

D. Martinez ¹J. Swinkels ²E. Camus ¹F. Jongejan ²

Comparaison de trois antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte

MARTINEZ (D.), SWINKELS (J.), CAMUS (E.), JONGEJAN (F.). Comparaison de trois antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (2) : 159-166.

Les auteurs évaluent la possibilité d'utiliser comme antigène une lignée de cellules endothéliales bovines (E5) infectées *in vitro* par trois stocks de *Cowdria ruminantium* pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte. Cette méthode est comparée à celles utilisant des macrophages de souris infectés par le stock Kümme ou des neutrophiles de chèvres infectés par quatre stocks de *Cowdria*. La culture en cellules endothéliales permet de produire aisément et en continu de grandes quantités d'antigène à un faible coût. La lecture de la réaction est très rapide, comparée à la lecture souvent fastidieuse des lames de neutrophiles ou de macrophages. L'antigène E5 semble être plus spécifique que l'antigène Kümme, et les problèmes de sérotypes différents rencontrés lors de l'utilisation des neutrophiles semblent moins grands. *Mots clés* : *Cowdria ruminantium* - Antigène - Immunofluorescence indirecte - Cellule endothéliale bovine - Macrophage de souris - Neutrophile de chèvre.

INTRODUCTION

La mise au point d'un test sérologique pour la cowdriose a été entravée, jusqu'à récemment, par l'impossibilité de produire un antigène satisfaisant. Un test de floculation en tube capillaire (11) et un test de fixation du complément (5) utilisant comme antigène des extraits de cerveaux d'animaux infectés se sont avérés peu sensibles. En 1981, DU PLESSIS (6) utilisa pour la première fois des macrophages péritonéaux de souris infectés par le stock Kümme (9) dans un test d'immunofluorescence indirecte (IFI). SAHU et collab. (18, 19) observèrent par coloration de Giemsa, IFI et microscopie électronique la présence de *Cowdria ruminantium* dans des cultures de macrophages et de leucocytes de ruminants. Cependant, le très faible nombre de cellules infectées ne permit pas leur utilisation comme

antigène. La technique fut améliorée par LOGAN et collab. qui montrèrent la possibilité d'utiliser comme antigène pour IFI des cultures de neutrophiles de chèvres infectés par quatre souches différentes de *C. ruminantium* (17). En 1985, BEZUIDENHOUT et collab. (1) réussirent à cultiver *C. ruminantium* dans une lignée de cellules endothéliales bovines (E5). La possibilité d'effectuer des réactions d'IFI sur cellules endothéliales infectées a été décrite par JONGEJAN (13) et YUNKER et collab. (21) en 1989.

Dans la présente étude, on a tenté d'évaluer la possibilité et les avantages éventuels à utiliser comme antigène pour IFI des cultures de cellules endothéliales (lignée E5) infectées par trois stocks différents de *C. ruminantium*. La comparaison de cette technique avec les méthodes actuelles utilisant des macrophages de souris infectés par le stock Kümme ou des neutrophiles de chèvres a porté sur :

- la possibilité de produire facilement de grandes quantités d'antigènes spécifiques ;
- la facilité de lecture de la réaction ;
- l'aptitude à différencier des sérotypes (15) ;
- la corrélation entre les résultats des sérologies obtenus avec les trois types d'antigènes ;
- l'amélioration de la spécificité de la réaction par rapport à l'utilisation de l'antigène Kümme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les chèvres

Elles sont de race Créole et proviennent des Saintes, îles antillaises indemnes de cowdriose. Dès leur arrivée, elles ont été placées dans l'élevage expérimental, maintenues hors de tout contact avec des tiques vectrices de *C. ruminantium* et nourries *ad libitum*. Les animaux inoculés par voie intraveineuse ou par piqûre d'*Amblyomma variegatum* infectés ont été gardés en cages individuelles et leur température rectale relevée quotidiennement.

1. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, BP 1232, 97184 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe.

2. Faculté vétérinaire, Département des maladies infectieuses et d'immunologie, Section de médecine vétérinaire tropicale, BP 80.165, 3508 Utrecht, Pays-Bas.

Reçu le 8.12.89, accepté le 30.01.90.

Ce travail a été financé en partie par la Communauté Économique Européenne (DG XII, contrat n° TS2-0115-C).

D. Martinez, J. Swinkels, E. Camus, F. Jongejan

Cowdria ruminantium

Cinq stocks de *C. ruminantium* de provenances différentes ont été utilisés : Gardel (Guadeloupe, 20), Sénégal (14), Welgevonden et Kūmm (République sud-africaine, 7, 9) et Umm-Banein (Soudan, 12). Les stocks ont été conservés en azote liquide sous forme de stabilats de sang ou de cellules endothéliales infectées, ou par le biais d'*Amblyomma variegatum* (nymphes ou femelles) infectés.

