDS-PAGE ont été découpées et les protéines des fractions obtenues ont été éluées du gel d'acrylamide. Les protéines des fractions ont été testées pour leur capacité à engendrer une réaction cutanée chez le cobaye infecté. La fraction contenant la protéine majeure de la F56 engendre une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) de même intensité que le brucellergène complet à la même dose, alors que les autres fractions*

*engendrent des réactions plus faibles voire nulles. Des tests préliminaires effectués chez le cobaye infecté par Yersinia enterocolitica O:9 tendent à montrer la spécificité de cette protéine.*

La brucellose bovine et des petits ruminants due respectivement à *Brucella abortus* et à *B. melitensis* affecte directement la rentabilité de l'exploitation touchée en causant des avortements chez les animaux gestants, mais aussi en provoquant la stérilité et d'autres problèmes cliniques plus ou moins graves chez beaucoup d'animaux infectés.

Actuellement, le diagnostic de la brucellose repose principalement sur les résultats des épreuves sérologiques (détection dans le sang ou le lait des anticorps spécifiques du lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella*). L'utilité de la révélation d'une réponse immunitaire cellulaire de type hypersensibilité de type IV ou retardée (HSR) comme test complémentaire des tests classiques et de l'ELISA a clairement été démontrée [7,12]. Des animaux infectés d'un foyer peuvent présenter une sérologie négative, même en ELISA et un test allergique (IDR) positif et vice versa. Le test cutané détecte précocement l'infection et est à l'heure actuelle le plus spécifique.

Cependant, si le test cutané à l'aide du brucellergène (préparation de protéines cytoplasmiques, Rhone-Mérieux) s'avère très utile, il reste des améliorations à y apporter. En effet, citons entre autres que la souche B115 utilisée pour la préparation de l'allergène n'est pas dépourvue de chaîne O (partie spécifique du LPS de *Brucella*) [4].

L'identification et la production par génie génétique des protéines de *Brucella* les plus actives pour le diagnostic allergique de la brucellose permettrait d'augmenter l'intensité de la réaction et la sensibilité du test et en faciliterait la standardisation.

De plus, la distinction entre animaux infectés et vaccinés n'est, à l'heure actuelle, toujours pas possible. En effet, le LPS très immunogène, semble être le meilleur antigène de diagnostic sérologique et avoir des propriétés vaccinales [5,6,8,11]. Sa présence semble donc nécessaire à l'efficacité d'un vaccin. Des tests préliminaires tendent à montrer que le diagnostic sérologique basé sur les protéines ne permettrait pas la détection de tous les animaux infectés car un certain nombre d'entre eux ne produisent que très peu ou pas d'anticorps contre les protéines. Par contre un test de diagnostic allergique par IDR utilisant un ou plusieurs allergènes protéiques absents de la fraction ou de la souche vaccinale pourrait permettre de faire la distinction entre des animaux infectés et des animaux vaccinés.

Signalons enfin qu'il a été montré que les protéines cytoplasmiques de *Brucella* se trouvant dans la zone de masse moléculaire 10-20 kDa présentent le maximum d'activité en T cell blotting avec des cellules de sang périphérique de bovins infectés [3,14]. Cette zone pourrait donc contenir des allergènes potentiels pour le diagnostic de la brucellose.

L'approche que nous avons choisi pour l'identification des protéines actives est l'intradermoréaction sur cobayes infectés par *Brucella abortus* 544.

## Méthodologie

### Souche bactérienne

Les bactéries de phénotype rugueux ont été obtenues à partir d'un isolat *B. melitensis* B115 d'une chèvre infectée de terrain [1]. Elles ont été cultivées dans un fermenteur de 20 litres selon la méthode de l'U.S. Department of Agriculture [2]. Les cultures sont réalisées en milieu tryptic soy broth (BioMérieux, France) supplémenté avec 0,1% de yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) pendant 48h à 37°C.

### Infection expérimentale des cobayes

Les cobayes ont été infectés par injection de  $1,8 \cdot 10^6$  *Brucella abortus* 544 par voie sous-cutanée. Une semaine avant l'infection (contrôle négatif) et un mois après l'infection (contrôle de l'infection), les animaux sont testés par injection intradermique de 5 µg de brucellergène. Un second lot de cobayes a été infecté par injection de  $10^6$  *Yersinia enterocolitica* 0:9 (souche du terrain) par voie intrapéritonéale. Un mois après l'infection, l'excrétion de bactéries dans les fèces a été contrôlée.

### Intradermoréaction sur cobayes infectés

Les cobayes utilisés sont des animaux infectés au même moment et donc infectés depuis 2 à 6 mois en fonction de la date de l'IDR. Les cobayes ont préalablement été tondu sur les deux flancs. Au maximum, quatre injections par flanc ont été effectuées. Les injections ont été faites avec un volume de 100 µl. Les mesures d'épaisseur de pli de peau ont été réalisées à l'aide d'un Palmer. La variation d'épaisseur de pli de peau est donnée par la différence entre l'épaisseur au temps de la mesure et l'épaisseur mesurée avant l'injection.

### Préparation du CPE

Le CPE [15,16] de *B. melitensis* B115 a été préparé en cassant les cellules avec des billes de verre dans un appareillage Dyno-Mills (Bachofen, Basel, Suisse) puis en les ultrafiltrant sur cartouche de seuil 0,1µm (Amicon, Grace S.a.r.l, Epernon, France). L'ultrafiltrat a été traité ensuite à la DNase et à la RNase (Worthington Diagnostics, Freehold, N.J.) puis soumis à une seconde ultrafiltration sur cartouche de seuil 100kDa (Amicon). Le rétentat a été centrifugé à 50000xg pendant 16h et enfin, le surnageant (CPE) a été lyophilisé.

### Préparation de la F56

Le CPE a été déposé sur une colonne Sephacryl S200 HR en présence de bicarbonate d'ammonium 0,1M et de 0,1% SDS. Le second pic d'éluion de la colonne (absorbance à 280nm) correspond à la F56.

## **SDS-PAGE**

Les gels d'acrylamide SDS-PAGE ont été réalisés selon la méthode décrite par Laemli [9]. Les antigènes ont été solubilisés en conditions réductrices dans le tampon d'échantillon (62,5mM Tris, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0,01% bleu de bromophenol, pH 6,8) par chauffage à 100°C de 3min. Le standard de poids moléculaire utilisé est un mélange de protéines allant de 66 à 14,2kDa (Bio-Rad). Les gels ont été colorés à l'argent [10] pour la détection des protéines.

## **Immunoblotting**

Le transfert électrophorétique des protéines du gel sur une feuille de nitrocellulose a été réalisé selon la méthode classique décrite par Towbin *et al.* [13]. Après transfert, la feuille de nitrocellulose a été incubée 1 h en TBS-BSA 3% puis 3 h avec l'anticorps monoclonal dilué 500X en TBS-BSA 1%-Tween 20 0,05%. La nitrocellulose a été ensuite lavée trois fois en TBS-BSA 1% puis incubée 1 h avec le conjugué "Rabbit anti-Mouse Alkaline Phosphatase" (Amersham, U.K.) dilué 500X en TBS-BSA 1%-Tween 20 0,05%. Après trois lavages en TBS-BSA 1%, la réaction de coloration a été réalisée en tampon Tris 0,2M, MgCl<sub>2</sub> 4mM avec 6mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP-Sigma) et 10mg de sel nitro blue tetrazolium (NBT-Sigma) par 100ml de tampon. La feuille a été ensuite lavée en eau distillée puis séchée.

## **Elution des protéines séparées par SDS-PAGE**

Après migration, le gel a été découpé en bandelettes qui après avoir été broyées, ont été déposées chacune séparément dans 2ml de tampon PBS, azide 0,01%, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF-Sigma) 0,2mM et EDTA 5mM. Après 24 h d'agitation, les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 10000rpm et le surnageant qui contient les protéines a été récupéré. Le surnageant a été ensuite dialysé contre le tampon d'éluion afin d'éliminer la majeure partie du SDS.

## **Dosage des protéines par "scanning"**

Les fractions de protéines éluées du gel SDS-PAGE ont été déposées sur un gel SDS-PAGE afin de vérifier la bonne séparation. La référence consistait en 1 et 4µg de cytochrome C ayant migré en parallèle sur ce même gel, qui a été ensuite coloré à l'argent. Les "scannings" ont été réalisés avec un scanner Visage 110 relié à une station Sun OS. L'analyse a été effectuée avec le logiciel Bio Image Electrophoresis Analyser version 4.6B et au sein de celui-ci, le logiciel WholeBand 2.4 (Millipore Corporation, Bedford, MA).

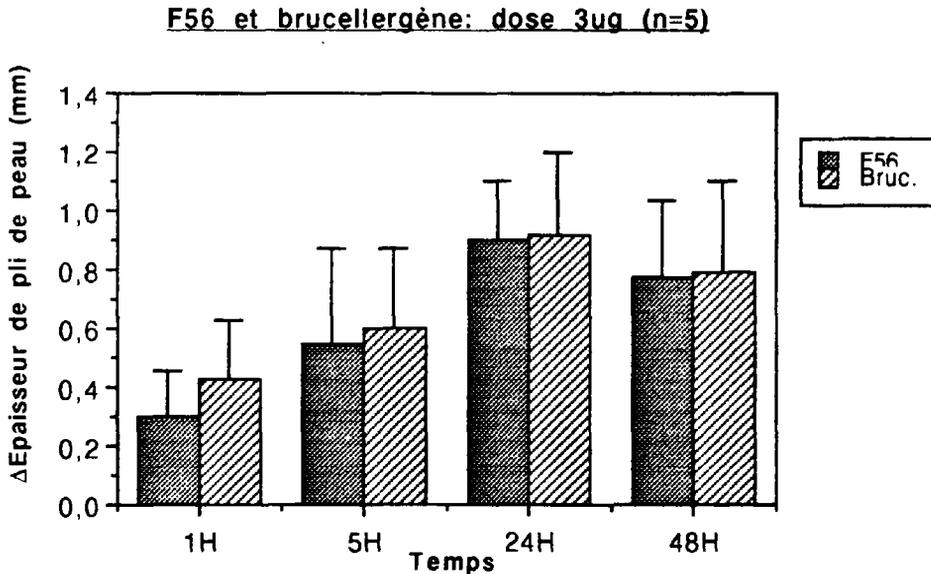
## Résultats

### Composition de la F56

Au cours du fractionnement du CPE (mélange de protéines cytoplasmiques de *Brucella*) sur Sephacryl S-200 en présence de 0,1% SDS, une fraction (F56) a été obtenue. Cette fraction contient quatre ou cinq protéines dont une protéine majeure dans la zone de masse moléculaire, présentant le maximum d'activité en T cell blotting (10-30kDa).

### Test cutané de la fraction protéique F56 sur cobayes infectés

Le test de l'activité de la fraction F56 a été effectué par injection intradermique d'un volume de 100 $\mu$ l de PBS contenant 3, 1 et 0,3 $\mu$ g de F56 à 5 cobayes infectés. Les doses correspondantes en brucellergène ont été injectées dans le même volume. Un contrôle négatif 100 $\mu$ l de PBS a également été injecté à chaque cobaye. Les sites d'injection ont été permutés d'un cobaye à l'autre. Les mesures de variation d'épaisseur de pli de peau ont été effectuées 1, 5, 24 et 48h après l'injection. Les résultats de ces mesures pour la dose 3 $\mu$ g sont présentés à la Figure 1.



**Figure 1.** Mesures de la variation d'épaisseur de pli de peau en fonction du temps. Comparaison des réactions engendrées par la fraction F56 et le brucellergène.

On constate que les réactions d'HSR engendrées avec la F56 sont très proches de celles engendrées par le brucellergène injecté à la même dose (3 $\mu$ g). Aux plus faibles doses, principalement 0,3 $\mu$ g, le brucellergène semble légèrement plus actif.

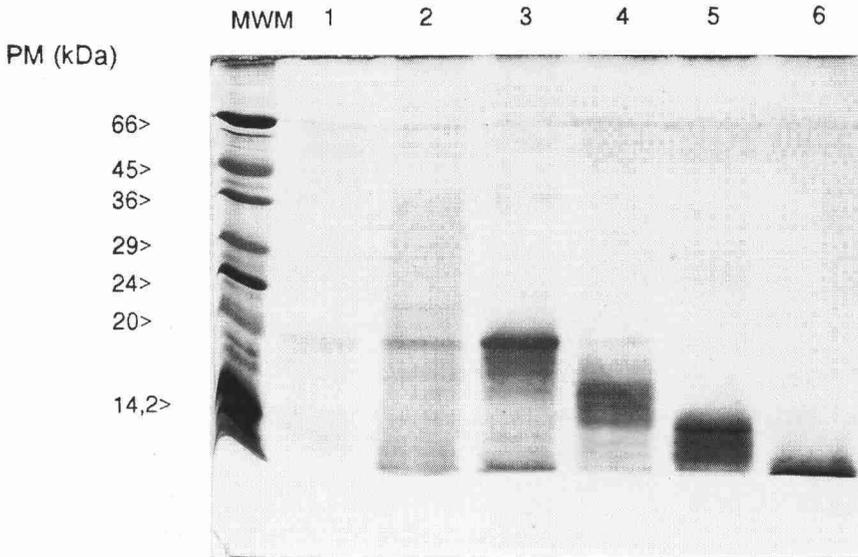


Figure 2. Les six fractions de la F56 après séparation électrophorétique sur un gel SDS-PAGE 16%.

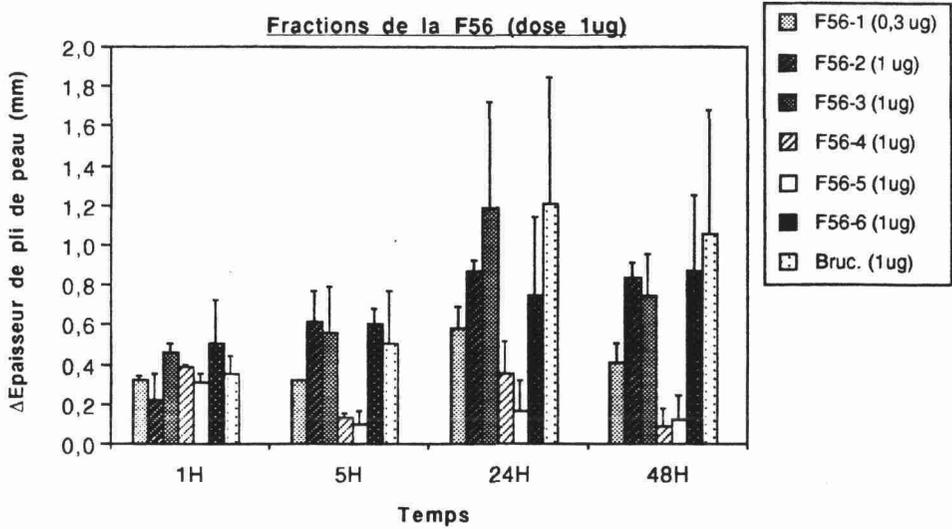


Figure 3. Mesures de la variation d'épaisseur de pli de peau en fonction du temps. Comparaison des réactions engendrées par les différentes fractions de la F56 et le brucellergène.

## **Fractionnement de la F56**

Afin d'identifier la ou les protéines de cette fraction ayant la capacité d'engendrer cette réaction d'HSR, nous avons par SDS-PAGE, séparé en 6 fractions les protéines composant la F56.

Environ 200 µg de F56 ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 16%. Après migration, une piste centrale du gel et la piste contenant les marqueurs de PM ont été découpées et colorées rapidement au bleu de Coomassie. Les bandes protéiques mises en évidence par cette coloration, ont été découpées du gel non coloré et chaque languette de polyacrylamide (6 fractions) a été placée dans 2 ml de PBS (+azide, EDTA et PMSF) pour trois jours, avec agitation, pour permettre la diffusion libre hors du gel des protéines de chaque fraction.

