

ETUDE BIOCHIMIQUE DU GENRE BRUCELLA PAR UNE MICROMETHODE NORMALISEE (*)

PREMIERS RESULTATS

Par L. JOUBERT, L. VALETTE et S. ALE-AGHA (**)

La microméthode d'identification enzymatique proposée par Buissière (3) a été appliquée au genre **brucella**. Toutefois, les exigences nutritionnelles spéciales de ce groupe bactérien orientent vers la recherche quantitative de certains tests (uréase, résistance aux colorants antiseptiques, thionine, fuchsine et safranine), grâce à une méthode fondée sur la croissance bactérienne, à l'image des Lactobacilles (Paule, 19).

Le double dessein de cette tentative, semblable aux précédentes (Joubert et coll., 10, 11), concernait :

- l'identification rapide, sur **plaque restreinte**, de l'**espèce** brucellique en cause, en laboratoire de diagnostic, en vue d'une exploitation rationnelle et régulière de la masse des prélèvements examinés en France, à l'occasion de la prophylaxie réglementée de la brucellose animale;
- la précision, à terme, sur **plaque complète**, du **biotype** ou de la **souche** en cause, en laboratoire de recherche spécialisé, en vue de l'identification fine et de la caractérisation biochimique de la souche isolée, d'intérêt épidémiologique (Joubert et Buissière, 12).

En effet, la prophylaxie spécifique de ce fléau économique et de cette zoonose majeure bénéficierait largement de la reconnaissance des filiations épidémiologiques, seule apte à désigner à l'attention de l'hygiéniste les sources de **Brucella**, donc les points d'attaque de la lutte.

La méthode biochimique (inhibiteurs compris), un des fondements du classement du genre **Brucella** (Tableau n° 1), semble un utile complément (Bruce et Jones, 2; Stableforth et Jones, 23):

(*) Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. comparée, Lyon 1972, 74.

(* *) Pour les détails, consulter ALÉ-AGHA (S). Thèse de Maîtrise es Sciences Vétérinaire Lyon 1971.

- d'une part, de l'agglutination séparative de **Br. abortus** (A) et de **Br. melitensis** (M), mais non de **Br. abortus** et **Br. suis** (Jones, 9), voire de la précipitation en gélose (Gargani et Guerra, 5; Olitzki et Sulitzeanu, 17) ou de l'immuno-électrophorèse (Gaumont et Thorel, 6);
- d'autre part, de la lysotypie par le phage Tb, apte à séparer **B. abortus** de, conjointement, **Br. melitensis** et **Br. suis** (Dimitriu et coll., 4; Parnas, 18; Meyer et Morgan, 15), et renouvelée de Meyer et Cameron (16) et de Renoux et Philippon (22, 20).

Outre sa simplicité et sa rapidité, la méthode ici proposée présente l'avantage de l'exploration d'un nombre élevé de caractères qui, seule, permettrait éventuellement la séparation de la souche à l'intérieur du biotype et de l'espèce, sur la base de la stabilité biologique du genre (Mc Cullough et Béal, 14) et avec la possibilité d'étendre encore la gamme d'investigations pour une meilleure classification (Renoux, 21).

Il est nécessaire d'indiquer l'irrégularité des résultats obtenus, tenant sans doute, à la fois, à l'inadéquation du milieu d'étude de base, à la plasticité considérable de ce genre bactérien, voire à l'identification initiale erronée de certaines souches, quelquefois peut-être polluées. Seule la détermination du genre et de l'espèce reste certaine, celle du biotype et de la souche exigeant d'autres recherches.

1. — MATERIEL, METHODES ET TECHNIQUES

a) Les souches étudiées, au nombre de 66 (19 **Br. melitensis**, 33 **Br. abortus**, 4 **Br. suis**, 10 indéterminées) provenaient de la collection de l'Institut Mérieux et l'Ecole Vétérinaire — Lyon, France — ainsi que de l'Institut Razi (Hessarak - Téhéran, Iran) avaient été isolées de bovins, d'ovins, de porcins, de lièvres, de chacal, d'homme; elles comprenaient aussi trois souches vaccinales: **Br. abortus 19** (U.S.A.), **Br. abortus 45/20**, **Br. melitensis H 38** (Renoux), la première séparable en général par sa CO₂ indépendance (Huddleson, 7; Jones et Montgomery, 8), sa pénicillino-sensibilité, son uréase positivité (Van Drimmelen, 24) et son érythritol sensibilité (Keppie et coll., 13). En outre, la comparaison a été également effectuée avec les trois biotypes de **Br. melitensis**, sept des neuf biotypes de **Br. abortus** et les trois biotypes de **Br. suis** (Tableau n° 1)*.