Les sérums

Les onze sérums ayant servi à la comparaison des antigènes ont été récoltés une semaine au moins après le début de la réaction fébrile sur des chèvres inoculées expérimentalement ; 34 des 42 sérums bovins qui s'étaient révélés positifs avec l'antigène Kūmm lors d'une enquête sérologique dans les petites Antilles (4), alors qu'ils provenaient d'îles apparemment indemnes de cowdriose, ont été testés sur des cellules E5 infectées par le stock Gardel.

Production d'antigènes dans les neutrophiles

Ont été utilisés dans cette expérimentation les stocks Gardel, Welgevonden, Sénégal et Umm-Banein. Les cultures de neutrophiles infectés ont été effectuées selon la technique décrite par LOGAN et collab. (17). Au deuxième ou troisième jour d'hyperthermie, selon l'état général de l'animal, 50 à 120 ml de sang sont récoltés stérilement par ponction de la veine jugulaire à l'aide de seringues de 60 ml contenant 50 U/ml d'héparine. Le sang, réparti en aliquotes de 35 ml dans des tubes coniques de 50 ml, est centrifugé à 1 500 g pendant 15 minutes. Le plasma et la couche de leucocytes sont récoltés et la fraction restante lysée par addition de 20 ml d'eau distillée froide. Après 30 secondes, l'isotonicité est restaurée à l'aide de 10 ml de NaCl à 2,7 p. 100. La suspension cellulaire soigneusement homogénéisée est supplémentée avec 10 ml de tampon sucrose-phosphate-glutamate (SPG, 2) et centrifugée à 200 g pendant 10 min. Le surnageant est rejeté et le culot soumis à une deuxième lyse suivie d'un lavage en SPG (200 g/10 min). Le dernier culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu RPMI 1640 additionné de 10 p. 100 de sérum de veau foetal (SVF), de tampon HEPES 25 mM, de glutamine 2 mM, de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cultures réparties en flacons de 25 cm² sont mises à incuber à 37 °C sans CO₂. L'aspect des cellules est examiné quotidiennement au microscope inversé et le pourcentage de cellules infectées par *C. ruminantium* est évalué après cyto-centrifugation et coloration rapide de Field (RAL 555) d'un aliquote. Les antigènes sont préparés après

24 à 96 heures de culture. Pour cela, les cellules sont lavées trois fois en PBS (pH = 7,2) par centrifugation à 200 g pendant 10 min et la concentration finale est ajustée à 10⁶ cellules/ml. La suspension cellulaire est alors déposée sur des lames à immunofluorescence à raison de 10 µl par spot. Les lames sont séchées à l'abri de la poussière, fixées dans l'acétone à -20 °C et stockées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

Production d'antigènes dans les cellules endothéliales

Pour la production d'antigènes avec les stocks Sénégal, Welgevonden et Gardel, il a été utilisé une lignée de cellules endothéliales bovines (E5) cultivées dans du milieu Glasgow-MEM additionné de 10 p. 100 de SVF, 2,9 g/l de bouillon tryptose-phosphate et d'antibiotiques (1). La culture a été inoculée sans irradiation préalable avec le sang d'une chèvre en phase d'hyperthermie, récolté sur héparine et mélangé (V/V) à du milieu de culture. L'inoculum est déposé sur un tapis monocouche de cellules E5 à raison de 2 ml/25 cm². Après 2 heures d'incubation à 37 °C sur un agitateur à balancement (4 balancements par minute), les cellules sont soigneusement lavées avec du milieu de Hanks afin d'éliminer toute trace de sang. On ajoute alors 8 ml de milieu neuf dans tous les flacons qui sont replacés sur l'agitateur à 37 °C. Les cultures sont examinées tous les jours et le milieu changé une fois par semaine. Quand un intense effet cytopathogène (ECP) apparaît, les cellules adhérant encore au fond du flacon sont récoltées par trypsinisation ou raclage et mélangées au surnageant. La présence de *C. ruminantium* est vérifiée par coloration de Field. Les cellules infectées sont alors utilisées pour effectuer des passages sur cellules saines ou pour la préparation d'antigènes selon la technique décrite pour les neutrophiles.

Macrophages de souris infectés par le stock Kūmm

Les lames d'antigènes Kūmm ont été produites selon la technique décrite par DU PLESSIS (6) et conservées à -20 °C. Brièvement, des souris inoculées par voie intrapéritonéale sont sacrifiées lorsqu'elles commencent à montrer des symptômes cliniques : tremblements, prostration, poils ébouriffés. Les macrophages infectés sont récoltés par lavage de la cavité péritonéale avec du PBS. Les lames d'antigènes sont préparées comme précédemment.