Le surnageant de la diffusion libre des protéines a été concentré au Speed Vac jusqu'à un volume de 500 µl. Cent microlitres de chacune des 6 fractions ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 16%. La Figure 2 montre ce gel coloré à l'argent.

On remarque que la fraction 2 et principalement la fraction 3 contiennent l'antigène de 19 kDa. La fraction 6 ne contient que le front de migration du gel. Chaque fraction a été dosée par "scanning" du gel coloré à l'argent.

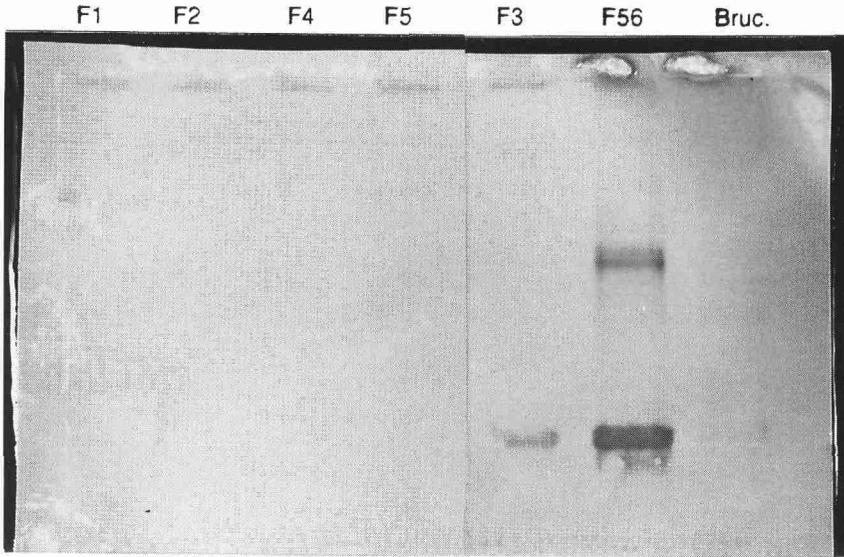
## **Etude de l'activité des différentes fractions de la F56**

Les 6 fractions de la F56 ont été injectées chacune à 6 cobayes infectés par *Brucella* à la dose estimée de 1 µg (sauf pour la fraction 1 injectée à 0,3µg). En parallèle, du brucellergène à la dose correspondante ainsi que 100 µl de surnageant de la diffusion libre d'une languette de gel vierge ont été injectés. Les mesures d'épaisseur de pli de peau ont été effectuées 1, 5, 24 et 48 heures après l'injection (Figure 3). L'injection de 100 µl de tampon de "running gel", de la fraction 6 (correspondant au front de migration) ou de la fraction équivalente (front de migration) d'un gel vierge engendrent le même type de réaction. Une heure après l'injection, on observe l'apparition d'une induration importante au site d'injection suivie 5 à 24 heures plus tard d'une nécrose des tissus. Cette réaction est probablement non spécifique de l'infection et due à du SDS présent en quantité plus importante dans ces fractions et insuffisamment éliminé par dialyse.

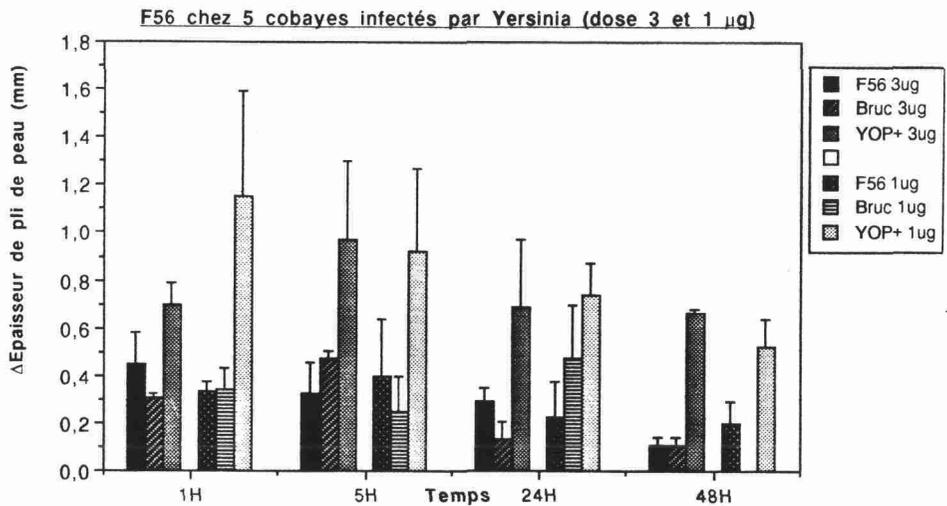
On constate que la fraction 2 et surtout la fraction 3 engendrent des réactions proches de celles observées avec le brucellergène ou avec la F56 complète. Les fractions 1, 4 et 5 engendrent des réactions faibles proches de celles observées avec le surnageant de la diffusion libre d'une languette de gel vierge.

La fraction 2 et principalement la fraction 3 contiennent l'antigène majeur de la F56. Cet antigène semble donc être un bon candidat pour le diagnostic cutané de la brucellose.

Nous disposons en outre d'un anticorps monoclonal (297C3) reconnaissant l'antigène majeur de la F56. La Figure 4 montre le résultat d'un immunoblotting avec les différentes fractions de la F56, la F56 entière et le brucellergène. On remarque que l'anticorps monoclonal reconnaît la protéine de 19 kDa de la fraction F56-3. Remarquons aussi que l'antigène de 19 kDa est peu présent dans le brucellergène.



**Figure 4.** Immunoempreinte des fractions de la F56, de la F56 complète et du brucellergène (lot 26N151). Détection de la protéine de 19kDa par l'anticorps monoclonal 297C3.



**Figure 5.** Mesures de la variation d'épaisseur de pli de peau en fonction du temps. Comparaison des réactions engendrées par la F56, le brucellergène et une préparation de YOP chez les cobayes infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9.

## Etude de la spécificité de la protéine majeure de la F56

Afin de vérifier la spécificité de la F56 et donc de l'allergène de 19 kDa, nous avons injecté cet allergène à 5 cobayes infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9 à la dose 3 et 1 µg en parallèle à du brucellergène et à une préparation de protéines secrétées de *Yersinia* (YOP). Les résultats de ces injections sont présentés à la Figure 5.

On remarque que la F56 engendre des réactions faibles voire nulles aux deux doses et de plus, la cinétique de ces réactions faibles ne présente pas de maximum à 24 heures caractéristique de la réaction d'hypersensibilité retardée.

L' allergène F56 ne détecte donc pas des cobayes infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9 ni des animaux non infectés par *Brucella* (résultats non présentés).

## Présence de la protéine majeure de la F56 dans toutes les souches de *Brucella*

L' anticorps monoclonal 297C3 reconnaît spécifiquement la protéine de 19 kDa (voir plus haut). Par la technique de Western Blotting, nous avons vérifié la présence de l' antigène de 19 kDa dans 31 souches de *Brucella*. La Figure 6 montre que l' anticorps monoclonal reconnaît une protéine d' environ 19 kDa dans toutes les souches de *Brucella*.

Notons toutefois que cette protéine semble peu présente chez *Brucella suis* biovar 2, 4 et 5 ainsi que chez *Brucella neotomae*. Remarquons aussi qu' une bande supplémentaire d' environ 35-40 kDa est reconnue par le monoclonal dans les souches *Brucella abortus* 45/20, *Brucella melitensis* H38R et *Brucella melitensis* B115 qui sont toutes trois des souches de phénotype R (rugueux).

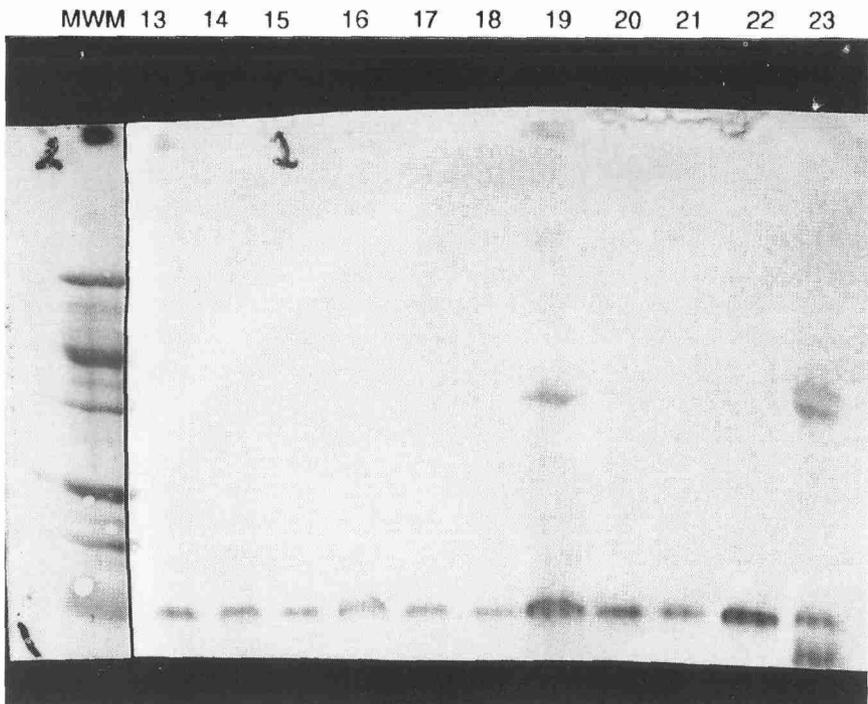
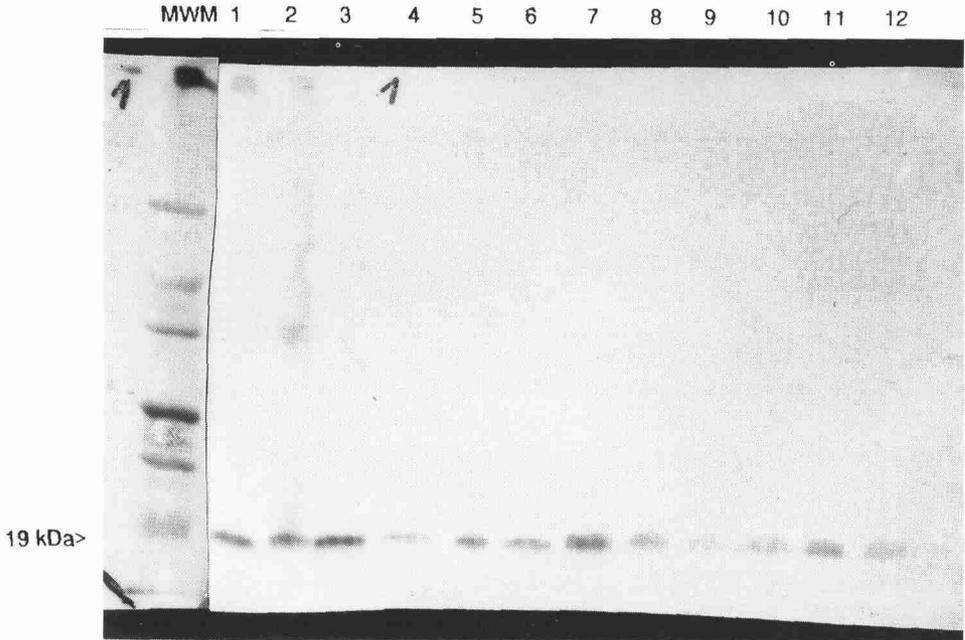
## Discussion

La fraction F56 obtenue par séparation sur colonne Sephacryl S200 HR en présence de 0,1% SDS engendre chez le cobaye infecté des réactions cutanées (IDR) proches de celles engendrées par le brucellergène à la même dose. Cette fraction, composée d' une protéine majeure et de quatre ou cinq protéines contaminantes, se trouve dans la zone présentant le maximum d' activité en T cell blotting avec des cellules de sang périphériques de bovins infectés [14] et 10).

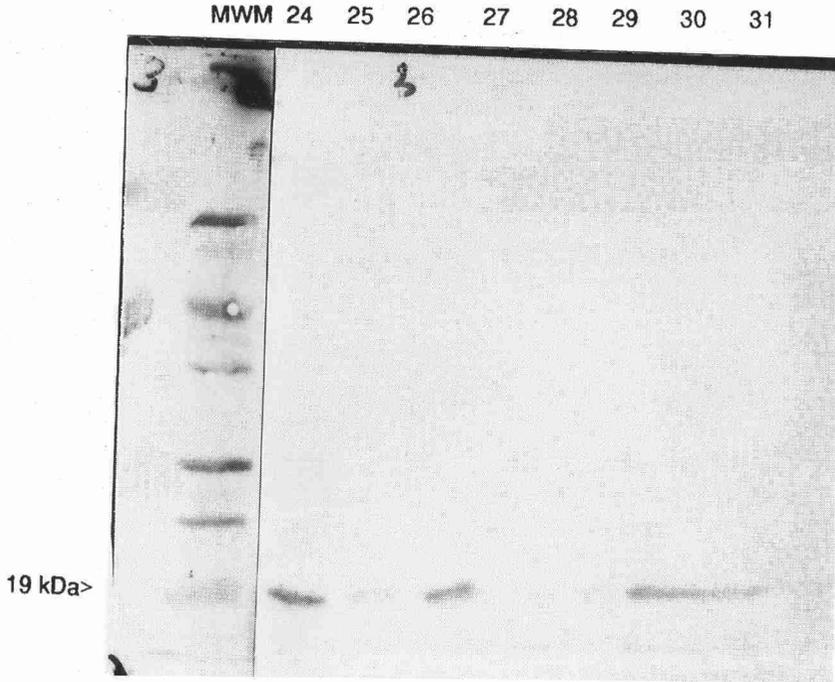
Nous avons testé l' activité de 6 fractions de cette F56 obtenues par séparation des protéines sur SDS-PAGE, découpe des bandes observées et élution des protéines de chaque fraction. De ce test d' activité, il ressort que la protéine majeure de cette fraction engendre à elle seule des réactions cutanées chez le cobaye infecté comparables à celles engendrées par le brucellergène injecté à la même dose. De plus, cet allergène n' induit aucune réaction quand il est injecté à des cobayes sains ou infectés par *Y. enterocolitica* O:9 ce qui tend à montrer sa spécificité.

Nous avons donc identifié une protéine qui possède la capacité d' engendrer des réactions cutanées d' intensité comparables aux réactions engendrées par le mélange d' une vingtaine de protéines cytoplasmiques qu' est le brucellergène.

Cette protéine est exprimée de manière plus ou moins importante par toutes les espèces de *Brucella* comme le montre le résultat d' un immunoblotting réalisé avec un anticorps monoclonal spécifique de cette protéine et des extraits d' une trentaine de souches de référence et de terrain de *Brucella* représentant cinq espèces répertoriées. Une ou deux bandes supplémentaires de 39-40kDa sont révélées par l' anticorps dans les trois souches



Identification d'un antigène cytoplasmique de bas poids moléculaire de *Brucella*



Piste	Espèce	Biovar	Souche	Reconnaissance par l'AC
1	<i>abortus</i>	1	544	+++
2	<i>abortus</i>	rough	45/20	+++ et 2 bandes de 40 kDa
3	<i>abortus</i>	2	86/8/59	+++
4	<i>abortus</i>	3	Tulya	++
5	<i>abortus</i>	4	292	+++
6	<i>abortus</i>	5	B3196	+++
7	<i>abortus</i>	6	870	+++
8	<i>abortus</i>	6	80-236	++
9	<i>abortus</i>	6	89-43	+++
10	<i>abortus</i>	9	C68	+++
11	<i>abortus</i>	9	75-60	+++
12	<i>abortus</i>	9	76-299	+++
13	<i>abortus</i>	9	77-9	+++
14	<i>abortus</i>	9	80-133	+++
15	<i>abortus</i>	9	87-46	+++
16	<i>abortus</i>	9	90-64	+++
17	<i>abortus</i>	9	91-28	+++
18	<i>abortus</i>	9	91-135	+++
19	<i>melitensis</i>	rough	H38	+++ et 1 bande de 40 kDa
20	<i>melitensis</i>	1	16M	+++
21	<i>melitensis</i>	2	63/9	+++
22	<i>melitensis</i>	3	Ether	+++
23	<i>melitensis</i>	rough	B115	+++ et 2 bandes de 40 kDa
24	<i>suis</i>	1	1330	+++
25	<i>suis</i>	2	Thomsen	++
26	<i>suis</i>	3	686	+++
27	<i>suis</i>	4	40	+/-
28	<i>suis</i>	5	513	+/-
29	<i>ovis</i>		Bow 63-290	+++
30	<i>canis</i>		RM-6/6	+++
31	<i>neotomae</i>		5K33	+

**Figure 6.** Immunoempreinte avec des extraits totaux de différentes souches de *Brucella*. Détection de la protéine de 19kDa par l'anticorps monoclonal 297C3.

de phénotype rugueux que nous avons utilisées dans ce test. Ne connaissant pas la fonction de cette protéine de 19 kDa chez *Brucella*, il nous est impossible à l'heure actuelle d'expliquer cette observation. Nous pouvons cependant supposer que dans ces souches, la protéine serait présente sous forme de dimères ou serait associée à une autre protéine.

