

R. Bocquentin¹C. Duvallet¹

Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma* *congolense* chez les bovins

BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (C.). Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* chez les bovins. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (2) : 179-186.

La simplicité et l'automatisation possible du test ELISA en font un outil très répandu pour la détection d'anticorps et, plus récemment, d'antigènes. Cependant, la reproductibilité des résultats pose toujours des problèmes, les causes de variabilité étant nombreuses. On a cherché à améliorer la reproductibilité du test ELISA dans un système de détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* chez les bovins. Les tampons sont toujours amenés à température ambiante pour éviter les gradients de température. Tous les volumes sont portés à 200 µl par puits. L'utilisation de sérum de lapin décomplémenté permet de réduire le bruit de fond en saturant les sites non spécifiques. *T. congolense*, utilisé comme antigène homologue, a donné des résultats légèrement supérieurs à un antigène hétérologue (*T. evansi*). Le titrage de la concentration d'antigène à utiliser doit être réalisé à chaque nouvelle préparation d'antigène. Un agencement est proposé afin de tester chaque sérum quatre fois par plaque, ce qui permet d'obtenir pour chaque sérum une moyenne et un écart-type. Enfin, la lecture ne se fait plus en fonction d'une durée écoulée depuis la mise en contact de l'enzyme et du substrat, mais du degré d'avancement réel de la réaction grâce à un sérum cible. Les résultats obtenus montrent une excellente reproductibilité ; une gestion par ordinateur est proposée. *Mots clés* : Bovin - Test ELISA - *Trypanosoma congolense* - Burkina Faso.

INTRODUCTION

Depuis l'apparition, au début des années 70, des tests immunoenzymatiques et particulièrement de l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (2), plusieurs centaines d'articles sur les applications pratiques du test original et ses modifications pour l'adaptation au diagnostic ont été écrits (13). Le test ELISA a été rapidement adapté et utilisé pour la détection des anticorps dans les trypanosomoses animales (9, 10), et, plus récemment, pour la détection des antigènes circulants (7, 11, 12).

1. Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (CRTA), 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

Reçu le 04.12.89, accepté le 09.01.90.

Le Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (CRTA) est financé par l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (département Élevage du CIRAD), France, et par la « Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit » (GTZ), République fédérale d'Allemagne.

Bien que relativement simple et pratique, le test ELISA a toujours posé quelques problèmes quant à la reproductibilité des résultats. En effet, les causes de variabilité sont nombreuses : caractéristiques physico-chimiques des plaques, variations de pH, formation de gradients de température, instabilité de certains produits, qualité et quantité des lavages... (5). L'ensemble de ces variations individuelles peut entraîner une variabilité importante inter- et intra-plaques (14). Un élément important est la source de l'antigène utilisé pour la sensibilisation des plaques (6). Une concentration trop faible ou trop forte de l'antigène affecte sérieusement le couplage des anticorps par des interactions de surface. Des études, citées par LEHTONEN et VILJANEN (6), ont montré que les sites antigéniques sont utilisés de façon plus efficace avec des concentrations antigéniques plutôt faibles que fortes. De plus, la variabilité d'adsorption des protéines selon la position des puits (3) demande une étude rigoureuse de l'agencement des différents sérums sur la plaque de microtitration.

Le résultat final des techniques immunoenzymatiques est la formation d'un produit coloré qui permet une mesure de densité optique (DO). De nombreux facteurs ont une influence sur cette partie finale du test. En particulier, le déroulement de la réaction enzymatique, donc le moment de la lecture, est un facteur critique de reproductibilité (14, 15). En effet, les densités optiques obtenues pour différentes plaques, traitées de manière identique, à un temps de lecture donné, ont un coefficient de variation pouvant atteindre des valeurs importantes.

Afin de développer un test fiable et reproductible, les facteurs précédemment cités ont été étudiés et un protocole de lecture mis au point afin de standardiser la conversion du chromogène. Ce travail a été réalisé pour la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* dans le sérum de bovins expérimentalement infectés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sérums

Tous les sérums testés proviennent de l'expérience « T. congo 5 », dans laquelle l'infection cyclique de 5

R. Bocquentin, C. Duvallet

zébus et de 12 taurins Baoulé a été réalisée à l'aide d'une seule piqûre de glossine infectée par *Trypanosoma congolense* (1). Les animaux, qui avaient tous été élevés en étable sous moustiquaire, à l'abri de toute piqûre de vecteur depuis leur naissance, ont présenté une parasitémie positive.

Antigènes

La souche de *Trypanosoma congolense*, Karankasso/83/CRTA/57, a été isolée dans la région de Bobo-Dioulasso. Le stabilat 12 du 24.04.1986 a été utilisé dans cette expérimentation. La souche de *Trypanosoma evansi*, isolée sur dromadaire au Kenya et conservée à l'Université de Berlin, a été fournie par P.H. CLAUSEN.