Immunofluorescence indirecte

Les lames d'antigènes sont réchauffées à température ambiante avant utilisation. Elles sont placées dans un

bain de tampon glycine (pH = 2,8) pendant 10 min suivi d'un lavage au PBS (10 min). Les sérums dilués du 1/80 au 1/20480 dans du PBS sont déposés à raison de 10 μ l par spot et par dilution. Sur chaque lame, un sérum négatif dilué au 1/80 sert de témoin de spécificité. Après une incubation de 30 min à 37 °C en atmosphère humide, les lames sont lavées trois fois dans du PBS pendant 5 min. On ajoute alors le sérum anti-IgG caprines ou bovines conjugué à la fluorescéine, dilué au 1/60 et contenant 0,02 p. 100 de bleu Evans. Une nouvelle incubation de 30 min à 37 °C est suivie de trois lavages en PBS. Les lames sont montées avec du Fluoprep (Bio-Mérieux) et examinées au microscope à immunofluorescence aux grossissements x 100 et x 500. Le titre du sérum est donné par la dernière dilution positive.

Analyse statistique

Le calcul du coefficient de corrélation entre les titres sériques correspondant aux couples sérum-stock de *Cowdria* homologues a permis de comparer les antigènes neutrophiles et E5. De même, on a calculé les corrélations existant entre les séries de résultats macrophages-Kümm/neutrophiles-Sénégal, macrophages-Kümm/neutrophiles-Umm-Banein, macrophages-Kümm/E5-Sénégal, macrophages-Kümm/E5-Welgevonden, macrophages-Kümm/E5-Gardel, macrophages-Kümm/E5- (couples sérum-stock homologues).

RÉSULTATS

Cultures de neutrophiles

Sur dix chèvres inoculées, cinq sont mortes subitement sans avoir présenté d'hyperthermie de plus de quelques heures. Elles n'ont pu de ce fait être utilisées pour la préparation d'antigènes, à l'exception d'une seule (CP 8823) dont le sang a été prélevé par ponction intracardiaque au moment de la mort (Tabl. I). Quatre cultures sur les cinq effectuées se sont avérées positives, mais seul le stock Sénégal a donné des taux de cellules infectées suffisants (5 et 35 p. 100). L'infection des neutrophiles avec le stock Gardel n'a pu être révélée que par IFI (coloration de Field sans succès). Le nombre très faible de cellules infectées et la petite taille des morula n'ont pas permis leur utilisation comme antigène. Le taux d'infection des cellules par le stock Welgevonden est resté faible et l'antigène était de mauvaise qualité. Dans tous les cas, 72 heures de culture ont été nécessaires pour que les cellules infectées puissent être utilisées comme antigènes.

Culture de cellules endothéliales

Les trois essais ont été positifs (Tabl. I). A l'isolement, la destruction de 90 p. 100 du tapis cellulaire a eu lieu en 15 à 20 jours. Dans nos conditions de culture, le cycle de *Cowdria ruminantium* dure 5 à 6 jours. Il se termine par l'éclatement des morula et la libération des corps élémentaires, entraînant la mort des cellules hôtes. Au cours des passages, la destruction du tapis cellulaire est quasi complète en 1 à 2 cycles soit 6 à 12 jours. A ce stade, 90 à 100 p. 100 des cellules sont infectées quel que soit le stock.

TABLEAU I Résultats des infections expérimentales.

N° caprin	Stock de <i>Cowdria</i>	Inoculum	Évolution de la maladie	Neutrophiles		Cellules E5
				Field*	IFI**	
911	Sénégal	Sang	Mort***	NF	NF	NF
8823	Sénégal	Sang	Mort***	+ (35)	+ (35)	NF
237	Sénégal	Sang	Survie	-	-	NF
218	Sénégal	Sang	Mort	+ (5)	+ (5)	NF
920	Sénégal	Sang	Survie	NF	NF	+ (100)
8922	Welgevonden	Cellules E5	Mort***	+ (2)	+ (2)	+ (100)
914	Gardel	Sang	Mort***	NF	NF	NF
916	Gardel	10 F Av	Mort***	NF	NF	NF
948	Gardel	10 F Av	Mort	-	+ (1-2)	+ (100)
949	Gardel	10 N Av	Mort***	NF	NF	NF

* Coloration rapide après culture (RAL 555).

** Immunofluorescence indirecte après culture.

*** Mort sans symptômes.

NF : non fait.

- : culture négative ; + : culture positive ; entre parenthèses : pourcentage de cellules infectées.

Av : *Amblyomma variegatum* ; F : femelle ; N : nymphe.

Immunofluorescence indirecte

Le titre des 11 sérums utilisés pour comparer les différents antigènes figure dans les tableaux II et III. Seuls les résultats fiables ont été rapportés : pour les neutrophiles, les résultats ne figurent pas pour le stock Gardel, qui n'a pu être cultivé correctement, et sont incomplets pour Welgevonden dont l'antigène était de mauvaise qualité. On constate que les titres homologues sont supérieurs aux titres hétérologues, excepté pour le sérum S1 dont le titre sur l'antigène macrophage (Kümm) est supérieur d'une dilution au titre homologue obtenu sur neutrophiles (Tabl. II). Ce résultat paradoxal disparaît avec l'utilisation de cellules E5 (Tabl. III). L'aptitude de chaque antigène à distinguer des sérotypes a été quantifiée par le ratio : moyenne des titres homologues/moyenne des titres hétérologues. Le tableau IV montre que l'utilisation des neutrophiles permet de mieux révéler les sérotypes que les cellules endothéliales.