Le clonage du gène codant pour cette protéine est en cours. La production de la protéine recombinante devrait nous permettre de réaliser une évaluation de son activité chez le bovin et donc de confirmer son utilité pour le diagnostic cutané de la brucellose bovine.

## Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce à une bourse de spécialisation accordée par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A n° 910622).

## Références

1. Alton G.G., Corner L.A. (1981). Vaccination of heifers with a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19 vaccine before first mating. *Aust Vet J.*; 57 : 548-550.
2. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
3. Brooks-Worrel B. M., Splitter G.A. (1992). Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one- and two-dimensional cellular immunoblotting. *Infect Immun* ; 60 : 2459-2464.
4. Cloeckeaert A., Zygmunt M.S., Nicolle J-C., Dubray, G. Limet J.N. (1992). O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115 : induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Gen Microbiol* ; 3 : 1455-1459.
5. Dubray G., Plommet M. (1975). Structure et constituants des *Brucella*. Caractérisation des fractions et propriétés biologiques. International Symposium on Brucellosis (II) Rabat (1975), Dev Biol Stand ; 31 : 68-91 (S. Krager, Basel 1976).
6. Dubray G., Bosseray N., Plommet M. (1974). Propriétés vaccinales de fractions de *Brucella*. *C R Acad Sci Paris* ; 279D : 1805-1808.
7. Fensterbank R. (1977). Diagnostic allergique de la brucellose bovine. 2. Utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés. *Ann Rech Vet* ; 8 : 195-201.
8. Jimenez de Bagües M.P., Marrin C.M., Barberàn, Blasco J.M. (1993). Evaluation of vaccines and of antigen therapy in amouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine* ; 11 : 61-66.
9. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* ; 227 : 680-685.
10. Oakley B.R., Kirsch D.R., Morris, N.R. (1980). A simplified ultra sensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* ; 105 : 361-363.
11. Plommet M., Plommet A.M. (1983). Immune serum-mediated effects on brucellosis evolution in mice. *Infect Immun* ; 4 ; 97-105.
12. Saegerman C. Communication personnelle.
13. Towbin H., Stacklin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 76 : 4350.
14. Vo K. Communication personnelle.
15. Zygmunt M.S., Martin J.C., Dubray G. (1990). Analysis of the immune response : comparison

of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extract from *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett* ; 70 : 263-268.

16. Zygmunt M.S., Gilbert F.B., Dubray G. (1992). Purification, characterization and seroactivity of a 20-kDa *Brucella* protein antigen. *J Clin Microbiol* ; 30 : 2662-2667.



# 10

## **Situation actuelle de l'immunité naturelle vis-à-vis du virus de la fièvre de la vallée du Rift chez les ruminants domestiques du Sénégal**

Y. THIONGANE\*, M.M. LO\*, H. ZELLER\*\*, J.A. AKAKPO\*\*\*

\* *Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires de Dakar-Hann (LNERV), Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Dakar, Sénégal.*

\*\* *Institut Pasteur de Dakar, Sénégal.*

\*\*\* *Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV), Dakar, Sénégal.*

### **Résumé**

*Depuis que la fièvre de la vallée du Rift s'est manifestée pour la première fois, en octobre-décembre 1984, dans le Delta du fleuve Sénégal, une surveillance clinique et sérologique des ruminants domestiques (ovins, caprins et bovins) est mise en place.*

*Les anticorps sériques spécifiques au virus de la FVR sont recherchés par les tests de séroneutralisation et ELISA (IgG et IgM).*

*Nous présentons les résultats les plus récents du suivi post épi-zootique réalisé dans différentes zones écologiques du Sénégal (du Nord au Sud) :*

*D'abord, la vallée du fleuve Sénégal (zones d'irrigation en climat sahélien) où la FVR a sévi en 1987. Elle est considérée comme la zone à risque, et est la plus anciennement surveillée (depuis 1988). Le suivi a montré une période de silence post-épi-zootique dans les*

*troupeaux d'animaux sentinelles. Cette situation s'est traduite par le fait qu'aucun cas clinique n'a été décelé, mais aussi que la séroprévalence n'a cessé de baisser d'année en année dans cette vallée. Chez les petits ruminants, la séroprévalence est revenue à son niveau d'avant épizootie : 5% de positifs en 1991 (N=600, X=30) et 4% en 1992 (N=271, X=11). Chez les bovins, la baisse de prévalence est moins forte et est de 23,56% en 1991 (N=450, X=106). Ainsi, dans cette zone à risque, les petits ruminants, réputés très sensibles au virus, sont redevenus totalement réceptifs.*

*Ensuite, le Ferlot (climat sahélien, pluviométrie inférieure à 600 mm, zone de transhumance pour le cheptel de la vallée du fleuve Sénégal) : les petits ruminants y sont plus infectés que ceux de la vallée : 7,5% de séropositifs en 1992 (N=120, X=09). Cette zone du Ferlo, bien pourvue en mares temporaires, apparaît comme un endroit favorable de maintien du virus entre les périodes d'épizooties. Il en résulterait des risques de foyer de FVR dans la vallée du fleuve Sénégal, par réintroduction du virus à partir de ce foyer du Ferlo.*

*Enfin, la partie australe du pays, notamment en Casamance et à Kédougou (climat guinéen, pluviométrie supérieure à 1000 mm), où les petits ruminants, avec 1% de séropositifs en 1992, semblent les moins infectés du pays. Les bovins présentent une séroprévalence pouvant s'élever jusqu'à 12% en 1992 pour la région de Kolda.*

*Les différences constatées entre les zones écologiques, les modes d'élevage, les espèces animales et leurs conséquences sur l'évolution de la FVR sont discutés.*

La fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une zoonose due à un virus de la famille des *Bunyaviridae*, appartenant au groupe des *Phlébovirus*.

Depuis 1910, date de la première description, la FVR a sévi dans pratiquement toutes les zones écologiques du continent africain.

Mais, c'est en 1987 que l'Afrique de l'Ouest entre dans l'aire d'activité du virus de la FVR, avec le foyer survenu dans la vallée du fleuve Sénégal, autour de la ville de Rosso, en Mauritanie. Ce foyer fut caractérisé par une forte mortalité des jeunes animaux, et aussi, par un fort taux d'avortement chez les femelles gravides. De plus, la population humaine a été très fortement touchée.

Au Sénégal, depuis cette première épizootie, aucun cas clinique n'a été signalé, ce qui laisse à penser à une phase de silence post épizootique, comme cela est décrit classiquement. Toutefois, l'éventualité que le virus puisse circuler, à bas bruit, doit rester à l'esprit. Elle constitue une des conditions du maintien du virus dans la nature. En raison des résurgences possibles de l'activité virale, un programme de surveillance sérologique a été instauré par le suivi de l'état immunitaire du cheptel des zones enzootiques.

La présente étude fait le point des enquêtes sérologiques menées en 1991 et 1992 chez les ruminants domestiques du Sénégal.

## **Matériels et méthodes**

### **Les zones d'études**

Les enquêtes sérologiques ont été menées dans les trois principales zones écologiques du Sénégal. Ces zones sont, du Nord au Sud :

#### ***La zone sahélienne***

C'est la zone la plus sèche du pays, car la pluviométrie ne dépasse pas 400 mm/an dans le Nord du Sénégal. La saison des pluies dure 3 mois. Elle englobe la vallée du fleuve Sénégal, les parties septentrionale et centrale de la zone sylvopastorale et du bassin arachidier.

#### ***La zone soudanienne***

La saison des pluies, un peu plus longue, dure 4 à 5 mois, avec des précipitations allant de 650 mm/an (au nord sous influence sahélienne) à 900 mm/an au sud. C'est la zone des savanes plus ou moins arborées. Elle comprend les parties méridionales de la zone sylvopastorale et du Bassin arachidier et les Iles du Saloum. Les populations s'adonnent à la fois à l'agriculture et à l'élevage.

#### ***La zone guinéenne***

La saison des pluies est de 5 mois, mais la pluviométrie est importante (1500 mm/an). Cette zone est caractérisée par une forêt dense semi-sèche. Elle concerne la Casamance et la partie sud du Sénégal oriental. L'élevage concerne exclusivement les races trypanotolérantes et s'y pratique selon le mode sédentaire.

### **Les animaux étudiés**

Les prélèvements de sang concernent les ruminants domestiques, notamment les petits ruminants et les bovins. Pour chaque animal prélevé, l'espèce, l'âge et le sexe sont mentionnés. L'âge est déterminé par l'état de la denture. Au niveau de chaque site ou troupeau, un échantillon représentatif d'animaux est prélevé.

#### ***En zone sahélienne***

##### ***Dans la vallée du fleuve Sénégal***

Les animaux appartiennent à des éleveurs peuls qui pratiquent un élevage traditionnel extensif avec de la transhumance vers le sud (le Ferlo) en saison sèche. Les sites de prélèvement, au nombre de 9, sont répartis entre les trois parties du Bassin versant du fleuve Sénégal : la Basse vallée ou le Delta, le cours moyen et le cours supérieur. Les petits ruminants ont été suivis sérologiquement et cliniquement depuis 1988 [4]. Le nombre de petits ruminants prélevés est de 600 en 1991, et 274 en 1992. Chez les bovins, la surveillance a débuté en 1990 [3]. En 1991, 503 bovins ont été saignés pour toute la vallée du Sénégal, alors qu'en 1992, seuls 103 bovins du Delta Sénégal ont fait l'objet de prélèvements.

*Dans le Ferlo ou zone sylvopastorale*

C'est le domaine de l'élevage par excellence du pays, et c'est surtout la zone de transhumance pour le cheptel de la vallée du fleuve Sénégal. En 1992, 120 petits ruminants provenant de 4 troupeaux vivant ou en transhumance dans la zone d'influence du Forage de Barkédji ont été étudiés.

*En zone soudanienne*

*Dans le bassin arachidier*

En 1991, 479 bovins de race zébu Gobra, répartis entre 14 sites, ont été prélevés dans le département de Gossas (région de Fatick).

*Dans les Iles du Saloum*

En 1992, 11 sites ont été visités dans le département de Foundiougne (Iles du Saloum). 378 prélèvements de sang ont été obtenus chez les bovins de race taurine Ndama.

*En zone guinéenne*

De 1991 à 1992, des enquêtes sérologiques ont été réalisées, aussi bien chez les petits ruminants que chez les bovins.

Chez les bovins de race taurine, seules les régions de Kolda et Tambacounda ont été étudiées. En 1991, 227 prélèvements ont été obtenus de 6 sites dans le département de Vélingara (Kolda), et 503 prélèvements de 13 sites dans le département de Tambacounda.

En 1992, 318 bovins Ndama ont été saignés à partir de 10 sites dans le département de Kédougou (Tambacounda) contre 607 prélèvements de 17 sites dans le département de Sédhiou (Kolda).

Chez les petits ruminants de race naine, les trois régions de cette zone climatique ont été visitées en 1992. Les prélèvements réalisés ont été de 126 pour la région de Ziguinchor, de 170 pour la région Kolda, et 191 pour Tambacounda.

**Les tests sérologiques**

*La séroneutralisation (SN)*

Les sérums sont testés par l'épreuve d'inhibition de l'effet cytopathogène du virus de la FVR (souches SMITHBURN) sur culture de cellules Véro. Les sérums positifs sont ceux qui neutralisent 100 DCP<sub>50</sub> du virus à la dilution 160.

*Le test ELISA*

Ce test est effectué par l'Institut Pasteur de Dakar. Il permet de détecter les anticorps de classe G et M dans les sérums déjà testés en SN. Il utilise comme antigène viral la souche humaine (MAUR 2).

## Résultats et discussion

### Evolution de la séroprévalence dans la vallée du fleuve Sénégal

#### *Chez les petits ruminants*

En 1991, la prévalence en anticorps neutralisants le virus de la FVR est de 5% (N=600, X=30), alors que celle de 1992 se situe à 4% (N=274, X=11). Ainsi, on constate qu'entre 1991 et 1992, la diminution progressive de la séropositivité, déjà constatée depuis 1988, s'est poursuivie dans la vallée du fleuve Sénégal (Tableau I).

**Tableau I.** Séroprévalence en anticorps anti FVR chez les petits ruminants de la vallée du fleuve Sénégal depuis l'épizootie de 1987.

	1988	1989	1990	1991	1992
Basse vallée ou Delta	39/28 (71,7)	159/38(23,8)	105/09(08,5)	190/198(09,4)	111/07(06,3)
Cours moyen	172/37(21,5)	115/18(15,6)	259/26(08,9)	210/10(04,7)	102/04(03,9)
Cours supérieur	92/09(09,7)	457/08(14,0)	231/04(01,7)	200/02(1,00)	61/00(0,00)
Total	303/74(24,4)	331/64(19,3)	595/39(06,5)	600/30(5,00)	274/11(04,0)

La séropositivité notée en 1992 est très liée à l'âge des animaux étudiés : 72,7% des animaux porteurs d'anticorps ont plus de quatre ans d'âge (avec huit incisives adultes). Les jeunes adultes, de 2 à 6 dents adultes, sont essentiellement séronégatifs.(Tableau II). En fait, les animaux séropositifs sont ceux qui ont été infectés lors de l'épizootie de 1987 et leurs produits qui possèdent des anticorps maternels.

**Tableau II.** Evolution post-épizootique de la séroprévalence en anticorps anti FVR chez les petits ruminants de la vallée du fleuve Sénégal en fonction des classes d'âge.

	1989	1991	1992
Dents de lait	115/09(07,8)	196/02(1,0)	69/02(02,8)
2 dents adultes	43/05(11,6)	66/00(0,00)	26/01(03,8)
4 dents adultes	19/02(10,5)	82/01(01,2)	38/00(0,00)
6 dents adultes	34/06(17,6)	48/01(02,0)	49/00(0,00)
8 dents adultes	120/42(35)	208/26(12,5)	92/08(08,6)
Total	331/64(19,3)	600/30(05,0)	274/11(04,0)

La prévalence en anticorps anti virus de la FVR baisse au fur et à mesure que l'on remonte le cours du fleuve. En 1992, l'évolution est la suivante : 6,3% (N=111) dans le delta, 3,9% (N=102) dans le cours moyen et 0% (N=61) dans le cours supérieur. Aucun animal n'a été trouvé porteur d'anticorps de classe M, en 1991, comme en 1992.

### *Chez les bovins`*

En 1991, la prévalence générale est de 23,5% (N=450) pour les trois parties du bassin du fleuve Sénégal (Tableau III).

**Tableau III.** Séroprévalence en anticorps anti FVR chez les bovins de différentes zones écologiques du Sénégal en 1990, 1991, et 1992.

