

La réaction ELISA dans le diagnostic de la brucellose animale

L. Valette¹

VALETTE (L.). La réaction ELISA dans le diagnostic de la brucellose. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1987, 40 (4) : 341-345.

La réaction immuno-enzymatique (ELISA) peut être employée dans le diagnostic de la brucellose pour la recherche rapide de *Brucella* dans les excréments post-abortives mais surtout pour la recherche d'anticorps spécifiques.

Cette méthode sérologique indirecte peut mettre en évidence des classes particulières d'anticorps ou la totalité des anticorps. Elle est très sensible, spécifique et rapide. Elle peut remplacer valablement la méthode d'immunofluorescence indirecte dans le diagnostic sérologique de la brucellose humaine. Elle pourrait même être utilisée pour la recherche de la brucellose animale dans des troupeaux où seule la prophylaxie sanitaire est employée sans aucune intervention vaccinale. Mais son manque actuel de standardisation rend impossible la mesure en unités de référence et la comparaison d'un niveau d'anticorps avec celui obtenu par les méthodes usuelles : ceci rend son emploi délicat dans les zones où il convient de mesurer un taux d'anticorps post-vaccinal résiduel. L'utilisation d'antigènes solubles ou particuliers a été comparée et un début de standardisation est envisageable. *Mots clés* : Brucellose - Diagnostic - Technique immunologique - Test ELISA - Anticorps.

INTRODUCTION

La possibilité de détecter de très faibles quantités d'enzymes a orienté depuis 20 ans les biologistes à l'utilisation de ce marquage pour la détection des antigènes ou des anticorps. Le marquage enzymatique des protéines (3) s'est prolongé dans la pratique par la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Son application à la détection et au titrage d'anticorps ou d'antigènes de *Brucella* a déjà fait l'objet de nombreux travaux : c'est une synthèse qui en est présentée ici.

RAPPEL DU PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode consiste à utiliser un marqueur enzymatique qui sera fixé sur un anticorps et sera révélé par l'adjonction d'un substrat, qui, après action de

l'enzyme, se transformera en substrat coloré (Fig. 1). De nombreuses variantes de cette technique permettent de rechercher soit un anticorps soit un antigène, de doser ceux-ci soit directement par mesure d'une densité optique soit par compétition. Les anticorps peuvent être fixés sur une plaque (méthodes en phase hétérogène) soit rester en milieu liquide (phase homogène) pour doser des haptènes (3, 21).

Les immunoglobulines spécifiques peuvent être détectées avec cette méthode indirecte en utilisant des anticorps spécifiques de chaque classe d'immunoglobulines, ou des anticorps polyvalents détectant toutes les immunoglobulines d'une espèce (Fig. 1) (12).

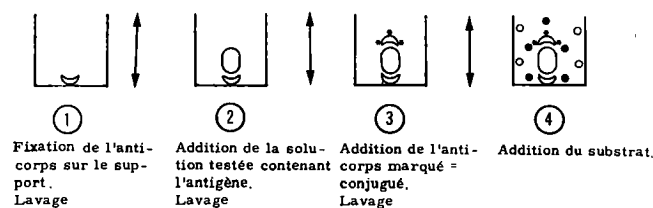


Fig. 1 : Représentation schématique de la méthode ELISA.

RECHERCHE D'ANTIGENES DE BRUCELLA

Il est possible d'utiliser la méthode ELISA pour la recherche de *Brucella* dans les sécrétions d'animaux suspects afin de déceler d'éventuels porteurs de l'infection dépourvus d'anticorps. L'une des méthodes (20) consiste à fixer des anticorps bovins avec la glutaraldéhyde sur des billes de nylon et à les incuber avec des fluides suspects. Après fixation du complexe antigène anticorps, on ajoute du sérum de lapin anti-*Brucella* puis un conjugué permet de visualiser la réaction. On pourrait détecter ainsi 10 corps bactériens dans 1 ml de prélèvement. Une autre méthode (9) permet de rechercher des *Brucella* sur des écouvillons et de détecter rapidement lors de la mise bas l'excrétion de *Brucella*.

L. Valette

RECHERCHE ET TITRAGE DES ANTICORPS

C'est pour la recherche d'anticorps que la technique ELISA a surtout été utilisée. En médecine humaine, la recherche seule en l'absence même de standardisation en unités internationales peut se concevoir (17, 18, 19). La grande sensibilité de la réaction permet de l'utiliser en remplacement des autres techniques indirectes courantes (immunofluorescence) et de séparer les infections chroniques (IgG) des infections récentes (IgM). En médecine animale, le diagnostic sérologique doit être plus quantitatif et standardisé afin de tenir compte des anticorps post-vaccinaux et des échanges internationaux. Comme de nombreux textes existent avec des unités de mesure, toute nouvelle réaction doit comparée aux réactions déjà codifiées.