D. Martinez, J. Swinkels, E. Camus, F. Jongejan

TABLEAU II Résultats des sérologies effectuées sur neutrophiles et macrophages infectés par *Cowdria ruminantium*.

Sérum		Neutrophiles			Macrophages
Stock	Code	Sénégal	Welgevonden	Umm-Banein	Kümm
Sénégal	S1	2 560	1 280	1 280	5 120
	S2	2 560	1 280	1 280	2 560
	S3	1 280	640	1 280	1 280
	S4	5 120		640	1 280
	S5	2 560		640	1 280
Gardel	G1	320		640	2 560
	G2	320		640	1 280
	G3	320		1 280	2 560
	G4	320		640	640
	G5	80		320	320
Welgevonden	W1	160		160	1 280

TABLEAU III Résultats des sérologies effectuées sur cellules endothéliales infectées par *Cowdria ruminantium*.

Sérum		Cellules endothéliales		
Stock	Code	Sénégal	Gardel	Welgevonden
Sénégal	S1	10 240	2 560	5 120
	S2	5 120	5 120	2 560
	S3	1 280	1 280	1 280
	S4	10 240	2 560	1 280
	S5	2 560	1 280	640
Gardel	G1	1 280	2 560	640
	G2	2 560	5 120	1 280
	G3	1 280	5 120	1 280
	G4	640	1 280	640
	G5	640	640	640
Welgevonden	W1	1 280	640	1 280

TABLEAU IV Comparaison de l'aptitude des antigènes neutrophiles et cellules endothéliales à distinguer des sérotypes de *Cowdria ruminantium*.

	Neutrophiles		Cellules endothéliales	
	Titres homologues	Titres hétérologues	Titres homologues	Titres hétérologues
Moyenne*	2 816 (n = 5)	253 (n = 6)	5 888 (n = 5)	1 280 (n = 6)
Ratio**	11,1		4,6	

* Moyenne des titres exprimés en inverse de dilution.

** Ratio : moyenne des titres homologues/moyenne des titres hétérologues.

La comparaison des titres obtenus pour un même sérum sur les antigènes pris deux à deux montre (Tabl. V) :

— une bonne corrélation entre les titres sériques obtenus sur neutrophiles et sur cellules E5 ($P < 0,001$) ;

— aucune corrélation significative entre les résultats macrophages (Kümm) et neutrophiles ;

— aucune corrélation significative entre les résultats macrophages (Kümm) et cellules E5 excepté avec le stock Welgevonden ($P < 0,001$).

TABLEAU V Corrélation entre les résultats des sérologies effectuées avec les trois antigènes.

Comparaison des antigènes	n	Coefficient de corrélation	P
Neutrophiles/E5	14	0,84	< 0,001
Macrophages-Kümm/neutrophiles-Sénégal	11	0,24	NS
Macrophages-Kümm/neutrophiles-Umm-Banein	11	0,19	NS
Macrophages-Kümm/E5-Sénégal	11	0,21	NS
Macrophages-Kümm/E5-Gardel	11	0,29	NS
Macrophages-Kümm/E5-Welgevonden	11	0,87	< 0,001
Macrophages-Kümm/couples sérum-stock E5 homologues	11	0,25	NS

NS : non significatif.

Spécificité de la méthode

Trente-quatre sur 42 sérums bovins reconnus positifs vis-à-vis de *C. ruminantium* avec l'antigène macrophage (Kümm) au sein d'une population de 399 sérums, provenant de quatre îles antillaises où la cowdriose n'a jamais été observée, ont pu être titrés sur cellules E5 infectées par le stock Gardel. Dix-huit seulement se sont avérés positifs sur ce nouvel antigène. Le pourcentage de sérums positifs dans ces îles cliniquement indemnes passe donc de 10,5 à 5,6, si l'on admet que l'ensemble des sérums négatifs avec l'antigène Kümm le sont aussi avec l'antigène Gardel (sérums négatifs non titrés sur cet antigène). De plus, sur ces 18 sérums positifs, 8 ont un titre de seulement 1/80 qui constitue la limite de positivité communément admise avec l'antigène macrophage (Tabl. VI).

TABLEAU VI Comparaison des sérologies effectuées dans les petites Antilles sur macrophages de souris et cellules E5, respectivement infectées par les stocks Kümm et Gardel.

	Sérums positifs sur antigène Gardel					Sérums positifs sur antigène (p. 100)	
	Titre				Total	Kümm	Gardel
	80	160	320	640			
Martinique	7	3	1	0	11 n = 19*	10,2 (23/226)**	5,9***
St-Martin	1	0	1	0	2 n = 7	26,2 (11/42)	7,5
St-Kitts ¹	0	0	2	0	2 n = 5	8,3 (5/60)	3,3
Ste-Lucie ¹	0	1	1	1	3 n = 3	4,2 (3/71)	4,2
					18 n = 34	10,5 (42/399)	5,6

¹ A St-Kitts et Ste-Lucie, les sérums ont été prélevés par E.F. Birnie, de l'Université de Floride.