		1990	1991	1992
Zone sahélienne	Vallée du fleuve Sénégal	627/172(27,4)	450/106(23,5)	103/24(23,3)
	CRZ de Dahra	448/41(09,1)	ND	ND
Zone soudanienne	Bassin arachidier	ND	479/17(03,5)	378/48(12,6)
Zone guinéenne	Kolda	203/39(19,2)	227/14(06,1)	607/77(12,6)
	Tambacounda	ND	503/31(06,1)	318/12(03,7)

Comme chez les petits ruminants, les bovins du Delta, avec 28,1% de positifs apparaissent plus infectés que ceux des deux autres parties du fleuve : 24,5% (N=163) pour le cours moyen, et 14,1% pour le cours supérieur (Tableau IV).

**Tableau IV.** Séroprévalence chez les bovins de la vallée du fleuve Sénégal depuis 1990.

	1990	1991	1992
Basse vallée ou Delta	249/92(36,9)	181/51(28,1)	103/24(23,3)
Cours moyen	222/60(27,0)	163/40(24,5)	ND
Cours supérieur	156/20(12,8)	106/15(14,1)	ND

En 1992, seuls les bovins du Delta ont été étudiés. La prévalence obtenue, 23,3%, est plus faible que celle de 1991. Tous les bovins prélevés, en 1991 et en 1992, sont négatifs en anticorps anti FVR de classe M. En somme, depuis 1988, la prévalence sérique en anticorps anti virus de la FVR n'a cessé de baisser aussi bien chez les petits ruminants que chez les bovins de la vallée du Sénégal. De plus, aucun animal n'a été trouvé porteur d'anticorps de classe M depuis 1989 [3]. Ces deux faits prouvent l'absence d'activité virale dans les troupeaux suivis dans la vallée du fleuve Sénégal.

Chez les petits ruminants, la séroprévalence est passée de 24,4% (N=303, X=74) en 1988 à 4% en 1992 pour toute la vallée du Sénégal. Dans le Delta où la FVR a sévi en 1987, la baisse a été plus importante, car elle va de 71,7% en 1988 à 6,3% en 1992. Ainsi,

on note que les petits ruminants, espèces réputées les plus sensibles au virus de la FVR, sont redevenus, à l'heure actuelle, totalement réceptifs à une nouvelle infection virale parce qu'ils ont perdu toute couverture immunitaire. De plus, l'absence d'anticorps de classe M, témoins d'infection récente, semble corroborer l'absence de circulation du virus dans cette zone sahélienne. Le fait que l'on n'ait pas détecté de signe clinique de FVR montre bien l'existence d'une phase de silence post-épizootique.

Chez les petits ruminants, la baisse a été plus rapide que chez les bovins. Chez ces derniers, de 1990 à 1992, la séroprévalence est passée de 36,9% à 23,3% dans la basse vallée ou Delta du fleuve Sénégal. Cette différence est à mettre à l'actif d'un *turn over* plus rapide chez les petits ruminants dont la population âgée de moins d'un an représente 50% de l'effectif des troupeaux en zone sahélienne. Ainsi, chaque année apporte un fort contingent d'animaux neufs et dépourvus d'anticorps anti virus de la FVR. A l'heure actuelle, la séroprévalence chez les petits ruminants de la vallée du fleuve Sénégal est revenue à son niveau d'avant l'épizootie de 1987.

### **Dans le Ferlo**

En 1992, la prévalence obtenue chez les petits ruminants était de 7,5% (N=120 X=09). Elle est plus élevée que celle notée dans la vallée du fleuve à la même époque. Un animal appartenant à un troupeau transhumant a été trouvé porteur d'anticorps anti FVR de classe M. Cette partie sahélienne apparaît comme une importante zone d'enzootie en raison de son taux d'infection actuel plus élevé que celui de la vallée du fleuve Sénégal. De plus, la présence d'un animal séropositif en IgM en fait une zone de circulation du virus, à bas bruit, au niveau de certains sites comme les forages ou les mares temporaires. Cette circulation de virus dans cette zone de transhumance peut être lourde de conséquences : il est possible de penser que des animaux de la vallée en transhumance s'infectent lors de leur séjour dans le Ferlo et qu'ils réintroduisent le virus dans la vallée au retour de la transhumance. Dans la situation actuelle, le virus diffusera facilement parce que les animaux sont sans couverture immunitaire.

### **Dans le Bassin arachidier et les Iles du Saloum**

Les résultats sérologiques obtenus montrent une nette différence chez les bovins des deux départements de la région de Fatick : Gossas (Bassin arachidier) et Foundiougne (Iles du Saloum). La prévalence était de 3,5% (N=479, X=17) pour le département de Gossas en 1991 et de 12,6% (N=378, X=48) pour le département de Foundiougne en 1992. L'analyse des résultats en fonction des classes d'âge révèle que la séropositivité dans les Iles du Saloum ne concerne que les animaux de trois ans d'âge et plus. Au contraire, dans le bassin arachidier, toutes les catégories d'âge sont infectées par le virus de la FVR (Tableau V). Toutefois, cette infection indique l'existence d'une activité virale dans le Bassin arachidier et ne concerne que certains sites localisés dans la partie nord sous influence sahélienne. Il est important de noter que cette zone reçoit des animaux transhumants du Ferlo. Le Bassin arachidier apparaît comme une extension du foyer de circulation du Ferlo par l'intermédiaire des animaux transhumants. Au contraire, dans les Iles du Saloum, le caractère insulaire fait que les animaux sont relativement épargnés d'une contamination à partir du foyer continental, de faible activité. Ils ne sont atteints que par un foyer épizootique, comme celui de 1987, car l'ampleur de la circulation du virus est telle que beaucoup d'es-

pèces de moustiques peuvent devenir des vecteurs potentiels du virus. Mais, lorsque la circulation est faible, comme c'est le cas actuellement, les animaux des Iles du Saloum ne sont pas concernés.

**Tableau V.** Evolution post-épizootique de la séroprévalence en anticorps anti FVR chez les bovins dans la vallée du fleuve Sénégal en fonction des classes d'âge.

	1990	1991	1992
Jeunes	199/19(09,5)	154/12(07,7)	35/04(11,4)
Adultes	428/153(35,7)	296/94(31,9)	68/20(29,4)
Total	627/172(27,4)	450/106(23,5)	103/24(23,3)

### Dans la zone guinéenne

#### *Les bovins*

En 1991, les animaux prélevés dans les deux régions de Tambacounda (N=503) et de Kolda (N=227) ont présenté des taux d'infection identiques de 6,1%.

Dans la région de Tambacounda, 11 des 13 sites visités sont apparus infectés par le virus. Toutes les catégories d'âge sont concernées. Le site de Dialacoto est remarquable par sa forte prévalence : 17,5% (N=40, X=7)

Dans la région de Kolda, 4 des 6 sites du département de Vélingara sont apparus infectés. Parmi ceux-ci, le site de Kandia présente le taux le plus élevé : 20,5% (N=38, X=8). La séropositivité est répartie entre les quatre classes d'âge.

En 1992, la région de Kolda (département de Sédhiou) a montré un taux d'infection de 12,6% (N=607, X=77) contre 3,7% (N=318, X=12) pour celle de Tambacounda (département de Kédougou). L'analyse détaillée montre que :

- le pourcentage de troupeaux infectés de Tambacounda, 70%, est plus faible que celui de Kolda (Sedhiou) : 88,2%,
- la séropositivité concerne toutes les classes d'âge dans le Tambacounda, alors que dans la région de Kolda, les jeunes adultes, de 2 à 3 ans d'âge sont dépourvus d'anticorps de la FVR,
- un seul site, celui de Missira dans le Tambacounda, présente un intérêt parce que la prévalence en anticorps anti FVR de 12,5% est relativement élevée, et que cette séroprévalence touche toutes les catégories d'âge.

Ainsi, en 1991, des indices de circulation du virus sont révélés dans les régions de Tambacounda et de Kolda, dans les sites respectifs de Dialacoto et de Kandia. En 1992, seul le site de Missira, dans la région de Tambacounda, héberge une activité virale.

#### *Les petits ruminants*

En 1992, les séroprévalences obtenues au niveau des trois régions de Ziguinchor, de Kolda et de Tambacounda sont toutes très faibles. Elles sont respectivement de 1,5%

(N=126, X=2), 1,1% (N=170, X=2) et 1% (N=191, X=2). Elles ne concernent que des animaux et leurs produits. Ainsi, une absence d'activité virale est constatée chez les petits ruminants dans toute la zone guinéenne en 1992. Cette zone apparaît alors enzootique parce que l'infection virale y est présente chez toutes les espèces animales domestiques bien qu'aucun épisode clinique de FVR n'ait été mis en évidence. La très faible infection décelée chez les petits ruminants de la zone guinéenne reste une énigme

Chez les bovins, il a été mis en évidence une circulation du virus de la FVR dans des sites localisés dans deux régions (Tambacounda et Kolda) sur les trois que compte cette zone. La circulation du virus apparaît plus active dans la partie orientale de la zone guinéenne. Il est important de souligner que les troupeaux de bovins dans lesquels le virus circule, sont tous localisés dans les départements de Vélingara, de Tambacounda, de Kédougou, et sont dans la zone d'emprise du Parc National de Niokolo Koba (PNNK). Une transmission du virus de la FVR au cheptel domestique est possible à partir du réservoir faunique du PNNK. L'existence d'un réservoir du virus de la FVR dans la faune sauvage peut expliquer la persistance de la circulation du virus dans ces troupeaux qui se contaminent par des contacts répétés, au niveau des points d'eau et des pâturages, avec la faune sauvage infectée.

Il est également connu que les troupeaux de ruminants domestiques de la vallée du fleuve Sénégal et du Ferlo transhument de plus en plus souvent dans le département de Tambacounda, surtout en période de sécheresse. Il est loisible de penser que ces troupeaux transhumants se contaminent au contact des animaux autochtones domestiques ou sauvages. Au retour de leur transhumance, ils peuvent introduire le virus dans la vallée du Sénégal. Les conditions écologiques de la vallée (eau douce toute l'année dans les marigots et les périmètres irrigués pour la culture du riz) favorisent la pullulation des moustiques (vecteurs du virus) et l'apparition de l'épizootie par piqûres de moustiques. La diffusion de la maladie est facile parce que les animaux de la vallée sont sans couverture immunitaire.

## **Conclusions**

La FVR reste une menace au Sénégal.

Dans la vallée du fleuve Sénégal, où elle a sévi en 1987, tous les animaux sensibles, surtout les petits ruminants, sont redevenus réceptifs à une nouvelle infection. Celle-ci pourrait être provoquée par une réintroduction accidentelle du virus par les troupeaux transhumants qui seraient infectés dans les zones de circulation de virus localisées dans le Ferlo, le Bassin arachidier, et les régions australes de Tambacounda et de Kolda. Cette situation rend nécessaire la poursuite de la surveillance de la vallée du fleuve Sénégal (zone à risque) et des études épidémiologiques dans les zones d'enzooties. Ces études doivent permettre d'élucider, entre autres, le rôle des vecteurs et du réservoir faunique dans le maintien du virus au niveau de certains sites.

## Bibliographie

1. Akakpo A.J., Some M.J.R., Bornarel P., Jouan A., Gonzalez J.P. (1989). Epidémiologie de la Fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest : enquête sérologique chez les ruminants domestiques au Burkina Faso. *Bull Soc Path Exot* ; 82 : 321-331.
2. Davies F.G., Linthicum K.J., James A.D. (1985). Rainfall and epizootic Rift Valley Fever. *Bull WHO* ; 63(5) : 941-943.
3. Thiongane Y., Zeller H., Faty H.G., Akakpo J.A. (1990). Post-epizootic prevalence of Rift Valley Fever antibody in small ruminants from the Senegal River Bassin (1988-1990). 39th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, New Orleans Marriott, New Orleans, Louisiana, November 4-8, 1990.
4. Thiongane Y., Gonzalez J.P., Fati A., Akakpo J.A. (1991). Changes in Rift Valley Fever neutralizing antibody prevalence among the small domestic ruminants following the 1987 outbreak in the Senegal river Basin. *Res Virol* ; 142 : 67-70.

# 11

## **Différenciation de la réponse sérologique induite par *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:9 en utilisant les *Yersinia Outer Proteins* (YOPs)**

V. WEYNANTS\*, C. SAEGERMAN\*\*, P.A. DENOEL\*, A. TIBOR\*, J.N. LIMET\*, J.-J. LETESSON\*

\* *Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, FUNDP, Namur, Belgique.*

\*\* *Ministère de l'Agriculture. Administration de l'Elevage et du Service Vétérinaire, Bruxelles, Belgique.*

### **Résumé**

*Une infection expérimentale chez le bovin par *Yersinia enterocolitica* O:9 et *Brucella abortus* nous a permis d'identifier une fraction antigénique de *Yersinia* capable de discriminer des infections par *Yersinia* ou *Brucella*. Cette fraction est composée des *Yersinia Outer Proteins* (YOPs) qui sont des protéines exprimées exclusivement par les souches de *Yersinia* virulentes. 443 sérums provenant de bovins ne présentant pas de titres en anticorps anti-LPS de *Brucella* et 174 sérums présentant des réactions sérologiques faussement positives lors du dépistage de la brucellose ont été analysés par un ELISA basé sur la détection d'anticorps dirigés contre les YOPs. Un suivi a également été réalisé sur 7 génisses issues d'une ferme où des *Yersinia enterocolitica* O:9 ont été isolées. Cet ELISA-YOPs s'est avéré un outil supplémentaire non négligeable pour résoudre le pro-*

*blème des sérologies faussement positives de plus en plus souvent observées lors des campagnes de dépistage de la brucellose.*

En Belgique et en France, les 3 dernières campagnes de prophylaxie de la brucellose ont révélé un nombre anormal de cheptels positifs. Pour ces cheptels, l'absence de toute manifestation clinique et de tout facteur épidémiologique (pas de vaccination depuis plus de 5 ans, zone indemne, ...) font que ces sérologies sont sans rapport avec la brucellose. Ces réactions sérologiques ont donc été appelées Réactions Sérologiques Faussement Positives (RSFP). Pour les régions concernées, 3,8% des cheptels sont atteints soit 0,11% des bovins de plus d'un an [8]. Des *Yersinia enterocolitica* O:9 (YeO 9) ont été isolés de matières fécales provenant de certains des bovins présentant ces sérologies (C. Saegerman, communication personnelle). Les réactions sérologiques croisées entre ces bactéries sont bien connues [1,10,11,12]. Pour ces deux pays, comme pour de nombreux autres, les programmes d'éradication de la brucellose sont basés sur la détection d'anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella*. Or le déterminant à l'origine de la réaction croisée entre YeO:9 et *Brucella abortus* a justement été localisé dans les unités 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyl liées par des liens  $\alpha$ 1,2 de la chaîne O du LPS [2,3,4,5,7] Ces RSFP alourdissent considérablement le contrôle de la brucellose et sont responsables de problèmes économiques aigus. C'est pourquoi diverses tentatives de développement de systèmes discriminant la brucellose d'une yersiniose, ont été ébauchées; aucune d'entre elles n'a cependant répondu aux attentes [10,11,12,19,23,24].

La virulence des *Yersinia* est associée à la présence d'un plasmide spécifique de *Yersinia* de 70 kilo bases (pYV pour plasmide de Virulence de *Yersinia*). Ce plasmide présente plusieurs propriétés dépendantes de la température dont un besoin de  $\text{Ca}^{2+}$  pour pousser à 37°C. Le plasmide pYV code aussi pour des protéines spécifiques qui sont sécrétées. Ces protéines, ayant été initialement observées dans la paroi externe, ont été dénommée "YOPs" (pour *Yersinia Outer Proteins*) [17,21].

Des études récentes chez l'Humain ont montré que les sérums de patients souffrant de yersiniose contiennent des anticorps anti-LPS mais aussi des anticorps anti-YOPs [9,18]. Dans cet article, nous confirmons que des bovins infectés par YeO:9 produisent des anticorps qui interfèrent dans les tests sérologiques de dépistage de la brucellose, mais également des anticorps dirigés contre les YOPs. Sur base de ces dernières, un ELISA capable de discriminer une infection par *Brucella* d'une infection par *Yersinia* a été développé.