Sérums témoins

Trois sérums sont définis comme témoins. Le témoin positif est constitué d'un pool de sérums de bovins infectés par la souche de *T. congolense* Karankasso/83/CRTA/57. Le témoin négatif est constitué d'un pool de sérums des mêmes animaux, élevés en étable sous moustiquaire, mais avant l'infection. Le sérum « target », qui permet de suivre l'avancement de la réaction enzymatique, est un sérum positif dont on conserve une grande quantité fractionnée en aliquotes au congélateur.

Matériel de laboratoire et réactifs

Le lecteur de microplaques ELISA est un Titertek Multiskan^R PLUS utilisé à une longueur d'onde de 405 nm. Les microplaques utilisées proviennent de chez Dynatech (MicrotiterND M129 B lot 12.365).

Les conjugués RAB-IgG(H + L)/PO et RAB-IgM/PO proviennent de chez Serotech. Le substrat de la réaction colorée est l'ABTS [2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline sulphonate)] de chez Sigma, préparé ainsi pour chaque plaque : 20 ml acide citrique (0,96 p. 100 ; pH 4), 100 µl ABTS (54 mg ABTS, 2,5 ml H₂O), 80 µl H₂O₂ (0,5 ml H₂O₂ 30 p. 100, 7 ml H₂O). Les tampons utilisés sont : PBS 0,015 M (pH 7,2-7,5 ; NaCl 40 g ; KCl 1 g ; KH₂PO₄ 1 g ; Na₂HPO₄ 12H₂O 14,5 g ; H₂O qsp 51) et carbone buffer 0,1 mM (pH 9,6 ; Na₂CO₃ 1,58 g ; NaHCO₃ 2,93 g ; H₂O qsp 11). Le Tween 20 est également de chez Sigma.

Préparation des antigènes

Les parasites sont préparés en recueillant le sang des animaux sur héparine par ponction intracardiaque à l'acmé de l'infection, puis en l'additionnant de tampon

phosphate-glucosé contenant de la phytohémagglutinine (PHA). Cette dernière permet l'agglutination des hématies lors d'une centrifugation à basse vitesse. Le surnageant de trypanosomes est alors filtré sur DEAE-cellulose (4). Les différents éléments figurés du sang sont retenus dans la colonne et l'on obtient une suspension pure de trypanosomes. Les parasites sont lavés plusieurs fois en PBS puis conservés en azote liquide.

Les trypanosomes purifiés sont congelés en azote liquide puis décongelés (4 °C) au moins cinq fois. Ils sont ensuite centrifugés à 18 000 tpm pendant 30 min à 4 °C (r = 5,5 cm). Le surnageant est alors récupéré et sa concentration en protéines mesurée (8), puis il est fractionné et conservé à -20 °C.

Analyse des différents critères physico-chimiques

La reproductibilité des résultats en fonction de la qualité des plaques, des fluctuations du pH et de la température, ainsi que de la quantité et la qualité des lavages, est étudiée par l'expérimentation d'un sérum témoin disposé uniformément dans les 96 puits d'une plaque soumise aux variations des différents critères.

D'autre part, afin de minimiser les variations intra- et inter-plaques observées, chaque sérum est testé plusieurs fois sur la même plaque. Un agencement optimal est mis en évidence en réalisant le test ELISA sur 4 plaques contenant le même sérum dans les 96 puits, puis en calculant les moyennes et écarts-types des densités optiques pour diverses associations des sérums en groupes.

RÉSULTATS

Caractéristiques des tampons

Pour que chaque incubation se fasse dans des conditions homogènes, il est nécessaire que tous les composants soient conservés au froid et amenés à température ambiante avant utilisation. Afin d'éviter la formation de gradients de température intra-plaque, toutes les incubations se font également à température ambiante. Ces précautions permettent de limiter le *edge-effect*, ou différence de température, pouvant atteindre 2 °C, entre les puits périphériques et centraux de chaque plaque, provoquant une variation non négligeable dans l'adsorption de l'antigène.

Le pH des tampons doit être vérifié avant chaque utilisation. Il a de plus été observé que les résultats

sont plus reproductibles lorsque le volume des différents tampons et substrats est porté à 200 μ l par puits, au lieu de 50 μ l, volume généralement employé dans les ELISA.

Saturation

Afin d'éviter une adsorption non spécifique des différentes immunoglobulines, il apparaît nécessaire de saturer les sites de la plaque restés libres après fixation de l'antigène. Le ligand employé ici étant un anticorps de lapin anti-immunoglobulines bovines, il ne faut pas employer à cet effet de l'albumine bovine (BSA) mais du sérum de lapin. On utilise ce dernier à 2 p. 100 dans le tampon de dilution des sérums à tester après l'avoir décomplémenté 30 min à 56 °C. Cela permet de réduire le bruit de fond non spécifique observé lors de la lecture des puits ne contenant que du PBS en lieu et place du sérum. Ainsi, les densités optiques obtenues dans les puits « blancs » sont d'un ordre de grandeur de 0 à 0,050 en utilisant la BSA, de 0 à 0,020 seulement avec le sérum de lapin.