* Nombre de sérums testés positifs sur macrophages Kümm.

** Nombre de sérums positifs sur macrophages Kümm/nombre de sérums titrés.

*** 34 des 42 sérums positifs sur macrophages Kümm ont été titrés sur antigène Gardel. Les nouveaux pourcentages de sérums positifs dans les îles ont donc été calculés après péréquation; par exemple: $(11/19) \times (23/226) = 5,9$ p. 100 pour la Martinique.

DISCUSSION

Les résultats montrent la possibilité d'utiliser des cultures de cellules endothéliales bovines (lignée E5) comme antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose. Contrairement à la méthode initialement décrite par BEZUIDENHOUT et collab. (1), l'irradiation des cellules n'a pas été nécessaire à l'isolement des trois stocks de *C. ruminantium* testés (Sénégal, Welgevonden, Gardel). Le stock Gardel a été cultivé pour la première fois en cellules endothéliales lors de cette expérimentation (Photos 1 et 2). Il n'a pas été observé, comme BEZUIDENHOUT avec des stocks sud-africains de *C. ruminantium*, d'importantes différences dans l'aptitude à pousser *in vitro* (BEZUIDENHOUT, communication personnelle, 1986). Les trois stocks utilisés se sont comportés de façon identique en culture, donnant des taux d'infection proches de 100 p. 100 en 6 à 12 jours lors des passages successifs.

Dans les neutrophiles en survie, la croissance de *C. ruminantium* s'est avérée aléatoire et variable selon les stocks, certains tels que Sénégal et Welgevonden se développant mieux que d'autres (Tabl. I) (15). S'il est certain que cette méthode a amélioré le sérodi-

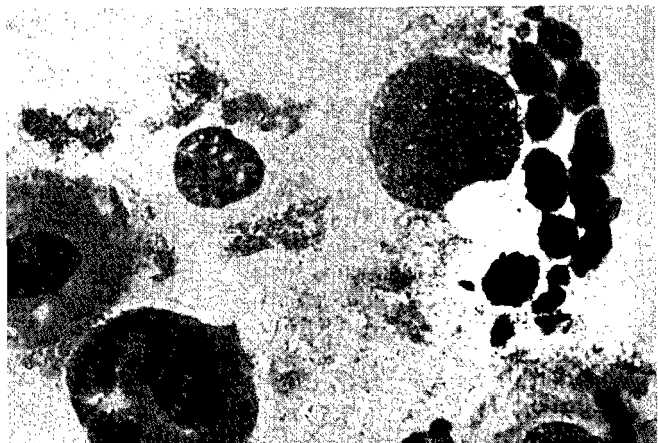
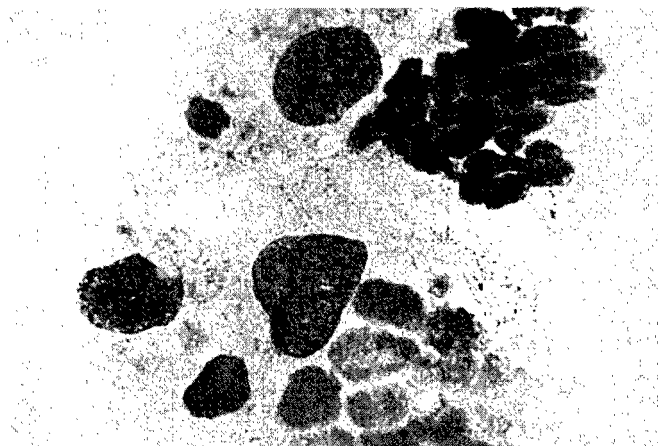
agnostic de la cowdriose par rapport à l'utilisation des macrophages de souris en termes de spécificité de l'antigène, elle est également plus fastidieuse, soumise aux mêmes aléas de production et, surtout, très dispendieuse en animaux.

La culture en cellules endothéliales permet de pallier ces inconvénients et de produire régulièrement (un passage tous les 7 à 12 jours en moyenne), en grande quantité (pratiquement 100 p. 100 de cellules infectées) et de façon peu onéreuse (plus de 30 lames à 21 spots par flacon de culture de 25 cm²), un antigène spécifique, même si des variations dans l'aptitude de certains stocks à pousser *in vitro* sont probables. De plus, la grande quantité de morula et de corps élémentaires présents (Photo 3) permet une lecture très rapide, comparée à la lecture fastidieuse des lames de neutrophiles et de macrophages (Photos 4 et 5).