## **Matériel et méthodes**

### **Antigènes**

#### ***Productions de YOPs***

La souche de YeO:3 contenant le plasmide pYV (souche WE261/87 pYV<sup>+</sup>) provient du Département de Microbiologie de l'Hôpital Universitaire St LUC (Woluwe, Belgique), de même que la souche curée du plasmide (souche W261/87 pYV<sup>-</sup>) [20]). Les bactéries sont

habituellement cultivées sur du tryptic-soy-agar (TSA, Difco) à 28°C. L'isolement des YOPs est réalisé selon une méthode mise au point par G. Cornelis (communication personnelle). Brièvement : une culture d'une nuit (tryptic-soy-broth, Difco) à 28°C est ajustée à une densité optique de 1 à 600nm et diluée  $3.10^5$  fois dans du PBS (tampon phosphate salin, pH 7,4). 900 ml de la dilution sont étalés sur une feuille de cellophane qui recouvre une boîte de culture de 245mm\*245mm (Nunc) dans laquelle du TSA-MOX (TSA contenant 0,02M de  $MgCl_2$  et 0,02M de  $Na_2C_2O_4$ ) a été coulé. La boîte est incubée 20h à 28°C puis 8h à 37°C. Les bactéries et les YOPs sont ensuite récupérées hors du cellophane avec du PBS-azide (PBS- $NaN_3$  0,01%), agitées sur vortex pendant 2 minutes. Les bactéries sont ensuite séparées par centrifugation. Les YOPs excrétées sont concentrées sur une membrane Amicon (10YM10, 43 mm, Diafol).

### ***Extraction du LPS***

Le LPS a été obtenu selon la méthode décrite par L. De Waele [6].

### **Tests classiques**

Le test d'agglutination (EDTA), le test de Fixation du Complément (FC) et le test Rose Bengal (RB) ont été réalisés comme décrit précédemment [14]. Les seuils légaux pour l'EDTA et le FC sont respectivement de 30 UI/ml et 20 UI/ml. Un résultat est considéré comme positif si un titre est positif pour au moins un test. Tous les tests ont été réalisés au Centre de Dépistage des Maladies du Bétail (Erpent, Belgique).

### **Sérums bovins**

#### ***Infections expérimentales de génisses***

Les animaux ont été gardés à l'Institut National de Recherche Vétérinaire, Machelen, Belgique. Quatre génisses non gestantes ont été infectées par voie orale avec  $10^{12}$  YeO:9 et 4 génisses gestantes depuis 5 mois ont été infectées par voie conjonctivale par  $16,6 \cdot 10^6$  *Brucella abortus* 544. Les échantillons de sang ont été collectés chaque semaine.

#### ***Evaluation de la spécificité***

Pour évaluer la spécificité, 443 sérums ont été prélevés sur des animaux de 18 fermes indemnes de brucellose et de RSFP.

#### ***Sérums correspondant à des RSFP***

174 sérums de génisses présentant des RSFP ont été analysés. De plus, 21 sérums provenant de 7 génisses d'une ferme où des RSFP et des YeO:9 ont été isolées à partir des matières fécales, ont également été analysés. Tous ces sérums nous ont été fournis par le Centre de Dépistage des Maladies du Bétail.

## Production du conjugué

L'anticorps monoclonal choisi pour produire le conjugué est le 1C8 [13]. Il s'agit d'un anticorps spécifique de l'IgG1 bovin. Cet anticorps a été produit par ascite en souris hybrides BALB/c/NMRI et purifié par affinité sur une colonne protéine A Sepharose commerciale (Pharmacia, Uppsala, Suède) selon le protocole du producteur et couplé à la peroxydase comme décrit par L. De Waele [6]

## Réactifs

- Tampon Salin Glycine (GBS) : 0.17 M NaCl, 0.1 M Glycine et 6 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9.2.
- GBS-EDTA-TW : tampon GBS contenant 50 mM EDTA et 0.1% Tween 20, pH 9.2
- Hydrolysate de caséine : 25 g de caséine de lait (Fluka, Buchs, Suisse) sont dissous dans 800 ml de NaOH 0.3 N et incubés sous agitation une nuit à 37°C. La solution est ensuite neutralisée (pH 7) par de l'HCl et le volume ajusté à 1 litre. La solution est ensuite filtrée.
- PBS-caséine : tampon salin-phosphate (PBS), pH 7.4, contenant 4% (v/v) d'hydrolysate de caséine.
- Tampon citrate-phosphate : 0.051 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024 M acide citrique, pH 5.
- NaCl-Tw : 0.15 M NaCl contenant 0.01% Tween 20.

## ELISA

Les plaques de microtitration (69620, Nunc) sont sensibilisées au cours d'une incubation d'une nuit à 37°C soit par une mixture (1/1) de LPS de *Brucella melitensis* Rev1 et de *Brucella abortus* W99 à une concentration finale de 1µg/ml soit par une préparation de YOPs à une concentration finale de 4µg/ml dans du tampon GBS dilué 50 fois dans de l'eau distillée. Cent ml d'antigènes dilués sont déposés par puits. Après six lavages en NaCl-Tw, les plaques sont saturées 3 h à 37°C avec du PBS-caséine (150µl/puits).

Pour l'ELISA-LPS-*Brucella*, les sérums sont dilués 50 fois dans du GBS-EDTA-Tw et 50µl sont déposés par puits. Pour l'ELISA-YOPs, les sérums dilués 250 fois sont pré-incubés avec des extraits ultrasoniqués de YeO:3 (souche WE261/87 pYV<sup>-</sup>) avant d'être déposés dans les plaques (50µl/puits). Après une incubation d'une heure à température ambiante, la fixation des anticorps est révélée par l'utilisation de 50µl d'un conjugué 1C8-peroxydase dilué dans du GBS-EDTA-Tw contenant 4% (v/v) d'hydrolysate de caséine. Le conjugué est incubé une heure à température ambiante. Entre chaque incubation, l'excès de réactifs est éliminé par 6 lavages en NaCl-Tw avec un laveur automatique (Microplate washer M96, Titertek). L'o-phénylenediamine (0,4%, wt/v) et 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du tampon citrate-phosphate sont utilisés pour révéler l'activité de la peroxydase (100µl/puits). La réaction est stoppée après 20 min. par addition d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) (25 µl/puits). La différence de longueur d'ondes à 490nm-630nm est lue par un lecteur (Bio Kinetics Reader EL-340, Biotek Instruments, Vermont, USA). Les résultats sont exprimés en unités par comparaison à un sérum standard. Celui-ci est dilué successivement afin d'établir une courbe de calibration qui permette l'interpolation des densités optiques en unités.

Pour l'ELISA-LPS-*Brucella*, le sérum de référence présente un titre de 1200 unités internationales (UI) en FC. La courbe est réalisée par 9 dilutions successives (1/1000 à 1/256000). Le seuil de positivité a été fixé à 2,5 UI [6]. Pour l'ELISA-YOPs, le sérum de référence correspond à un mélange de sérums provenant des animaux infectés expéri-

mentalement par YeO:9. La conversion en unité arbitraire (UA) est réalisée grâce à une courbe d'interpolation obtenue par 10 dilutions successives du mélange de référence (1/20 à 1/10240). Ces dilutions sont également pré-incubées avec des extraits ultrasoniqués de la souche WE261/87 pYV<sup>-</sup>. L'interpolation est réalisée par le logiciel Delta Soft II.3 (Bio-metallics, Princeton, USA) selon l'équation logistique à 4 paramètres.

## Résultats

### Infections expérimentales

Dans une première expérience, les sérums provenant des infections expérimentales ont été analysés par les tests classiques et l'ELISA (Tableau I). Un mélange de sérums prélevés chez les 8 génisses avant les infections a été utilisé comme contrôle négatif. Pour les génisses infectés par YeO:9, les valeurs correspondent aux titres maximums observés avec l'ELISA-LPS-*Brucella*. Pour les génisses gestantes infectées par *Brucella*, les titres correspondent à ceux la dernière saignée réalisée avant l'avortement. Toute les génisses infectées par YeO:9 ont excrété, dans les matières fécales, pendant deux ou trois semaines le germe d'épreuve. Aucune *Brucella* n'a été isolée des matières fécales des génisses gestantes infectées. L'analyse de ces résultats confirme bien qu'une infection par YeO : 9 induit chez le bovin des anticorps qui interfèrent dans les tests de dépistage de la brucellose (tests classiques et ELISA-LPS-*Brucella*).

**Tableau I.** Tests sérologiques sur les animaux infectés expérimentalement.

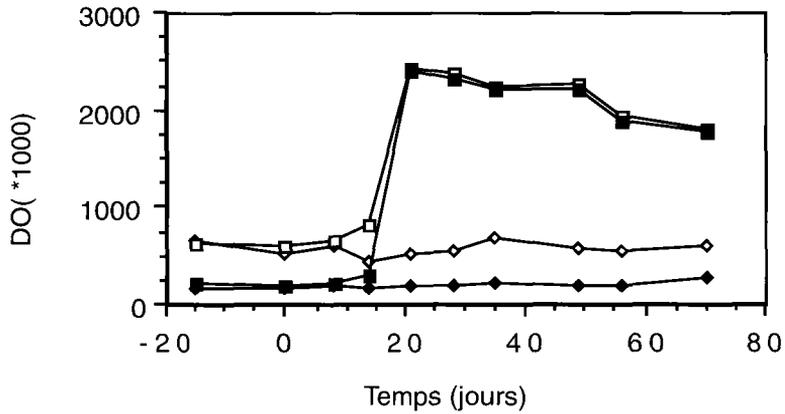
Germe	Bovin n°	Tests classiques			ELISA Matières		
		EDTA	RB	FC	LPS-YeO9**	LPS-B*	fécales
-***	0	0	-	0	0,121	0	
YeO-9	1	30	+	0	0,203	1,1	21
	2	30	+	20	0,776	8,9	15
	3	200	2+	25	0,649	5,4	15
	4	30	+	0	0,473	4,3	15
s	5	50	4+	220	2,192	34	-
	6	50	4+	50	2,296	31	-
	7	50	4+	220	2,004	41	-
	8	50	4+	200	1,752	20	-

\* Titres sérologiques exprimés en UI.

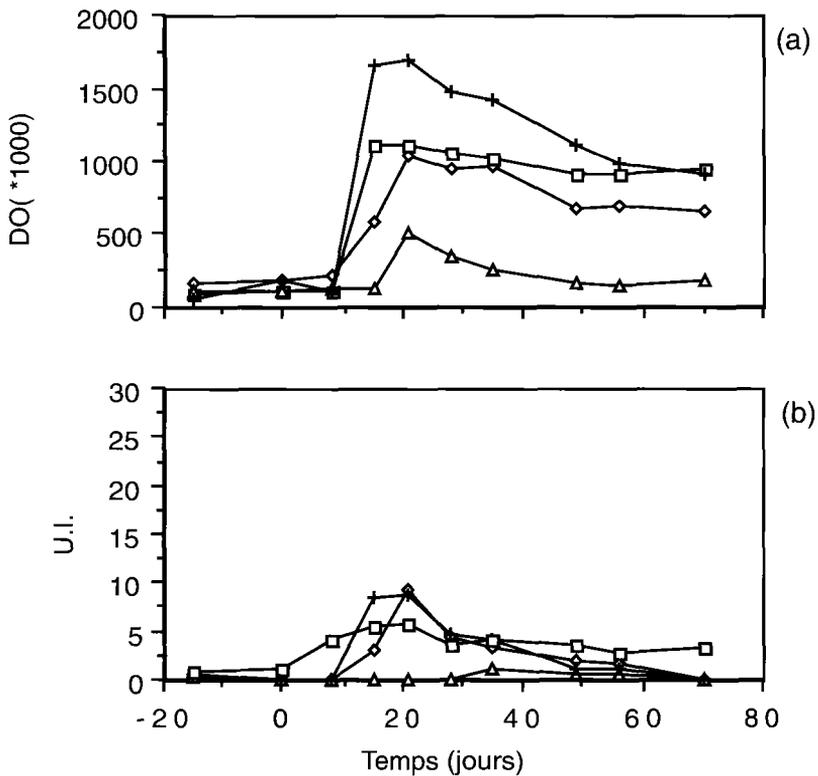
\*\* Titres sérologiques exprimés en DO.

\*\*\* Les résultats correspondent à la moyenne obtenue pour les 8 saignées réalisées avant les infections expérimentales.

N.D. non déterminé.



**Figure 1.** Effet de la pré-incubation sur la détection des anticorps anti-YOPs après infection par YeO:9 (carré) ou par *Brucella abortus* 544 (losange) au jour 0. Les sérums ont été épuisés (carré fermé) ou non (carré ouvert) par des extraits ultrasoniqués de YeO:3 (souche WE 261/87 pYV-).



**Figure 2.** Suivis sérologiques des anticorps anti-YOPs (a) et anti-LPS (b) chez les quatre génisses infectées expérimentalement au jour 0 par YeO:9.

Par la suite, ces sérums ont été utilisés pour suivre la réponse anticorps dirigée contre différentes fractions de *Yersinia* (protéines cytoplasmiques, protéines des parois, YOPs) (données non montrées). De ces suivis sérologiques, il est apparu que seule la fraction contenant les YOPs était susceptible de discriminer une infection par YeO:9 d'une infection par *Brucella*. Cependant, les densités optiques obtenues pour les sérums avant infection par YeO:9 et pour sérums provenant des génisses infectées par *Brucella*, étaient relativement élevées (entre 0,8 et 1,2). Nous avons donc amélioré l'ELISA-YOPs en modifiant différents paramètres. La fraction YOPs étant contaminée par du LPS et des protéines de la paroi (données non montrées), nous avons également analysé l'effet d'une pré-incubation des sérums avec des extraits ultrasoniqués de YeO:3 dépourvue du plasmide de virulence (souche WE261/87 pYV<sup>-</sup>). La Figure 1 illustre l'effet de cette pré-incubation sur la cinétique d'apparition des anticorps anti-YOPs chez deux bovins représentatifs des deux groupes. L'épuisement des sérums ne modifie pas le profil sérologique pour l'animal infecté par YeO:9; il diminue par contre de manière significative les signaux chez l'animal infecté par *Brucella*. Les conditions finales de l'ELISA-YOPs sont reprises dans "matériel et méthodes".

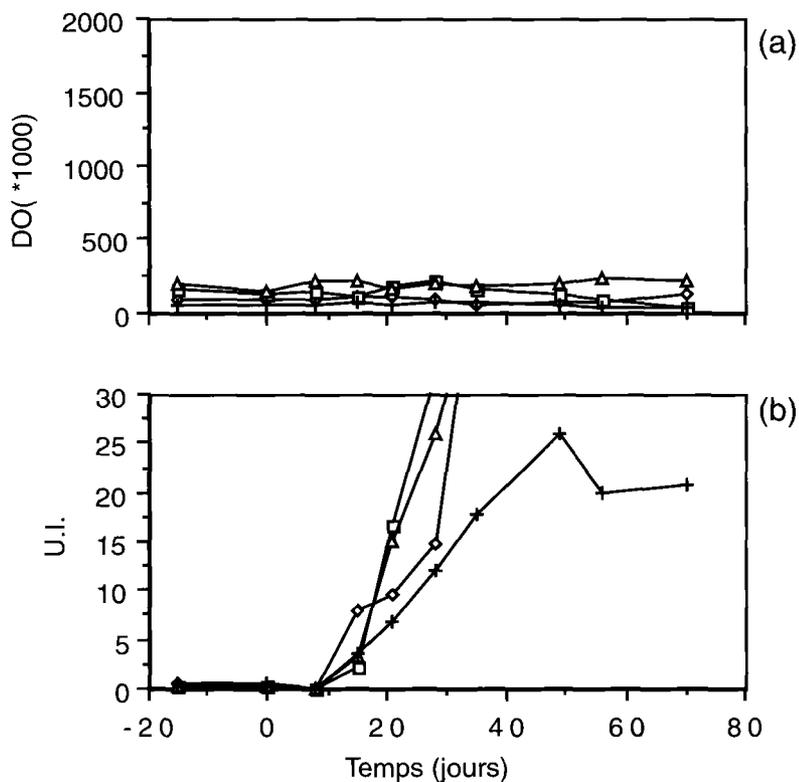
Les suivis chronologiques des titres d'anticorps anti-YOPs et anti-LPS-*Brucella* sont représentés pour chaque génisse aux Figures 2 et 3. Les animaux infectés expérimentalement par YeO:9 montrent une réponse humorale contre les YOPs plus homogène que celle dirigée contre le LPS. Dans le cadre de ce type d'infection, nous n'avons pas observé d'anticorps anti-LPS sans mettre en évidence des anticorps anti-YOPs, les deux ELISA se révélant aussi précoces l'un que l'autre. Par contre, la réponse contre les YOPs semble perdurer bien plus longtemps que celle dirigée contre le LPS. Une des quatre génisses n'a pas présenté de réponse humorale malgré une excrétion de YeO:9 pendant 3 semaines. Quant aux animaux infectés expérimentalement par *Brucella*, ils ne présentent pas des titres en anticorps anti-YOPs significatifs. Nous avons également eu l'opportunité de tester cet ELISA-YOPs sur des sérums d'animaux infectés expérimentalement par *Salmonella*, *Pasteurella* et *Pseudomonas*. Pour tous ces animaux, aucun titre significatif en anticorps anti-YOPs n'a été détecté (données non montrées).