Dosage des anticorps

La technique la plus courante consiste à fixer l'antigène sur des plaques, à faire agir des dilutions de sérum, puis, après lavage, à révéler les anticorps fixés sur les plaques, par sérum anti-immunoglobulines bovines conjugué à un enzyme (péroxydase) qui va hydrolyser un substrat. La modification de couleur d'un accepteur d'oxygène permettra de mesurer par densité optique la présence d'anticorps et d'en apprécier la quantité en utilisant une gamme de témoin (13). La sensibilité de la méthode est excellente (23), supérieure même à l'hémagglutination indirecte (Tabl. I).

Réalisation de la réaction

La réaction se réalise fréquemment sur plaque dans la journée ; elle nécessite de nombreux barrages (Tabl. II) et est facilement mécanisable. Il s'agit de microméthode utilisant de faibles quantités de réactifs (volume d'un cupule 400 ml) (28).

De nombreux antigènes ont été utilisés : corps bactériens inactivés, lipopolysaccharides, fraction protéique... La fraction phénolo-soluble utilisée dans plusieurs essais (4, 7, 15) s'est montrée très stable et a permis une excellente reproductibilité de la réaction de titrage des sérums bovins.

Il est essentiel de choisir dans un temps préalable quelle est la dilution optimale d'antigène à utiliser en faisant varier dilutions de sérum de référence face à des dilutions de l'antigène (technique de l'échiquier) afin de voir quelle quantité d'antigène permet de détecter le minimum d'anticorps.

TABLEAU I Sensibilité comparée de 3 méthodes de détection dans le sérum bovin des anticorps antibrucelliques (d'après Nielsen) (Antigènes : LPS, anticorps : en ng).

	Ig M	Ig 1	Ig G2	Ig A
ELISA	155 ng	190	220	700
Hémolyse en gel	5 500	60	4 850	no
Hémagglutination indirecte	no	3 750	625	4 250

TABLEAU II Exemples de réalisation de la réaction ELISA.

1. Adsorption de l'antigène sur une plaque
2. Incubation 16 heures à + 4°
3. Lavage en PBS plus tween 0,05 p. 100
4. Saturation des sites par albumine bovine 50 g/l (1 heure à + 20 °C)
5. Lavage en PBS plus tween
6. Répartition des dilutions des sérums dans les cupules (1 heure à + 20 °C)
7. Lavage en PBS plus tween
8. Répartition des dilutions du sérum de lapin anti Ig G bovines, marqué à peroxydase (1 heure à + 20 °C)
9. Lavage
10. Adjonction du substrat (orthophénylène-diamine)
11. Arrêt de la réaction après 10 minutes, par adjonction H₂SO₄ 2,5 M
12. Lecture de la réaction

Applications au dépistage de la brucellose

Cette réaction ELISA a pu être appliquée avec succès au dépistage de la brucellose bovine (8, 14), et permet même de détecter les anticorps lactés avec une sensibilité supérieure à celle du *Ring Test* (11).

Plusieurs auteurs ont utilisé également cette technique pour le dépistage des anticorps chez les moutons infectés par *Brucella ovis* (9, 16, 22, 24). Ce test, en utilisant soit des corps bactériens soit des antigènes solubles, s'est montré plus sensible que la réaction de fixation du complément.

Une réaction en « double sandwich » de type ELISA (6, 27) a pu être utilisée aussi pour le dépistage de la brucellose porcine. Les résultats ont été trouvés très proches de ceux obtenus avec la réaction de Coombs.

LIMITE DE LA METHODE

Cette nouvelle méthode indirecte de mise en évidence des anticorps anti-brucelliques est extrêmement sensible. Mais tout parallélisme avec les examens sérologiques classiques (séro-agglutination, fixation du complément, *Ring Test*, Rose Bengale) est très difficile puisque ces méthodes usuelles sont des réactions directes. Il est de ce fait difficile de comparer les résultats obtenus (28). On ne peut donc utiliser cette méthode que dans les régions presque totalement assainies ou toute positivité est suspecte : dans ce cas la grande sensibilité et la possibilité d'automatiser la réaction sont deux avantages certains (Tabl. III).

Un des désavantages majeurs du test ELISA est la

TABLEAU III *Avantages de la méthode ELISA.*

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> — Sensibilité — Spécificité — Rapidité — Possibilité d'automatisation |
|--|

VALETTE (L.). ELISA reaction for the diagnosis of brucellosis. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1987, 40 (4) : 341-345.