L'existence de sérotypes, déjà mise en évidence sur neutrophiles (15), est confirmée aussi bien avec les neutrophiles qu'avec les cellules endothéliales. Leur mise en évidence est cependant meilleure avec les neutrophiles (Tabl. IV). Les titres obtenus sur cellules endothéliales sont toujours supérieurs à ceux obtenus sur neutrophiles en raison de la persistance plus longue de la fluorescence des corps élémentaires libres très nombreux dans l'antigène E5, par rapport à celle des morula intracellulaires. La corrélation entre les résultats obtenus avec ces deux antigènes reste cependant très bonne ($P < 0,001$) alors qu'elle ne l'est pas si la comparaison est faite avec l'antigène Kümm (Tabl. V). Contrairement aux résultats de DU PLESSIS et MALAN (10), cela suggère un manque de spécificité du stock Kümm. Il faut toutefois noter la très forte corrélation ($P < 0,001$) entre les stocks Kümm et Welgevonden produits respectivement en macrophages et en cellules endothéliales, laissant supposer l'existence d'une importante communauté antigénique entre ces deux stocks qu'il serait intéressant de confirmer par l'étude d'un plus grand nombre de sérums et des tests de protection croisée.

La moitié seulement des sérums bovins trouvés positifs avec l'antigène macrophage (Kümm) lors d'une enquête épidémiologique dans quatre îles des petites Antilles (4) s'est avérée positive avec l'antigène produit en cellules endothéliales (stock Gardel, Tabl. VI). Les problèmes d'interprétation des résultats (8) laissant supposer l'existence occulte de la cowdriose dans certaines de ces îles (Martinique et Saint-Martin notamment) ont donc pu résulter en grande partie d'un certain manque de spécificité de l'antigène Kümm. Ces sérums peuvent probablement être qualifiés de « faux positifs » et le chiffre de 5 p. 100 indique vraisemblablement la spécificité de la méthode. Il faut cependant noter que l'ensemble des sérums reconnus négatifs avec l'antigène macrophage n'ont pas été titrés sur cellules endothéliales. Ce travail, qui reste à accomplir, pourrait entraîner une légère modification des pourcentages précédents.

D. Martinez, J. Swinkels, E. Camus, F. Jongejan



Photos 1 et 2 : Cellules endothéliales bovines (lignée E5) infectées par *Cowdria ruminantium* (stock Gardel). Morulae intracellulaires. Coloration de Field (x 500 et x 1000).

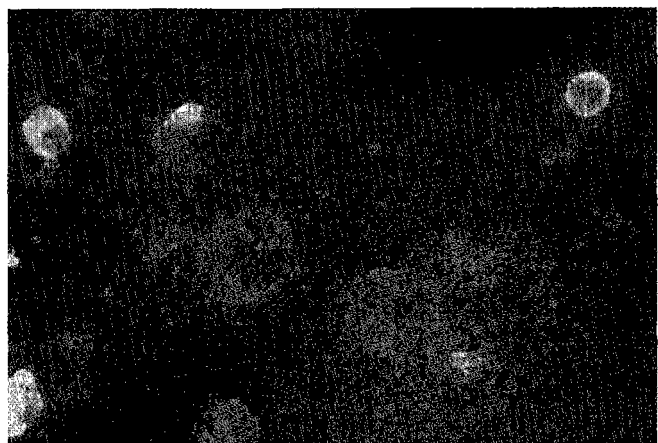


Photo 3 : Cellules endothéliales bovines (E5) infectées par *Cowdria ruminantium* (stock Sénégal). Nombreux corps élémentaires intra- et extracellulaires visibles en immunofluorescence indirecte (x 400).

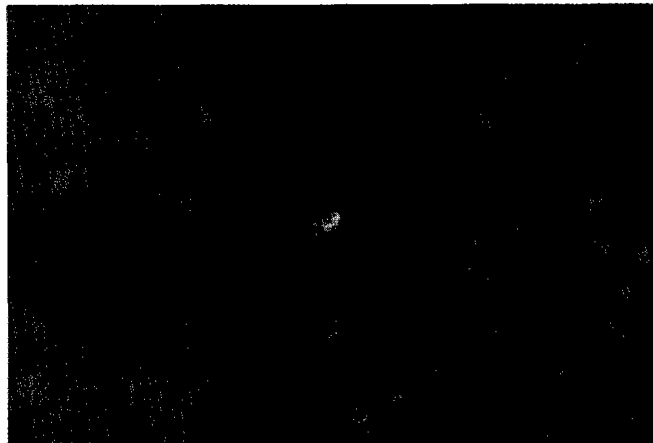


Photo 4 : Neutrophiles de chèvres infectés par *Cowdria ruminantium* (stock Sénégal). Morulae visibles en immunofluorescence indirecte (x 400).

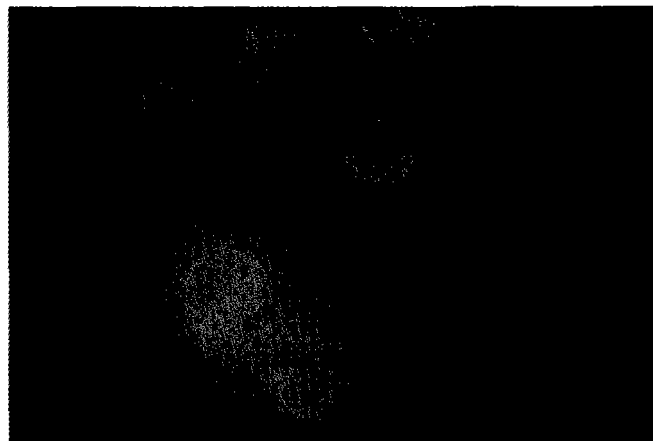


Photo 5 : Macrophages de souris infectés par *Cowdria ruminantium* (stock Kümm). Morulae visibles en immunofluorescence indirecte (x 400).