b) Le matériel d'étude correspond au dispositif de croissance bactérienne

* Nous remercions vivement le pr RENOUX (Tours) et le Dr GAUMONT (Alfort), d'avoir mis à notre disposition leurs souches de collection.

normalisée aujourd'hui présenté sous le nom «API» (Balmes-les-Grottes - 38) de recherche, portant sur 99 caractères (Tableau n° 2), comprenant des séries de tubes (C.G.A.) plastifiés (contenance 0,15 ml), avec orifice pour l'introduction de la suspension bactérienne. Ce matériel s'inscrit dans le cadre d'une automatisation pour l'établissement d'une classification des genres bactériens.

c) La **suspension bactérienne** de bactéries vivantes doit demeurer non proliférative. Délicate à définir (Brinley-Morgan, 1), elle dérive d'une culture initiale, de production, comprenant: trypticase BDM, lactalysate, myosate, acidase polypeptone, glucone, sulfate ferreux, sulfate de manganèse, hyposulfite de soude, vitamine B12, vitamine B1, vitamine PP, panthoténate de calcium.

Le glucose n'interfère pas avec les réactions métaboliques interrogées, mais doit être supprimé (formule identique sans glucose) pour la recherche de la résistance à la fuchsine et à la thionine.

A partir de la culture mère, trois suspensions denses doivent être préparées:

- la première en **milieu nutritif** (Trypticase BDM, extrait de levure), ajustée à $\text{PH} = 7,5$, pour les réactions de 0 à 49 (7 ml pour chacune);
- la seconde en **milieu de production sans glucose**, pour les réactions à la fuchsine et à la thionine, après addition d'une goutte de résazurine à 1‰ comme pour les tubes 11 à 50;
- la troisième en **eau distillée** (extrait de levure), pour les réactions de 50 à 99.

L'incorporation de une à deux gouttes d'huile de paraffine dans chaque tube crée un milieu anaérobie favorable aux réactions recherchées. Pour la sécurité de l'opérateur, les manipulations peuvent se dérouler en hotte étanche stérile, qui n'apparaît cependant nullement nécessaire, sous réserve de manipulations prudentes et du transport du matériel d'étude à l'étuve sous couvercle de plastique.

d) La **lecture** intervient après 24, 48 et 72 heures d'étuve à 37°C et les résultats sont reportés sur des diagrammes standardisés, aptes à définir le «profil métabolique» de base du genre et de chaque espèce, en vue d'un traitement ultérieur par ordinateur.

Seules quatre séries échappent à cette règle générale: la recherche quantitative de l'uréase sur dix tubes, appréciée après 6 heures, et celle de l'inhibition par les colorants antiseptiques fuchsine, thionine et safranine, appréciée après 24 heures.

TABLEAU 1

Différenciation des espèces et des biotypes de *Brucella* (sous-comité de taxonomie du genre, STABLEFORTH et JONES, 23)
 Consulter également com. mixte F.A.O./O.M.S. experts Brucellose 5^e rapport, Genève 1971.

Espèces	Type	Exigence en CO ₂	Production de SH ₂	Culture sur (1)		Agglutination avec sérum monospécifique		PHAGE TB ALA RTD	Tests métaboliques (2)			
				thionine	fuchsine basique	A	M		ac. gluta- mique	ornithine	ribose	lysine
<i>B. melitensis</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. abortus</i>	1	— (-) (3)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	— (-)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	— (-)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	9	— ou —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. suis</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	— (-)	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. neotomae</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— ou —	—

(1) La différenciation des espèces est obtenue sur milieu Trypticase Say Agar (BBL) contenant 1 80 000 de colorants parvenant de la National Aniline Division of Allied Division and Dye CO New York. Il faut utiliser des souches de référence de chaque espèce pour l'interprétation des résultats.
 (2) Les quatre substrats permettent la différenciation. Il est cependant recommandé d'utiliser d'autres substrats pour les souches atypiques.
 (3) Habituellement positifs, variétés négatives pouvant être isolées.