The immuno-enzymatic reaction ELISA can be used in the diagnosis of brucellosis for rapid searches for *Brucella* in the post-abortive secretions, but it is mainly used to search for specific antibodies. This indirect serological method can reveal the presence of certain classes of antibodies or even the totality of the antibodies present. It is very sensitive, specific and fast. It is a valid replacement for the indirect immunofluorescence method in the serological diagnosis of human brucellosis. It could also be used to search for animal brucellosis in herds where the only prophylactic measures are sanitary, and where no vaccination is carried out. But the present lack of standardization makes it impossible to take measurements in units of reference or to compare a level of antibodies with another obtained by habitual methods. This makes it difficult to use in zones where a residual post-vaccinal level of antibodies is to be compared and it should be possible to begin standardization. *Key words* : Brucellosis - Diagnosis - Immunological test - ELISA test - Antibody.

grande variété des réactifs utilisés actuellement dans les différents laboratoires, ce qui rend presque impossible toute comparaison des résultats (Tabl. IV).

TABLEAU IV *Inconvénients de la méthode ELISA.*

Dans le cas du diagnostic sérologique de la brucellose animale
<ul style="list-style-type: none"> — Problème de la standardisation des résultats — Standardisation des réactifs

CONCLUSION

La méthode ELISA apporte incontestablement des éléments nouveaux dans les tests sérologiques applicables au diagnostic de la brucellose et la spécificité d'une réaction indirecte, comme l'immunofluorescence, avec la rapidité d'une réaction directe. Une meilleure définition des réactifs utilisés et une standardisation des techniques sont cependant indispensables avant de généraliser son emploi.

VALETTE (L.). La prueba ELISA para el diagnóstico de la brucelosis. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1987, 40 (4) : 341-345.

Se puede utilizar la reacción immuno-enzimática (ELISA) en el diagnóstico de la brucelosis para la búsqueda rápida de *Brucella* en las excreciones post aborto pero sobre todo para la búsqueda de anticuerpos específicos.

Este método serológico indirecto puede evidenciar tipos especiales de anticuerpos o la totalidad de los anticuerpos. Es muy sensible, específica y rápido. Puede reemplazar válidamente el método de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico serológico de la brucelosis humana. Aun podría ser utilizada para la búsqueda de la brucelosis animal en ganaderías donde se emplea sola la profilaxia sanitaria sin ninguna vacunación. Pero su falta actual de estandarización hace imposible la medida con unidades de referencia y la comparación de un nivel de anticuerpos con el obtenido por métodos usuales : lo que hace su empleo difícil en las zonas donde se necesita medir una tasa de anticuerpos post vacuna residual. Se compara la utilización de antígenos solubles o particulares y se considera un principio de estandarización. *Palabras claves* : Brucelosis - Diagnóstico - Técnica inmunológica - Prueba ELISA - Anticuerpo.

BIBLIOGRAPHIE

1. AFZAL (M.), TENDERDY (R. P.), SQUIRE (P. G.), ELLIS (R. P.). Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. clin. Microbiol.*, 1984, 20 (6) : 1159-1164.