La présence d'ehrlichiose, dont certaines espèces présentent des réactions sérologiques croisées avec *C. ruminantium* (8, 16), peut être à l'origine d'un certain nombre de sérums qualifiés à tort de positifs. Une proportion de sérums positifs inférieure à 5 p. 100 dans une île ne permet toutefois pas, à elle seule, d'affirmer formellement l'absence de maladie, comme l'atteste le cas d'Antigua où la cowdriose existe mais où seulement 4 p. 100 des sérums (n = 184) ont été trouvés positifs sur macrophage Kümm (3). On peut cependant raisonnablement admettre que la cowdriose n'existe pas dans les îles cliniquement indemnes où le pourcentage de sérums positifs avoisine 5 p. 100 et où de multiples essais de mise en évidence de l'agent pathogène sont restés infructueux, comme c'est le cas pour la Martinique, Saint-Kitts et Sainte-Lucie. A Saint-Martin, le faible nombre de tiques à

partir duquel les essais d'isolement de *C. ruminantium* ont été effectués ne permet pas d'être aussi affirmatif.

CONCLUSION

Les cellules endothéliales infectées se sont révélées à bien des égards supérieures aux macrophages de souris et aux neutrophiles de chèvre comme antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par IFI. L'existence de sérotypes chez *C. ruminantium* peut cependant constituer une complication. La méthode n'est

en outre pas idéale pour les enquêtes épidémiologiques à grande échelle et devrait être remplacée dans un proche avenir par un test ELISA.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr J.D. BEZUIDENHOUT pour le don de la lignée cellulaire E5 et le Dr G. UILENBERG pour la correction du manuscrit et les suggestions très constructives apportées à ce travail.

MARTINEZ (D.), SWINKELS (J.), CAMUS (E.), JONGEJAN (F.). Comparison of three antigens for the serodiagnosis of heartwater by indirect fluorescent test. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (2) : 159-166.

A cell line of bovine endothelial cells (E5), infected with 3 different stocks of *Cowdria ruminantium*, was used as antigen in an indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of heartwater. These antigens were compared to peritoneal macrophages from mice infected with the Kümm stock and to caprine neutrophils in primary cultures from goats infected with 4 different stocks of *Cowdria*. The use of endothelial cell cultures proved to be superior in all respects. The antigens can be produced in large quantities at a low cost, contrary to the other types. The reaction is easily and quickly read, compared to the laborious reading of neutrophil or macrophage antigens which often contain few and small colonies of *Cowdria*. Moreover, not all stocks are suitable for the preparation of neutrophil antigens, while macrophage antigen can only be obtained with the Kümm stock. Endothelial cell antigens also distinguish serotypes in *C. ruminantium*, but these differences seem to be less pronounced than those found with neutrophil antigens. Finally, the specificity of endothelial cell antigens appears to be better than that of Kümm antigen and comparable to that of neutrophil antigens. The use of Kümm antigen may have been responsible to a large extent for past unexplained positive serological results on certain Caribbean islands where it has not been possible to isolate *Cowdria* and where no clinical evidence of the disease has been found. *Key words* : *Cowdria ruminantium* - Antigen - Indirect fluorescent antibody test - Bovine endothelial cell - Mouse macrophage - Goat neutrophil.

MARTINEZ (D.), SWINKELS (J.), CAMUS (E.), JONGEJAN (F.). Comparación de tres antígenos para el serodiagnóstico de la cowdriosis por inmunofluorescencia indirecta. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (2) : 159-166.

Los autores evalúan la posibilidad de utilizar como antígeno una línea de células endoteliales bovinas (E5), infectadas *in vitro* por tres especímenes de *Cowdria ruminantium* para el serodiagnóstico de la cowdriosis por inmunofluorescencia indirecta. Este método es comparado con aquellos que utilizan macrófagos de ratón infectados con el stock Kümm o neutrófilos de cabra infectados por cuatro stocks de *Cowdria*. El cultivo en células endoteliales permite la producción fácil y continua de grandes cantidades de antígeno, a bajo costo. La lectura de la reacción es muy rápida, si se compara con la lectura, a menudo fastidiosa, de las láminas de neutrófilos o de macrófagos. El antígeno Kümm y los problemas de diferentes serotipos encontrados al utilizar los neutrófilos son al parecer menores. *Palabras claves* : Inmunofluorescencia indirecta - Célula endotelial bovina - Macrófago de ratón - Neutrófilo de cabra.