TABLEAU 2

Séparation biochimique du genre et des espèces de *Brucella* sur 42 caractères sur 99 interrogés

Biochimie	Espèces de <i>Brucella</i>		
	<i>B. melitensis</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. suis</i>
Glycerol			
Xylose			
Adonitol			
Sorbose			
Rhamnose			
Dulcitol			
Inositol			
Mannoside			
Méthyl-glucoside			
Mélibiose			
Inuline		constants 0	
Mélezitose			
Raffinose			
Amylose			
Amidon			
Laurate			
Palmitate			
Stéarate			
Benzoyl-phényl-alanine β naphtyl			
ONPG			
Tryptophane			
Indole			
L (+) Arabinose			
Nonanoate			
Alanyl } naphtylamine			
Leucyl }			
Arginine }			
Phénylalanine		constants +	
Nitrate de potassium			
Tellurite			
Résazurine			
TTC			
BT			
Urée	+ (6 h.)	+ (24 h.)	+ (1 h.)
Glucose	+	+	+
Amygdaline	0	-	0
Fuchsine 1/50 000	+	+	0
Thionine 1/50 000	0	+	+
Rhamnose	+	0	0
Inositol	+	0	0
Arabinose	+	0	+
SH ₂	+ (6 h.)	0	+

II. — RESULTATS

En dépit de l'irrégularité des résultats obtenus, il est possible de distinguer:

- le genre **Brucella** (Tableau n° 2) grâce à:
 - 22 caractères constamment **négatifs** (glycérol, xylose, adonitol, sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, mannoside, méthyl-glucoside, mélibiose, inuline, mélézitose, raffinose, amylose, amidon, laurate, palmitate, stéarate; benzoyl-phénylalanine β naphtyl, ONPG, tryptophane et indole);
 - 11 caractères constamment **positifs** (L (+) arabinose, nonanoate, alanyl, leucyl et arginine-naphtylamine, phénylalanine, nitrate de potassium, tellurite, résazurine, TTC et BT);
 - l'espèce **Br. melitensis**, **Br. abortus** ou **Br. suis**, grâce à 9 caractères distinctifs (Tableau n° 2): urée, glucose, amygdaline, fuchsine, thionine, rhamnose, inositol, arabinose, SH2. Les tests de l'urée et des trois colorants antiseptiques sont quantitatifs (Tableau n° 3).

En revanche, en l'état actuel des investigations, la microméthode API ne permet de distinguer ni le biotype, ni la souche, ni l'origine zoologique, ni la provenance géographique. Des recherches complémentaires portent actuellement sur la définition d'un autre milieu de base et certaines modifications techniques aptes à s'opposer à la plasticité enzymologique de ce genre bactérien.

CONCLUSIONS

1° La microméthode d'identification biochimique rapide par croissance bactérienne normalisée, portant sur 99 caractères, en tubes «API», a été appliquée au genre **Brucella**.

2° Il paraît possible, par cette méthode, de séparer le genre **Brucella** (22 caractères négatifs, 11 positifs constants) et les trois espèces **Br. melitensis**, **Br. abortus**, **Br. suis** (9 caractères variables en qualité ou en quantité, avec recherche quantitative des tests de l'uréase et de l'inhibition par les trois colorants fuchsine, thionine et safranine).

3° En revanche, ni la caractérisation du biotype, ni celle de la souche ne semblent encore possibles, en dépit de l'intérêt épidémiologique qui s'y attache. L'irrégularité des résultats oriente vers la définition d'un milieu de base plus adéquat et vers certaines modifications techniques destinées à s'opposer à la plasticité enzymologique de ce genre bactérien.

4° Economique, rapide, sans danger pour l'opérateur, la méthode se

TABLE AU 3

Tests quantitatifs de l'uréase, de la croissance en présence de fuchsine, de thionine et de safranine pour la différenciation des trois espèces de *Brucella*

Urée après 6 heures

(+ : virage à pH alcalin)

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Souche / Tampon	2,0 N	1,7 N	1,4 N	1,1 N	0,9 N	0,7 N	0,5 N	0,3 N	0,2 N	0,1 N	témoin
<i>B. melitensis</i> n° 1326									+	+	
<i>B. abortus</i> n° 1071						+	+	+	+	+	
<i>B. suis</i> n° 1161	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Fuchsine après 24 heures

(+ : culture - - : inhibition - témoin : milieu sans inhibiteur)

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Souche / Concentration fuchsine	1 5 000	1 5 600	1 6 600	1 8 000	1 10 000	1 13 000	1 20 000	1 40 000	1 100 000	témoin
<i>B. melitensis</i> n° 1326	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. abortus</i> n° 1071	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. suis</i> n° 1161	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Thionine après 24 heures

(+ : culture - - : inhibition - témoin : milieu sans inhibiteur)