### **Caractéristiques de l'ELISA YOPs et première évaluation sur des sérums du terrain**

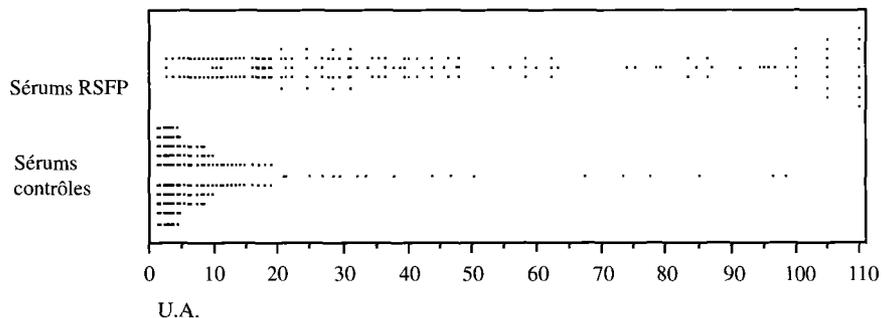
En utilisant les conditions de lavage décrites dans "matériel et méthodes", les coefficients de variations pour une plaque ou entre plaques sont inférieurs à 10.

Pour éprouver l'ELISA-YOPs, nous avons analysé 443 sérums provenant de 18 fermes où, ni brucellose, ni RSFP n'ont été signalées et où aucune *Yersinia* virulente n'a été isolée. Ces sérums ont été comparés aux dilutions successives du mélange de référence. 90% des échantillons ont des valeurs en unité inférieures à 20 unités arbitraires (UA) et 95 % des sérums testés ont moins de 30 UA. La Figure 4 montre le profil de distribution pour 174 sérums choisis de manière aléatoire en fonction des UA. Les sérums présentant des titres supérieurs à 30 UA ont été analysés en immuno-empreinte afin de vérifier s'ils contenaient des anticorps anti-YOPs. Des anticorps anti-YOPs n'ont pu être mis en évidence que pour les sérums ayant des titres supérieurs à 50 UA (données non montrées).

L'ELISA a également été appliqué à 174 sérums dont le test de fixation du complément et/ou le test d'agglutination sont positifs. Ces sérums provenaient de plusieurs fermes où les données épidémiologiques nous ont permis d'exclure la brucellose comme facteur res-



**Figure 3.** Suivis sérologiques des anticorps anti-YOPs (a) et anti-LPS (b) chez les quatre génisses infectées expérimentalement au jour 0 par *Brucella abortus* 544.



**Figure 4.** Distributions, en fonction des titres en anticorps anti-YOPs exprimés en UA, des sérums RSPF et de 174 sérums indemnes choisis au hasard parmi les 443 testés.

ponsable de ces réactions sérologiques. Nous les avons donc considérés comme sérum présentant une RSFP. 64 et 49% des sérums ont des valeurs unitaires respectivement supérieures à 20 et 30 UA. La Figure 4 montre le profil de distribution pour les 174 sérums en fonction des UA.

Sept génisses issues d'une ferme ont aussi été suivies sur une période de 3 mois. Des YeO:9 ont été isolées à partir des matières fécales de 2 d'entre-elles. Le Tableau 2 reprend les résultats sérologiques (tests classiques, ELISA-LPS et ELISA-YOPs) et bactériologiques obtenus au cours de cette étude. Le suivi révèle que 6 animaux présentent à un moment donné un titre en anticorps anti-YOPs supérieur à 30 UA; parmi eux, 5 sont positifs en ELISA-LPS. Cependant, contrairement à ce qui a été observé au cours de l'infection expérimentale, la génisse n°13 présente à un moment du suivi des titres en anticorps anti-LPS supérieurs au seuil, sans pour autant avoir un taux en anticorps anti-YOPs significatif. Ce n'est qu'à la saignée suivante que l'animal devint positif en ELISA-YOPs. La 7ème génisse (n°14) est restée négative tout au long du suivi.

**Tableau II.** Suivis sérologique et bactériologique chez des génisses d'une ferme "infectée par YeO:9".

Génisse n°	Date J/M	ELISA YOPs(UA)	Matières fécales	ELISA LPS(UI)	Tests classiques		
					EDTA	RB	FC
9	9/7	55,8	+	25	25	+	60
	14/8	18,3	-	9,4	12,5	+	20
	5/11	7,3	-	5,3	0	+	0
10	9/7	22,6	+	0,0	12,5	-	0
	14/8	46,0	-	5,5	12,5	+	0
	5/11	18,4	-	3,0	12,5	-	0
11	9/7	0,0	-	0,0	0	-	0
	14/8	60,0	-	10,7	12,5	+	15
	5/11	20,4	-	4,8	12,5	+	0
12	9/7	5,3	-	0	0	-	0
	14/8	40,3	-	10	0	-	0
	5/11	8,0	-	2,3	0	-	0
13	9/7	7,4	-	7,0	12,5	+	15
	14/8	55,3	-	3,0	12,5	-	0
	5/11	6,6	-	2,0	12,5	-	0
14	9/7	32,4	-	0	0	-	0
	14/8	29,5	-	0	0	-	0
	5/11	21,5	-	0	0	-	0
15	9/7	4,3	-	0	0	-	0
	14/8	7,7	-	0	12,5	-	0
	5/11	6,8	-	0	0	-	0

## Discussion

Les différentes fractions de *Yersinia* ont été produites à partir d'une souche de *Yersinia enterocolitica* O:3. Ce choix se base sur le fait que les protéines des *Yersinia enterocolitica* O:3 et O:9 sont antigéniquement proches les unes des autres [16]. De plus, comme le LPS de YeO:3 n'induit pas de réactions croisées lors des tests de détection de la brucellose, cet antigène ne pouvait mettre en évidence les anticorps dirigés contre le LPS de YeO:9 ou de *Brucella* [25]. Les signaux que nous observions ne pouvaient donc pas être attribués à des anticorps dirigés contre le LPS de YeO:9 ou de *Brucella*.

C. Schoerner [18], en étudiant la présence d'anticorps anti-YOPs chez des humains pour lesquels une yersiniose aiguë ou récente a été diagnostiquée, a montré que l'ELISA était aussi approprié que l'immuno-empreinte. Mais, il est cependant bien connu que cette technique est moins sensible et plus fastidieuse que l'ELISA. Nous avons également choisi l'ELISA parce que cette technique permet d'analyser rapidement un grand nombre de sérums. Le manque de sensibilité de l'immuno-empreinte a d'ailleurs été observé lorsque nous avons analysé une série de sérums présentant des titres en anticorps anti-YOPs égaux ou supérieurs à 30 UA.

Les sérums contrôles ont été prélevés dans des fermes où ni brucellose ni RSFP n'ont été mises en évidence. Le profil de distribution de ces sérums en fonction de leur titre en UA montre une cassure à 20 UA. 90 à 95 % des sérums ont des titres respectivement inférieurs à 20 et 30 UA. Les sérums ayant des titres supérieurs à 30 UA ont été analysés en immuno-empreintes afin de vérifier si ils contenaient ou non des anticorps anti-YOPs. De tels anticorps n'ont pu être mis en évidence que pour des sérums ayant des titres élevés. Le manque de sensibilité de l'immuno-empreinte ne permet cependant pas d'exclure que les sérums ne possèdent pas d'anticorps dirigés contre les YOPs. 5 à 10% des sérums indemnes de brucellose et de RSFP proviennent donc très vraisemblablement de génisses atteintes de yersiniose. Ces infections sont-elles dues à des YeO:9 ou à d'autres *Yersinia* virulentes? Nous ne pouvons le dire actuellement car les seules *Yersinia* qui ont été isolées dans les fermes concernées sont des *Yersinia* non virulentes. Cependant, l'infection expérimentale a montré que des génisses infectées par YeO:9 ont des taux en anticorps anti-YOPs qui perdurent bien plus longtemps que les anticorps dirigés contre le LPS. Chez l'Humain, 39% des individus sains auraient des titres en anticorps anti-YOP significatifs [9]. Par contre, entre 49 et 64% des génisses présentant des RSFP ont des titres en anticorps anti-YOPs respectivement supérieurs à 30 et 20 UA. Les distributions des sérums des deux populations sont significativement différentes ( $\alpha < 0,001$ ).

Le fait que le plasmide de virulence pYV est présent dans toutes les souches de *Yersinia* pathogènes (*Y. enterocolitica* O:9 mais aussi O:3, O:8 et *Y. pseudotuberculosis*) doit nous éviter de tirer des conclusions trop hâtives lors de l'interprétation des sérologies anti-YOPs. Cependant, les résultats obtenus avec les différentes populations de sérums et le suivi de la ferme "infectée par YeO:9" indiquent que la détection des anticorps anti-YOPs semble une méthode de diagnostic de la yersiniose prometteuse et un outil supplémentaire pour traiter le problème des RSFP dans le dépistage de la brucellose. Il ne sérumsit pas impossible d'envisager, comme l'a réalisé I. Maki [15] pour détecter et discriminer des infections par YeO:3 et O:8, coupler l'ELISA-YOPs à un ELISA détectant des anticorps dirigés contre le LPS de YeO:3 et contre ceux des principaux sérotypes des *Yersinia pseudotuberculosis*.

Pour être spécifique, l'ELISA-YOPs actuel nécessite un épuisement des sérums afin que seuls les anticorps anti-YOPs soient détectés. Le recours à des YOPs recombinantes devrait éliminer cette préincubation des sérums et donc, d'une part, rendre l'ELISA-YOPs plus facilement applicable en routine et d'autre part réduire le seuil de positivité. Chez le lapin ce sérumsit les YOPs de 25, 37 et 57 kDa les plus immunogènes, la YOP 35 étant la première à être mise en évidence [9]. Pour l'Humain, les YOPs les plus immunogènes sérumsient de 26, 34, 45 et 53 kDa [21] et d'après les travaux de Schoerner [18] sérumsient celles de 25, 36 et 47kDa. Une première étude en immuno-empreinte a permis d'identifier les YOPs les plus immunogènes chez le bovin. Ces protéines sérumsient les mêmes que celles décrites lors d'infection chez le lapin ou l'Humain puisque les YOPs de 25 et de 48 ou 54 kDa sérumsient régulièrement à l'origine d'une réponse humorale, mais le plus immunogène sérumsit la YOP de 37kDa. Des travaux, en collaboration avec G. Cornelis (ICP/UCL) sont en cours afin d'évaluer l'apport de ces YOPs recombinantes à la détection des RSFP.

### Remerciements

Cette recherche a été subventionnée par la Région Wallonne et par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA). Nous remercions vivement Messieurs Y. Botton, B. Limbourg et P. Thiange du Centre de Dépistage des Maladies du Bétail (Erpent, Belgique), les Professeurs G. Cornelis et G. Wauters de l'Unité de Microbiologie, Hôpital St Luc (Woluwe, Belgique) et le Dr. J. Godefroid (INRV, Bruxelles, Belgique) pour leur collaboration à ce travail.

### Références

1. Ahvonen O.E., Jansson, Aho.K. (1969). Marked cross-agglutination between *Brucellae* and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathol Microbiol Scand* ; 75 : 291-295.
2. Bundle D.R., Gidney M.A.J., Perry M.B., Duncan J.R., Cherwonogrodzky J.W. (1984). Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infect Immun* ; 46 : 389-393.
3. Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Caroff M., Perry.M.B. (1987). The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann Inst Pasteur/Microbiologie* ; 138 : 92-98.
4. Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Gidney M.A.J., Meikle P.J., Perry M.P., Peters.T. (1989). Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and oligosaccharides. *Infect Immun* ; 57 : 2829-2836.
5. Caroff M., Bundle D.R., Perry.M.B. (1984). Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Eur J Biochem* ; 139 : 195-200.
6. De Waele L., Saegerman C., Gilson D., Thiange P., Vo T. K., Limet J., Letesson. J-J. (1993). Field evaluation of three ELISA using monoclonal antibodies or protein G as peroxydase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Submitted in *Vet Microbiol*.
7. Diaz R., Toyos J., Salvo M.D., Fernandez-Lago L., Alonso B., Moriyon I., Dorronsorov I. (1984). Studies on the polysaccharide B and native hapten of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Dev Biol Stand* ; 56 : 213-220.
8. Garin-Bastuji B. (1993). Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Point Vét* ; 25 (152) : 115-124.
9. Heesenmann J., Eggers C., Schröder C. (1987). Serological diagnosis of yersinosis by immu-

- noblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic yersiniae. *Contrib Microbiol Immun* ; 9 : 285-289.
10. Hurvell B., Ahvonen P., Thal E. (1971). Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica* . Agglutination and complement fixation. *Acta Vet Scand* ; 12 : 86-94.
  11. Hurvell B. (1972). Serological cross-reactions between *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica* . Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Acta Vet Scand* ; 13 : 472-483.
  12. Hurvell B., Lindberg A.A., Carlsson H.E. (1979). Differentiation of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Contrib Microbiol Immunol* ; 5 : 73-79
  13. Letesson *et al* (1985).
  14. Limet J., Kerkhofs P., Wijfels R., Dekeyser P. (1988). Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Ann Méd Vét* ; 132 : 565.
  15. Maki I.O., Heesemann J., Lahesmaa R., Toivanen A., Granfors A. (1991). Combined use of released proteins and lipopolysaccharide in enzyme-linked immunosorbent assay for serologic screening of *Yersinia* infections. *J Infect Dis* ; 163 (2) : 409-412.
  16. Martinez M.B., Hoshino-Shimizu S., Falcao D.P. (1991). *Yersinia enterocolitica* : antigenic components with diagnostic potential. *Contrib Microbiol Immun* ; 12 : 123-126.
  17. Michiels T., Wattiau P., Brasseur R., Ruyschaert J.M., Cornelis G. (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersiniae* . *Infect Immun* ; 58 (9) : 2840-2849.
  18. Schoerner C., Wartenberg K., Röllinghoff M. (1990). Differentiation of serological responses to *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella* species by immunoblot or enzyme-linked immunosorbent assay using whole bacteria and *Yersinia* outer membrane proteins. 28 (7) : 1570-1574.
  19. Schurig G.G., Pringle A.T., Breese S.S. (1981). Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus* infected cattle. *Infect Immun* ; 34 : 1000-1007.
  20. Sory M-P., Tollenaere J., Laszlo C., Biot T., Cornelis G.R., Wauters G. (1990). Detection of pYV+ *Yersinia enterocolitica* isolates by P1 slide agglutination. *J Clin Microbiol* ; 28 (11) : 2403-2408.
  21. Stahlberg *et al* (1987).
  22. Straley S., Skrzypek E., Plano G.V., Bliska J.B. (1993). Yops of *Yersinia* spp. pathogenic of Humans. *Infect Immun* ; 61 (8) : 3105-3110.
  23. Vizcaino N., Chordi A., Fernandez-Lago L. (1991). Characterization of smooth *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies. *Res Microbiol* ; 142 (9) : 971-978.
  24. Vizcaino N., Fernandez-Lago L. (1992). A rapid and sensitive method for the identification of *Brucella* species with a monoclonal antibody. *Res Microbiol* ; 143 (5) : 513-518.
  25. Weninger J., Wartznberg K., Röllinghoff M. (1988). Immunological characterization of *Yersinia enterocolitica* O:9 and O:3 LPS antigens by monoclonal antibodies. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. A* ; 269 : 298-313.