BIBLIOGRAPHIE

1. BEZUIDENHOUT (J.D.), PATERSON (C.L.), BARNARD (B.J.H.). *In vitro* cultivation of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1985, 52 : 113-120.
2. BOVARNICK (M.R.), MILLER (J.C.), SNYDER (J.C.). The influence of certain salts, amino acids, sugars, and proteins on the stability of Rickettsiae. *J. Bact.*, 1950, 59 : 509-522.
3. CAMUS (E.). Contribution à l'étude épidémiologique de la cowdriose (*Cowdria ruminantium*) en Guadeloupe. Thèse doct. es-Sciences, Univ. Paris-Sud, 1987. 202 p.
4. CAMUS (E.), BARRÉ (N.). Epidemiology of heartwater in Guadeloupe and in the Caribbean. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1987, 54 : 419-426.

5. DU PLESSIS (J.L.). Mice infected with a *Cowdria ruminantium*-like agent as a model in the study of heartwater. Thesis vet. Sci., Univ. Pretoria, 1981. 157 p.
6. DU PLESSIS (J.L.). The application of the indirect fluorescent antibody test to the serology of heartwater. In : Proc. of international congress on tick biology and control, Rhodes University, Grahamstown, South Africa, 1981. P. 47-52.
7. DU PLESSIS (J.L.). A method for determining the *Cowdria ruminantium* infection rate of *Amblyomma hebraeum*; effects in mice injected with tick homogenates. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1985, **52**: 55-61.
8. DU PLESSIS (J.L.), CAMUS (E.), OBEREM (P.T.), MALAN (L.). Heartwater serology: some problems with the interpretation of results. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1987, **54**: 327-329.
9. DU PLESSIS (J.L.), KUMM (N.A.L.). The passage of *Cowdria ruminantium* in mice. *J. S. Afr. vet. Ass.*, 1971, **42** (3): 217-221.
10. DU PLESSIS (J.L.), MALAN (L.). The application of the indirect fluorescent test in research on heartwater. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1987, **54**: 319-325.
11. ILEMOBADE (A.A.), BLOTKAMP (J.). Preliminary observations on the use of the capillary flocculation test for the diagnosis of heartwater (*Cowdria ruminantium* infection). *Res. vet. Sci.*, 1976, **21**: 370-372.
12. JONGEJAN (F.), MOZARIA (S.P.), SHARIFF (O.), ABDALLA (H.M.). Isolation and transmission of *Cowdria ruminantium* (causal agent of heartwater disease) in Blue Nile Province. *Sudan. vet. Res. Communs*, 1984, **8**: 141-145.
13. JONGEJAN (F.), THIELEMANS (M.J.C.). Antigenic analysis of the tick-borne rickettsia *Cowdria ruminantium*. In : Proc. of the 6th international conference of institutes for tropical veterinary medicine, Wageningen, The Netherlands, 28 august-1 september 1989. Utrecht, University of Utrecht, 1990. P. 305-309.
14. JONGEJAN (F.), UILENBERG (G.), FRANSSSEN (F.J.), GÜEYE (A.), NEUWENHUIJS (J.). Antigenic differences between stocks of *Cowdria ruminantium*. *Res. vet. Sci.*, 1988, **44**: 186-189.
15. JONGEJAN (F.), WASSINK (L.A.), THIELEMANS (M.J.C.), PERIE (N.M.), UILENBERG (G.). Serotypes in *Cowdria ruminantium* and their relationship with *Ehrlichia phagocytophila* determined by immunofluorescence. *Vet. Microbiol.*, 1989, **21**: 31-40.
16. LOGAN (L.L.), HOLLAND (C.J.), MEUS (C.A.), RISTIC (M.). Serological relationship between *Cowdria ruminantium* and certain ehrlichia. *Vet. Rec.*, 1986, **119**: 458-459.
17. LOGAN (L.L.), WHYARD (T.C.), QUINTERO (J.C.), MEBUS (C.A.). The development of *Cowdria ruminantium* in neutrophils. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1987, **54**: 197-204.
18. SAHU (S.P.). Fluorescent antibody technique to detect *Cowdria ruminantium* in *in vitro* cultured macrophages and buffy coats from cattle, sheep and goats. *Am. J. vet. Res.*, 1986, **47** (6): 1253-1257.
19. SAHU (S.P.), DARDIRI (A.H.), WOOL (S.H.). Observation of *Rickettsia ruminantium* in leukocytic cell cultures from heartwater-infected goats, sheep, and cattle. *Am. J. vet. Res.*, 1983, **44** (6): 1093-1097.
20. UILENBERG (G.), CAMUS (E.), BARRÉ (N.). Quelques observations sur une souche de *Cowdria ruminantium* isolée en Guadeloupe (Antilles françaises). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1985, **38** (1): 34-42.
21. YUNKER (C.E.), BYRON (B.), SEMU (S.). *In vitro* cultivation of *Cowdria ruminantium* in bovine vascular endothelial cells. *Kenyan Vet.*, 1989.