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Souche / Concentration thionine	1 5 000	1 5 600	1 6 600	1 8 000	1 10 000	1 13 000	1 20 000	1 40 000	1 100 000	témoin
<i>B. melitensis</i> n° 1326	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. abortus</i> n° 1071	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>B. suis</i> n° 1161	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Safranine après 24 heures

(+ : culture - - : inhibition - témoin : milieu sans inhibiteur)

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Souche / Concentration safranine	1 5 000	1 5 600	1 6 600	1 8 000	1 10 000	1 13 000	1 20 000	1 40 000	1 100 000	témoin
<i>B. melitensis</i> n° 1326	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. abortus</i> n° 1071	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. suis</i> n° 1161	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

montre apte à favoriser l'exploitation complète des prélèvements acheminés dans les laboratoires de diagnostic, en vue d'une prophylaxie rationnelle.

SUMMARY

The authors describe a quick method for separation of genus *BRUCELLA* with 22 negative and 11 positive results among 99 bio chemical tests. It is possible to separate also the three species *B. MELITENSIS*, *B. ABORTUS* *B. SUIIS* by the help of 9 variable tests, but neither the biotype nor the strain.

In addition, the method shows many irregular responses and claims further observations in view of epidemiologic studies.

BIBLIOGRAPHIE

1. BRINLEY-MORGAN (W.-J.). — Res. Vet. Sci., 1, 1960, p. 47.
2. BRUCE (W.) et JONES (L.-M.). — Bull. O.M.S., 19, 1958, p. 187.
3. BUISSIERE (J.) et NARDON (A.). — Ann. Inst. Past. Paris, 115, 1958, p. 218.
4. DIMITRU (O.), CERBU (A.-L.) et VASILESCO (Th.). — Arch. Roum. Path. Path. Exp. 18, 1959, p. 475.
5. GARGANI (G.) et GUERRA (M.). — Bull. Ist. Sier. Milan, 41, 1962, p. 227.
6. GAUMONT (R.) et THOREL (F.). — Intern. Symp. on Brucellosis, Tunis 1968. Symp. Ser. Imm. Stand. 12, 1970, p. 287-290 (Karger, Basel N. Y.).
7. HUDDLESON (I.-F.). — Prim. Reun. Interam. Brucellosis Hôp. Gen. Sec. Salubr. Ass. Mexico D. R. 1948.
8. JONES (L.-M.) et MONTGOMERY (W.). — J. Inf. Dis. 115, 1965, p. 312.
9. JONES (L.-M.). — Bull. O.M.S., 19, 1958, p. 177-186.
10. JOUBERT (L.) et BUISSIERE (J.). — Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon, 70, 1968, p. 317.
11. JOUBERT (L.), BUISSIERE (J.) et CHIROL (C.). — Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon, 70, 1968, p. 159-170.
12. JOUBERT (L.) et BUISSIERE (J.). — Bull. Acad. Vét. France 42, 1969, p. 81.
13. KEPPIE (J.) et coll. — Res. Vet. Sci., 8, 1967, p. 294.
14. Mac CULLOUGH (N.-B.) et BEAL (G.-A.). — Bull. O.M.S. 19, 1958, p. 725.
15. MEYER (M.-E.) et MORGAN (W.-J.-B.). — Bull. O.M.S., 26, 1962, p. 823.
16. MEYER (M.-E.) et CAMERON (H.-S.). — J. Bact. 82, 1961, p. 387; Ann. J. Vet. Res. 19, 1958, p. 754.
17. OLITZKI (A.) et SULITZEANU (D.). — Proc. 3 rd meet. Biol. Stand. Opatija 1957, p. 321.
18. PARNAS (J.). — Bull. Off. Int. Epiz. 55, 1961, 1750-59.
19. PAULE (R.). — Contribution à l'étude biochimique du genre *Lactobacillus* par une méthode normalisée. Thèse Doct. Pharmacie, Lyon, 1971.

20. PHILIPPON (A.). — *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **115**, 1968, p. 367.
21. RENOUX (G.). — *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, **37**, 1960, p. 47.
22. RENOUX (G.) et PHILIPPON (A.). — *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **117**, 1969, p. 524.
23. STABLEFORTH (A.-W.) et JONES (L.-M.). — *Rep. Subcomit. Taxon, genus Brucella*
Intl. Bull. Bact. Nom. **13**, 1963, p. 145-158.
24. Van DRIMMELEN (G.-C.). — *Bull. Off. Int. Epiz*, **62**, 1964, p. 979-986.