# 12

## **Epidémiologie des affections abortives des ruminants au Togo : enquête sérologique sur la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift**

A.J. AKAKPO\*, K.L.TEOU\*, T. KPONMASSI\*, H.G. ZELLER\*\*  
(Avec la collaboration technique de M. DIENG et de M. SENE)

\* *Ecole Inter Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires, Dakar, Sénégal.*  
\*\* *Institut Pasteur, Dakar, Sénégal.*

### **Résumé**

*En 1990-1991, des prélèvements de sérums ont eu lieu sur des bovins et des petits ruminants dans toutes les régions du Togo pour apprécier la prévalence des principales affections microbiennes abortives du bétail. L'analyse des sérums en fixation du complément (483 sérums bovins testés en brucellose, chlamydie et fièvre Q) ou en ELISA (722 sérums de bovins et d'ovins testés vis à vis de l'antigène du virus de la fièvre de la Vallée du Rift FVR), révèle une prévalence de  $16,6 \pm 3,3\%$  en brucellose,  $2,3 \pm 1,3\%$  en chlamydie,  $3,5 \pm 1,6\%$  en fièvre Q et  $6,1 \pm 1,7\%$  en FVR ( $9,4 \pm 2,8\%$  chez les bovins et  $2,7 \pm 1,7\%$  chez les ovins). Ces prévalences varient d'une région à l'autre. Pour la fièvre de la Vallée du Rift, des zones de circulation active ou récente du virus (mise en évidence d'IgM) ont été identifiées.*

*L'évidence sérologique de ces différentes affections est discutée sur les plans économique et hygiénique.*

Le contrôle des grandes épizooties (peste bovine, péripneumonie...) qui autrefois décimaient le cheptel bovin en Afrique, n'a pas pour autant réglé les problèmes de pathologie. En effet, la disparition des mortalités dues aux épizooties a permis l'émergence des maladies d'élevage, lesquelles provoquent des pertes à travers l'avortement, la mortinatalité, la stérilité. Ces maladies abortives tendent à limiter l'élevage à sa source. C'est pourquoi il nous a paru nécessaire de faire le point sur quelques affections infectieuses abortives du bétail au Togo, à travers une enquête séro-épidémiologique, pour déterminer la prévalence de quatre de ces affections : la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift.

## Matériel et méthodes

Entre les mois d'août 1990 et février 1991, des prélèvements de sang ont été effectués sur des bovins et des petits ruminants au Togo. Le sang a été ponctionné à la veine jugulaire à l'aide de tubes Vénoject sous vide et stériles, sur des animaux choisis au hasard dans les élevages de type traditionnel (pour les bovins) ou encadré (pour les petits ruminants), dans les cinq régions administratives du pays. Sur chaque animal, les informations concernant l'espèce, la race, l'âge et le sexe sont relevées. Les sérums sont récoltés le même jour et conservés au congélateur jusqu'à leur utilisation.

Au Laboratoire de Pathologie Infectieuse de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire de Dakar, des réactions sérologiques ont été utilisées pour rechercher les anticorps témoins de la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q, tandis que les recherches sur la fièvre de la Vallée du Rift ont été effectuées au Laboratoire des arboviroses de l'Institut Pasteur de Dakar.

En brucellose, l'épreuve à l'antigène tamponné coloré au Rose Bengale (RB) a été couplée à la Fixation du Complément (FC) selon la technique de Kolmer à froid. En RB, toute agglutination visible à l'œil nu est considérée comme positive. En FC, le seuil de positivité retenu est une hémolyse à 50% à la dilution de 1/4. Les réactifs (antigènes) proviennent des Laboratoires Bio Mérieux, le complément et le sérum hémolytique anti-globules rouges de mouton proviennent de Diagnostic Pasteur.

En chlamydie et fièvre Q, la réaction classique de fixation du complément à froid (micro-méthode en plaque) a été mise en œuvre avec des antigènes *Chlamydia* et *Coxiella* des laboratoires Rhône Mérieux.

En fièvre de la Vallée du Rift, c'est l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) qui a été utilisé pour détecter les IgG et les IgM, comme décrit dans les travaux antérieurs [24,28]. La plupart des réactifs sont produits sur place. Il s'agit de l'immuno-ascite Rift Valley Fever (RVF) de souris, l'immuno-ascite de la chaîne  $\mu$  des immunoglobulines, l'antigène spécifique de foie normal, l'antiglobuline G commercial spécifique marqué à la peroxydase de même que l'antiglobuline G de souris marqué à la peroxydase.

L'analyse statistique des résultats a eu recours aux tests classiques couramment utilisés.

## Résultats

Au total, 483 sérums de bovins ont été analysés pour la brucellose, la chlamydie et la fièvre Q. Pour la fièvre de la Vallée du Rift, 359 sérums de bovins et 327 sérums d'ovins ont été testés (Tableau I)

**Tableau I.** Origine et nombre de prélèvements par région.

Région	FVR			Brucellose Fièvre Q Chlamydie
	Bovins	Ovins	Total	Bovins
Maritime	49	72	121	50
Plateaux	94	55	149	100
Centrale	30	78	108	45
Kara	92	69	161	119
Savanes	13	53	183	169
Total	395	327	722	483

## Résultats d'ensemble et par espèces

La prévalence en brucellose est significativement élevée (16,6%) par rapport aux autres affections explorées (Tableau II). De même, les bovins semblent plus réceptifs à la FVR que les ovins.

**Tableau II.** Prévalence sérologique globale par espèce.

Affection	FVR			Brucellose	Chlamydie	Fièvre Q
	Bovins	Ovins	Total	Bovins	Bovins	Bovins
Nombre de sérums examiné	395	327	722	483	483	483
Positif en %	9,4 ± 3,8	2,8 ± 1,7	6,1 ± 1,7	16,6 ± 3,3	2,3 ± 1,3	3,5 ± 1,0
AC %				6,2 ± 2,1	5,8 ± 2,1	5,6 ± 2,0

AC : Sérums anticcomplémentaires

### Prévalence sérologique selon les régions et la race

Les bovins des régions maritimes et des plateaux semblent plus infectés que les autres en brucellose (26% et 23%) et en chlamydieuse (6% et 4%).

En fièvre Q, c'est la région de la Kara (5,9%) qui est la plus infectée (Tableaux III, IV et V)

**Tableau III.** Prévalence sérologique en brucellose bovine.

Région	Nombre	Positif %	Négatif %	AC %
Savanes	169	12,4 ± 4,9	79,9 ± 6,0	7,7 ± 4,0
Kara	119	14,3 ± 6,3	77,3 ± 7,5	8,4 ± 4,9
Centrale	45	13,3 ± 9,9	84,5 ± 10,6	2,2 ± 4,3
Plateaux	100	23,0 ± 8,2	73,0 ± 8,7	4,0 ± 3,8
Maritime	50	26,0 ± 12,2	70,0 ± 12,7	4,0 ± 5,4
Total	483	16,6 ± 3,3	77,2 ± 3,7	6,2 ± 2,1

**Tableau IV.** Prévalence sérologique en chlamydieuse bovine.

Région	Nombre	Positif %	Négatif %	Ac %
Savanes	169	1,2 ± 1,6	91,1 ± 4,3	7,7 ± 4,0
Kara	119	0,8 ± 1,6	93,3 ± 4,5	5,9 ± 4,2
Centrale	45	2,2 ± 4,3	95,5 ± 6,0	2,2 ± 4,3
Plateaux	100	4,0 ± 3,8	91,0 ± 5,6	5,0 ± 4,2
Maritime	50	6,0 ± 6,6	90,0 ± 8,3	4,0 ± 5,4
Total	483	2,3 ± 1,3	91,9 ± 2,4	5,8 ± 2,1

AC : Sérums anticomplémentaires

En fièvre de la Vallée du Rift, les bovins des régions maritimes, des plateaux et des savanes ont une prévalence en IgG supérieure à 12%, tandis que les régions de Kara et Centrale ont une prévalence faible (3,3%) (Tableau VI). Chez les ovins, la région centrale se singularise avec un taux de 6,4%.

**Tableau V.** Prévalence sérologique en fièvre Q bovine.

Région	Nombre	Positif %	Négatif %	AC %
Savanes	169	2,4 ± 2,3	90,5 ± 4,4	7,1 ± 3,9
Kara	119	5,9 ± 4,2	89,1 ±	5,0 ± 3,9
Centrale	45	0	100 ± 0,0	0
Plateaux	100	4,0 ± 3,8	89,0 ± 6,1	7,0 ± 5,0
Maritime	50	4,0 ± 5,4	92,0 ± 7,5	4,0 ± 5,4
Total	483	3,5 ± 1,6	90,9 ± 2,6	5,6 ± 2,0

AC : Sérums anticcomplémentaires

**Tableau VI.** Prévalence selon l'espèce et la région en FVR.

Espèces Région	Bovins			Ovins			Total		
	Examinés	FVR +	% ± i	Examinés	FVR+	% ± i	Examinés	FVR	% ± i
Maritime	49	8	10,3 ± 10,3	72	0	0	121	8	6,6 ± 4,4
Plateaux	94	15	16,0 ± 7,4	55	1	1,8 ± 3,5	149	16	10,7 ± 4,9
Centrale	30	1	3,3 ± 6,2	78	5	6,4 ± 5,4	108	6	5,5 ± 4,2
Kara	92	3	3,3 ± 3,6	69	0	0	161	3	1,8 ± 2,0
Savanes	130	10	12,3 ± 5,6	53	1	1,9 ± 3,6	183	11	6,0 ± 3,4
Total	395	37	9,4 ± 2,8	327	7	2,7 ± 1,7	722	44	6,1 ± 1,7

Le comportement des animaux vis à vis des infections bactériennes (brucellose, chlamydiaose, fièvre Q) est indépendant de la race (Taurin, Zébu, Métis).

### Prévalence sérologique selon l'âge

Les animaux ont été classés en tranches d'âge par rapport à la période de production. On se rend compte que c'est pendant cette période que les animaux sont les plus infectés en fièvre de la Vallée du Rift (2,4% chez les ovins et 15,4% chez les bovins) et en brucellose (16,8% et 25,4%) (Tableaux VII, VIII et IX). Par contre, en chlamydiaose et en fièvre Q, ce sont les jeunes animaux de 0 à 3 ans qui offrent des prévalences relativement élevées (3,5% et 4,9%).

**Tableau VII.** Prévalence selon l'âge chez les ovins en FVR.

Age (an)	examinés	Sérums FVR+	% ± i
<1	24	0	0
1 à 3	287	7	2,4 ± 1,7
>3	16	0	0

**Tableau VIII.** Prévalence selon l'âge chez les bovins en FVR.

Age (an)	examinés	Sérums FVR+	% ± i
≤3	176	6	3,4 ± 2,6
3 à 7	181	28	15,4 ± 5,2
>7	38	3	7,9 ± 8,5

**Tableau IX.** Prévalence sérologique selon l'âge en brucellose, chlamydirose et fièvre Q bovines.

Classe d'âge (an)	Nombre de sérums	Brucellose positifs %	Chlamydirose positifs %	Fièvre Q positifs %
0-3	202	13,9 ± 4,8	3,5 ± 2,5	4,9 ± 3,0
4-7	214	16,8 ± 5,0	1,4 ± 1,8	2,3 ± 2,0
8-11	59	25,4 ± 11,1	1,7 ± 3,3	3,4 ± 4,6
12 et +	8	12,5 ± 22,9	0	0
Total	483	16,6 ± 3,3	2,3 ± 1,3	3,5 ± 1,§

### Prévalence sérologique selon le sexe

Si en FVR et en brucellose bovine les mâles et les femelles ont un comportement identique, les béliers sont par contre plus sensibles que les brebis. En chlamydirose et en fièvre Q les mâles sont plus sensibles que les femelles (Tableaux X et XI).

**Tableau X.** Prévalence sérologique selon le sexe en FVR.

Sérums	Bovins		Ovins		Total	
	M	F	M	F	M	F
Examinés	75	320	30	297	105	617
FVR+	7	30	2	5	9	35
% ± 1	9,3 ± 6,5	9,4 ± 3,1	6,6 ± 8,8	1,7 ± 1,4	8,6 ± 5,3	5,7 ± 1,8

**Tableau XI.** Prévalence sérologique selon le sexe en brucellose, chlamydie et fièvre Q bovines.

Sexe	Nombre de sérums	Brucellose positifs %	Chlamydie positifs %	Fièvre Q positifs %
M	100	17,0 ± 7,3	5,0 ± 4,2	6,0 ± 4,6
F	383	16,4 ± 3,7	1,6 ± 1,3	2,9 ± 1,7

### Prévalence sérologique en IgM en FVR

En FVR, les sérums positifs en IgG sont repris pour une recherche en IgM. La réponse est négative chez les ovins, mais des sérums de bovins de la Kara et des plateaux sont porteurs d'IgM (Tableau XII).

**Tableau XII.** Prévalence sérologique en IgM et variation selon les régions chez les bovins (FVR).

Régions	Sérums examinés	IgC	IgM
Maritime	49	8	0
Plateaux	94	15	4
Centrale	30	1	0
Kara	92	3	2
Savanes	130	10	0
Total	395	37	6
% ± i	100 ± 0	9,4 ± 2,8	1,5 ± 1,1

## Discussion

L'enquête a porté sur un échantillon de bovins et d'ovins sans information précise sur les antécédents pathologiques, et singulièrement, sur les avortements chez les femelles prélevées. L'accès à de telles informations est plutôt difficile en système d'élevage traditionnel non encadré. Les caprins n'ont pas fait l'objet de prélèvements.

Les sérums de bovins ont d'abord été analysés en brucellose, chlamydieuse et fièvre Q puis vis à vis de la fièvre de la Vallée du Rift, ce qui explique la diminution du nombre de sérums bovins analysés, car certains ont été épuisés au cours des analyses.

L'étude des différentes affections abortives, pour être complète, devrait associer le diagnostic microbiologique direct et clinique au diagnostic sérologique. Ceci n'a pas été possible, vu le temps dont nous disposions, pour le travail de terrain, mais aussi pour l'identification des germes au laboratoire.

Au laboratoire, nous avons choisi l'agglutination rapide sur lame (Rose Bengale) et la fixation du complément à froid (microméthode en plaque) pour le diagnostic de la brucellose, comme recommandé antérieurement [4,6]. Le Rose Bengale (RB), technique simple, rapide et économique, est facile à mettre en œuvre et sert au diagnostic de troupeau.

La fixation du complément (FC), recommandée par l'OMS, a été utilisée pour compléter le RB, mais aussi en chlamydieuse et en fièvre Q. Nous aurions pu utiliser la technique ELISA en brucellose et fièvre Q si nous avions pu disposer de réactifs appropriés.

Avant d'être engagés dans la réaction de FC, les sérums ont subi un chauffage à 60°C pendant une heure, en vue de réduire le nombre de sérums anticomplémentaires éventuels. Pourtant, certains sérums ont gardé le pouvoir anticomplémentaire, réduisant ainsi les informations attendues.

Dans le diagnostic de la chlamydieuse, la FC est une réaction de groupe (antigène thermostable commun à toutes les chlamydiées), donc peut reconnaître des erreurs par excès.

Par contre, en fièvre Q, la spécificité antigénique est plus grande, car la FC met en évidence des anticorps anti *Coxiella burnetii*, à l'exclusion de tout autre germe de la famille des Rickettsiaceae ou des Chlamydiaceae.