2. ALTON (G. G.), JONES (L. M.), PIETZ (D. E.). La brucellose. Techniques de laboratoire. 2e éd. Genève, OMS, 1977.
3. AVRAMEAS (S.), URIEL (J. C.). Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 1966, **262** : 2543-2545.
4. BERMAN (D. T.), WILSON (B. L.), MORENO (E.), ANGUS (R. D.), JONES (L. M.). Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay. *J. clin. Microbiol.*, 1980, **10** : 37-41.
5. BORAKER (D. K.), STINEBRING (W. R.), KUNKEL (J. R.). Bruc-ELISA : an enzyme-antibody immunoassay for detection of *Brucella abortus* in milk : correlation with the Ring Test and with shedding of viable organisms. *J. clin. Microbiol.*, 1981, **14** (4) : 396-403.
6. BREWER (R. A.), STUART (F. A.), CORBEL (M. J.). An indirect Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in porcine sera. *Br. vet. J.*, 1983, **139** : 495.
7. CALMELS (D.), VALETTE (L.), DESMETTRE (P.). Test immunoenzymatique ELISA appliqué à la recherche et au titrage des anticorps de *Brucella abortus*. 3e Symposium International Brucellose, Alger, 1983. In : *Dev. biol. Standard*, 1984, **56**.
8. CARGILL (C.), CLARKE (I.). Use of an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay in a bovine brucellosis eradication program. *Aust. vet. J.*, 1985, **62** (2) : 49.
9. CHEN (I. M.), THOEN (C. O.), PIETZ (D. E.), HARRINGTON (R.). Application of an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for detection of *Brucella* antigens in vaginal discharge of cows. *Am. J. vet. Res.*, 1984, **45** (1) : 32.
10. CHIN (J. C.). Comparison of different antigenic preparations for the detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis* by ELISA. *Aust. vet. J.*, 1983, **60** (9) : 261.
11. DURAND (M.), CHATAGNON (G.), LEGARDINIER (J. C.). Prophylaxie de la brucellose bovine, étude comparée du test de l'anneau *Ring Test* et de test ELISA sur les laits. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 1984, **57** (1) : 109-118.
12. ENGVALL (E.), PERLMANN (P.). Enzyme linked immune absorbent assay. Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971, **8** : 871-874.
13. HECK (F. C.), DEYOE (B. L.), WILLIAMS (J. D.). Antibodies to *Brucella abortus* in sera from strain 19 vaccinated and non-vaccinated cows as determined by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay and conventional serologic methods. *Vet. Immun. Immunopath.*, 1982, **3** (6) : 629-634.
14. HECK (F. C.), WILLIAMS (J. D.), PRUETT (J.), SANDERS (R.), ZINK (D. L.). Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum. *Am. J. vet. Res.*, 1980, **41** (12) : 2082.
15. LAMBS (V. L.), JONES (L. M.), SCHURIG (G. G.), BERMAN (D. T.). Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for bovine immunoglobulin subclass - specific to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, 1979, **24** : 798-803.
16. LEE (K.), CARGILL (C.), ATKINSON (H.). Evaluation of an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. vet. J.*, 1985, **62** (3) : 91.
17. LINDBERG (A. A.), HAEGGMAN (S.), KARLSON (K.), CARLSSON (M. E.), MAIR (N. S.). Enzyme immunoassay of the antibody response to *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* 0 9 infections in humans. *J. Hyg., Camb.*, 1982, **88** : 295-307.
18. MARMONIER (A.), BERTHET (B.). Application de la technique immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) au diagnostic sérologique des brucelloses humaines. I. Evolution de quelques paramètres de la réaction et réalisation pratique. *Path. Biol.*, 1981, **29** : 77-81.
19. PELLERIN (J. L.), GERAL (M. F.), LAUTIE (R.). Le test immuno-enzymatique ELISA dans le diagnostic sérologique de la brucellose humaine. *Revue Méd. vét.*, 1980, **131** (11) : 741-766.
20. PERERA (V. Y.), CREASY (M. T.), WINTER (A. J.). Nylon bead Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for detection of sub-picogram quantities of *Brucella* antigens. *J. clin. Microbiol.*, 1983, **18** (3) : 601-608.
21. PIROIRD (R.), LOMBARD (M.). Les méthodes immuno-enzymatiques et leurs applications sérologiques. *Revue Méd. vét.*, 1980, **131** : 25-42.
22. RIS (D. R.), HAMEL (K. L.), LONG (D. L.). Comparison of an Enzyme-Linked Immunospecific Assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N.Z. vet. J.*, 1984, **32** (1-2) : 18-20.
23. RUPPANNER (R.), MEYER (M. E.), WILLEBERG (P.), BEHYMER (D.). Comparison of ELISA with other using sera from heifers experimentally infected with *Brucella abortus*. 2nd International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Lucerne, Switzerland, 1980.
24. SPENCER (T. L.), BURGESS (G. W.). Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. *Res. vet. Sci.*, 1984, **36** (2) : 194-198.
25. TABATABAI (L. B.), DEYOE (B. L.). Specific Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. *J. clin. Microbiol.*, 1984, **20** (2) : 209-213.

26. THOEN (C. O.), BRUNER (J. A.), LUCHSINGER (D. W.), PIETZ (D. E.). Detection of *Brucella* antibodies of different immunoglobulin classes in cow milk by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. *Am. J. vet. Res.*, 1983, **44** (2) : 306-308.
27. THOEN (C. O.), HOPKINS (M. P.), ARMBRUST (A. L.), ANGUS (R. D.), PIETZ (D. E.). Development of an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for detecting antibodies in sera of *Brucella suis*-infected swine. *Can. J. comp. Med.*, 1980, **44** : 294-298.
28. VAN AERT (A.), BRIOEN (P.), DEKEYSER (P.), UYTTERHAEGEN (L.), SIJENS (R. J.), BOEYE (A.). A comparative study of ELISA and other methods for the detection of *Brucella* antibodies in bovine sera. *Vet. Microbiol.*, 1985, **10** (1) : 13-21.
29. WORTHINGTON (R. W.), STEVENSON (B. J.), DE LISLE (G. W.). Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N.Z. vet. J.*, 1985, **46** (8) : 1642.