Des travaux antérieurs ont déjà révélé la présence de la brucellose au Togo (sérologie [4] et isolement de germe [5]). D'une façon générale, la prévalence moyenne relevée (16,6 ± 3,3%) est inférieure à celle obtenue il y a une dizaine d'années (41% [4]). Faut-il en déduire que la brucellose animale est en voie de régression au Togo ? Il serait hasardeux de conclure à un recul significatif de la maladie, en fonction de la taille réduite de la population bovine étudiée et de l'absence de mesures rigoureuses de prophylaxie à grande échelle. La prophylaxie médicale n'est mise en œuvre que dans le cas particulier d'un élevage en ranching (ferme d'Avétonou) dans la région des Plateaux où, pour faire face à une prévalence sérologique de 52% et à un taux de vélage de 33%, les responsables du centre ont préféré immuniser les animaux avec un vaccin à germe vivant à base de la souche B19 (Absorsec Nd). Le résultat est appréciable. En brucellose, l'interférence des facteurs d'élevage et climatiques avec la race et le sexe fait qu'il est impossible d'apprécier l'influence propre de ces derniers. Les animaux en phase et en fin de production sont plus infectés que les jeunes avant la puberté. Cette observation vient confirmer celle déjà faite par ailleurs [6]. La concordance entre la prévalence fournie par le RB et celui de la FC est bonne et d'environ 89% (Tableau XIII). Elle est supérieure à celle antérieurement signalée (70,1% [6]). Bien que la fixation du complément détecte plus de sérums positifs

(13,2%) que le Rose Bengale (11%), la différence entre les deux méthodes n'est pas statistiquement significative. Dans ces conditions, on peut se satisfaire d'une seule réaction sérologique, en l'occurrence le RB (à cause de sa mise en œuvre simple, commode, et des résultats rapides), mais il faut le répéter régulièrement.

**Tableau XIII.** Brucellose bovine : résultats analytiques des deux réactions.

Réponse sérologique	RB	FC	Nombre de sérums	%
-	-	-	373	82,3 ± 3,9
	+	-	20	4,4 ± 9,0
+	+	+	30	6,6 ± 8,9
	-	+	30	6,6 ± 8,9
Total			453	

En chlamydie, la prévalence relativement faible ( $2,3 \pm 1,3\%$ ) signe tout de même une évidence sérologique, donc une circulation du germe, beaucoup plus accentuée, dans la région maritime et dans celle des plateaux en zone guinéenne. Ce résultat est largement inférieur à ceux signalés en Afrique Centrale (31,5% [2,14]).

En fièvre Q également, la prévalence est faible ( $3,5 \pm 1,6\%$ ). Ce résultat n'est pas influencé par les facteurs région et climat puisque la région de la Kara en zone soudanienne, et celles des Plateaux et Maritime (en zone guinéenne) ont les prévalences les plus élevées. Les conditions d'élevage ne semblent pas non plus déterminantes, puisque les troupeaux encadrés (Centre d'Avétonou) dans la région des Plateaux, où l'hygiène de l'élevage est sensée être meilleure qu'en élevage traditionnel, n'induit pas une diminution significative du taux d'infection (Tableau V). Si la prévalence moyenne relevée est supérieure à celles signalées au Cameroun (2,9% [14]) et au Soudan (1,6% [16]), elle est inférieure aux taux relevés au Tchad (13% [23]), en Tanzanie (13,3% [19]), au Kenya (7,4% [11]) mais aussi au Nigéria (10,6% [1]).

En fièvre de la Vallée du Rift, la technique ELISA a été préférée à l'Immunofluorescence Indirecte et à la Séroneutralisation en culture cellulaire car elle est simple, rapide, fiable, d'une grande sensibilité et d'une spécificité élevée. Par la mise en évidence des IgM et des IgG, elle permet de détecter les infections récentes ou anciennes. L'inconvénient de la méthode réside dans le coût relativement élevé des réactifs et dans le fait qu'elle ne peut être mise en œuvre que par un personnel qualifié.

La prévalence globale de 6,1% (9,4% chez les bovins et 2,14% chez les petits ruminants) témoigne d'une évidence sérologique en attendant l'isolement du germe.

Par comparaison avec les travaux réalisés en Afrique de l'Ouest, la prévalence trouvée chez les ovins est inférieure à celle signalée au Burkina (14,8% [7]), au Sénégal, région du Fleuve (19,33% [17]), en Côte d'Ivoire (9,71% [8]), au Cameroun (12,28% [10]), mais supérieure à celle du Bénin (1,7% [18]). Chez les bovins, la prévalence observée est identique à celle du Cameroun (9,35% [10]), mais inférieure aux taux observés au Bénin (20,75% [18]) et dans la vallée du Fleuve au Sénégal (27,43% [17]).

La prévalence globale varie selon les zones éco-climatiques. C'est ainsi que la zone guinéenne (régions maritime et des plateaux) semble plus touchée (6,6% et 10,7%) que la zone soudanienne où la région de la Kara se singularise par un faible taux (1,8%), mais avec des IgM (tout comme dans la région des plateaux) témoins d'une infection récente. Néanmoins, la prévalence de 6% observée dans la région des savanes, en pleine zone soudano-sahélienne, peut être liée au fort mouvement du bétail venant du Burkina voisin, où le germe a été isolé [29].

Dans toutes les régions, les bovins semblent plus affectés que les ovins. Ceci serait lié, non seulement à la période du prélèvement (fin de saison des pluies, moment de pleine activité des vecteurs pour les bovins, et saison sèche, moment d'activité réduite des vecteurs pour les ovins), mais aussi au faible taux de renouvellement de la population ovine. Comme dans la brucellose, chez les deux espèces, les animaux en production sont les plus infectés.

### **Importance de la brucellose, de la chlamydiose, de la fièvre Q et de la fièvre de la Vallée du Rift**

L'importance économique de ces maladies abortives est certaine. En effet, les avortements, les mortinatalités et stérilités représentent un manque à gagner non négligeable au niveau d'une exploitation [9], car ils tarissent l'élevage à sa source. Si on y ajoute le fait que certaines affections, comme la fièvre de la Vallée du Rift tuent les animaux, on se fait une idée plus exacte de l'importance des pertes, surtout en élevage contrôlé. Dans la ferme d'Avétonou, dans la région des plateaux, 52% d'infection brucellose a fait chuter le taux de vêlage à 3,3%, ce qui est une catastrophe.

L'étude analytique des résultats (Tableau XIV) montre qu'aucun animal n'héberge de façon concomitante les quatre germes, et très peu sont infectés par deux germes à la fois. En considérant globalement les quatre affections, on constate une nette prépondérance de l'affection brucellose dans toutes les régions. Les autres affections constituent un bruit de fond. En effet, la chlamydiose et la fièvre Q semblent avoir une incidence limitée et interviendraient sans doute assez peu dans les avortements au Togo, tout comme la FVR qui est plutôt une affection épisodique liée à une pluviométrie abondante et à une prolifération de vecteurs. Les ovins sont d'ailleurs les plus sensibles. Ainsi, devant le cas d'avortement sur bovin, il y a lieu d'éliminer l'hypothèse de brucellose avant de porter une présomption sur la chlamydiose, la fièvre Q ou la fièvre de la Vallée du Rift, sans oublier les autres causes infectieuses parasitaires ou nutritionnelles.

Les pertes économiques engendrées par la brucellose sont importantes et ont été déjà reconnues par d'autres auteurs au Maghreb [20], en Côte d'Ivoire [12,26], au Tchad et au Nord Cameroun [13], en Casamance au Sénégal [21].

Les pertes économiques dues à la fièvre Q sont tout aussi importantes à considérer comme le montrent les travaux de Maurice et Gidel [23] et Mir-Daboust [25]. Les travaux de Mage, Nicolas et Lafay [22] indiquent que la chlamydiose serait à l'origine de 20% des 3000 avortements étudiés chez la vache. De même en Afrique du Sud, les avortements d'origine chlamydienne chez le bétail ne seraient pas négligeables [15,30].

L'importance économique reconnue à ces affections se double aussi d'une importance hygiénique. Si la brucellose et la fièvre Q sont des zoonoses très répandues dans le monde entier, ils reconnaissent comme principal réservoir l'animal. L'homme a souvent été le

révélateur de brucellose, de fièvre Q et de fièvre de la Vallée du Rift évoluant à bas bruit chez l'animal. Cependant l'expression de la fièvre de la Vallée du Rift chez l'homme est une des plus spectaculaires tant la contagiosité est importante et sévère. Cela a été le cas au cours des dernières épizooties en Egypte en 1977-78 où il y a eu 600 décès sur des milliers d'atteintes et plus de 300 morts en 1987 en Mauritanie.

**Tableau XIV.** Brucellose, chlamydirose, et fièvre Q bovines : résultats analytiques.

Brucellose	Chlamydirose	Fièvre Q	Nombre de sérums	%
+	+	+	0	0
-	-	-	310	80,2 ± 4,3
-	-	+	10	2,5 ± 9,7
-	+	-	6	1,5 ± 9,7
-	+	+	1	0,3 ± 10,7
+	-	-	34	13,6 ± 9,1
+	+	-	3	0,8 ± 10,1
+	-	+	5	1,3 ± 9,9

## Conclusion

Parmi les affections infectieuses abortives du bétail au Togo, la brucellose est celle qui est la plus importante chez les bovins. La chlamydirose et la fièvre Q sont incontestablement secondaires par rapport à la brucellose. La prévalence de la fièvre de la Vallée du Rift est négligeable, mais l'évidence sérologique prouve que le virus circule à bas bruit dans le pays et ceci mérite d'être confirmé par son isolement. Il ne serait donc pas étonnant de voir apparaître une épizootie lorsque les conditions écologiques seront réunies, d'autant plus qu'il y a des zones de circulation active du virus. L'importance de ces différentes affections est à la fois économique et médicale, même si elle est méconnue. C'est pourquoi il serait utile de mener une lutte concertée contre ces différentes affections abortives du bétail au Togo.

## Références

1. Abdo P.B., Schnurenberger P.R. (1977). Q fever antibodies in food animals of Nigeria : a serological survey of cattle, sheep and goats. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 30 : 359-362.
2. Adamou A. (1982). Contribution à l'étude de la fièvre Q et de la chlamydirose bovine : enquête sérologique dans la province du Nord Cameroun. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar ; n° 7.
3. Akakpo A.J., d'Almeida A., Napala A., Sonhayé A. (1981). A propos d'un foyer de brucellose bovine dans les environs de Lomé : incidences hygiéniques. *Rev Sci Méd Biol Togo* ; 2 : 37-41.
4. Akakpo A.J., Chantal J., Bornarel P. (1981). La brucellose bovine au Togo : première enquête

- sérologique. *Rev Méd Vét* ; 132(4) : 269-278.
5. Akakpo A.J., Bornarel P., Sarradin P. (1986). *Brucella abortus* d'origine bovine en Afrique Tropicale. Particularités des souches isolées dans quatre pays : Niger, Rwanda, Sénégal, Togo. *Dakar Méd* ; 31(1-2-3-4) : 25.
  6. Akakpo A.J., Bornarel P. (1987). Epidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale : enquête clinique, sérologique et bactériologique. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 6(4) : 981-1027.
  7. Akakpo A.J., Some M.J.R., Bornarel P., Jouan A., Gonzalez J.P. (1989). Epidémiologie de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest. Enquête sérologique chez les ruminants domestiques au Burkina Faso. *Bull Soc Path Exot* ; 82 : 321-331.
  8. Atse N'De A. (1992) Epidémiologie des affections abortives majeures chez les ovins en Côte d'Ivoire : Etude sérologique de la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift dans les troupeaux suspects. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°50.
  9. Attonaty J.M., Gastiner P.L., Jalles E., Rhbier M; (1973). Conséquences économiques des troubles de la fécondité. Compte rendu journées d'information I.T.E.B. UNC, E.I.A. Paris p.35.
  10. Bapetel I. (1990). La fièvre de la Vallée du Rift : enquête sérologique chez les ruminants dans la partie septentrionale du Cameroun. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°31.
  11. Broww R.D. (1956). La mise en évidence, par tests sérologiques, de la fièvre Q chez les animaux domestiques au Kenya. *Bull Epiz Dis Afr* ; 4 : 115-119.
  12. Camus E. (1980). Incidence clinique de la brucellose bovine dans le nord de la Côte d'Ivoire. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 33(3) : 262-269.
  13. Domenech J., Coulomb J., Lucet P. (1982). La brucellose bovine en Afrique Centrale. IV. Evaluation de son incidence économique et calcul du coût/bénéfice des opérations d'assainissement. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 35(2) : 113-124.
  14. Domenech J., Trap D., Gaumont R. (1985). Etude de la pathologie de la reproduction chez les bovins en Afrique Centrale : enquête sur la chlamydie et la fièvre Q. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 38(2) : 138-143.
  15. Ehret W.L., Schutte A.P., Pienaar J.G., Henton M.H. (1975). Chlamydiosis in a beef herd. *J S Afr Vet Ass* ; 46(2) : 171-179.
  16. El Nasri M. (1962). A serological survey for the detection of Q fever antibodies in the sera of animals in the Sudan. *Bull Epiz Dis Afr* ; 10 : 55-57.
  17. Fati N.D. (1990). La fièvre de la Vallée du Rift dans la région de St Louis (Sénégal). Etude sérologique chez les ruminants domestiques et proposition d'un plan de lutte. Thèse Médecine Vétérinaire Dakar n°33.
  18. Gbaguidi Alia M. (1992). Epidémiologie de la fièvre de la Vallée du Rift au Bénin : enquête sérologique chez les ruminants domestiques. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°42.
  19. Humel P.H. (1976). Incidence in Tanzania of C.F. antibody to *Coxiella burneti* in sera from man, cattle, sheep, goats and game. *Vet Rec* ; 98 : 515-505.
  20. Karabaghli H. (1972). Contribution à l'étude des avortements du cheptel bovin en Algérie. Thèse Médecine Vétérinaire, Lyon n°38.
  21. Konte M. (1981). Des incidences d'une zoonose majeure infectieuse en zone d'enzootie : la brucellose bovine en Moyenne Casamance. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°2.
  22. Mage C., Nicolas K.A., Lafay E. (1976). Quelle est l'incidence des *Chlamydiaceae* sur les avortements de la vache ? *Rev Méd Vét* ; 127(11) : 1515-1522.
  23. Maurice Y., Gidel R. (1968). Incidence de la fièvre Q en Afrique Centrale. *Bull Soc Path Exot* ; 61(5) : 721-736.
  24. Meegan J.M., Leguenno B., Ksiazek J.G., Jouan A., Knauert F., Digoutte J.P., Peters C.J. (1989). Rapid diagnostic of Rift Valley Fever : a comparison of method of the direct detection of viral antigen in Human sera. *Res Virol* ; 140 : 59-65.
  25. Mir-Daboust C.J. (1981). Contribution à l'étude de la fièvre Q bovine. Thèse Médecine Vétérinaire, Toulouse n°80.

26. Pagot J. (1985). *L'élevage en pays tropicaux*. G.P. Maisonneuve et Larose/ACCT, Paris, 526p.
27. Perreau P. (1978). Epidémiologie et importance économique des brucelloses en Afrique tropicale. In : Deuxième Conférence Internationale des Institutions de Médecine Vétérinaire Tropicale Berlin Ouest, Octobre 1976, 5 exposés et discussion. Echborn : GTZ, 503 p.
28. Peters C.J., Eunis W.H., Turell M.J., Niklasson B. (1989). Rapid detection of Rift Valley Fever antigen in the serum of infected lamb. *Res Virol* : 140 : 43-46.
29. Saluzzo J.F., Chartier C., Bada R., Martinez D., Digoutte J.P. (1987). La fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* : 40(3) : 215-223.
30. Schutte A.P., Pienaar J.G. (1977). Chlamydiosis in sheep and cattle in South Africa. *J S Afr Vet Ass* ; 48(4) : 261-265.