Antigènes

Deux antigènes ont été testés : l'un préparé à partir d'une souche de *T. evansi*, l'autre à partir d'une souche de *T. congolense*. Le critère retenu pour sélectionner l'espèce source d'antigène est la meilleure détection des anticorps de trois sérums de bovins infectés. Les résultats (Fig. 1) montrent que l'emploi d'antigène *T. congolense* permet une meilleure distinction des sérums positifs et du pool de sérums négatifs. Le test t de comparaison des moyennes des écarts positifs/négatifs montre une différence significative ($p < 5$ p. 100) pour la dilution 1/100 (Tabl. I). L'emploi d'antigène *T. congolense* est donc préférable lorsque cela est possible.

TABLEAU I Étude statistique de la différence de réponse aux antigènes *T. evansi* et *T. congolense*.

	n	Moyenne	Écart-type	t. Student	Degré de liberté
<i>T. evansi</i>	3	125	25,5	2,96	4
<i>T. congolense</i>	3	185			

La moyenne des écarts de DO entre les sérums 1, 2, 3 et le négatif est calculée, pour les deux antigènes, à la dilution 1/100 des sérums.

Concentration de l'antigène

L'estimation de la quantité optimale d'antigène à incuber est nécessaire avant toute mise en route d'un

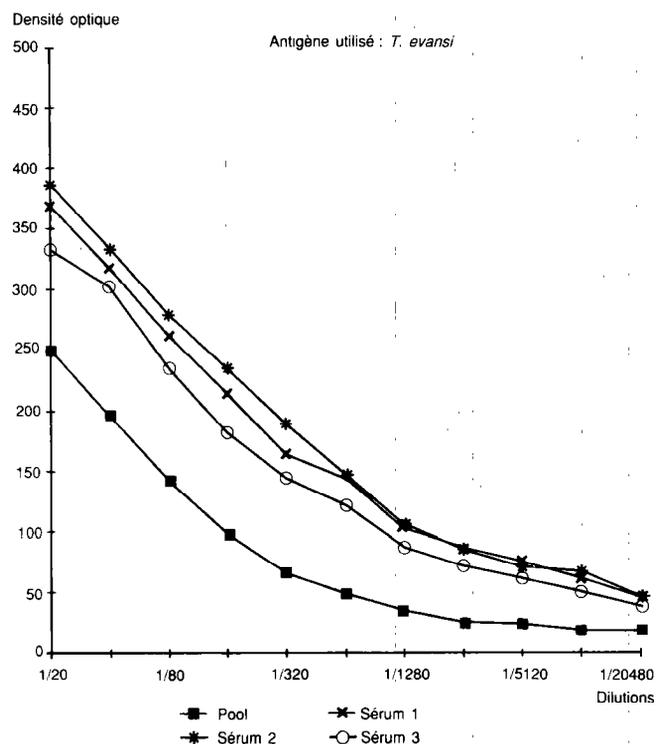
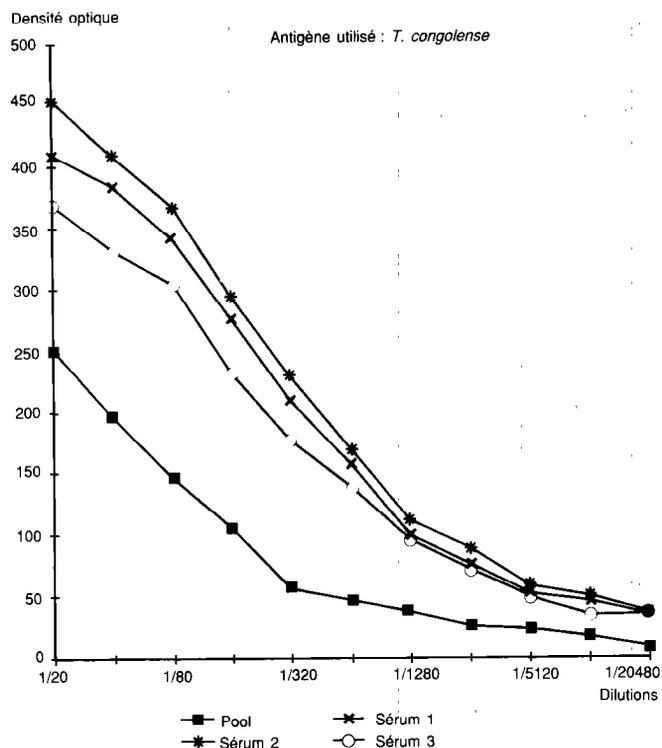


Fig. 1 : Trois sérums positifs et un pool négatif sont testés avec deux antigènes différents provenant de *T. evansi* et *T. congolense*.

test ELISA. La concentration d'antigène à déposer dans les puits est déterminée empiriquement par la méthode suivante : adsorption de différentes quantités d'antigène et test d'un sérum positif (+) et d'un sérum négatif (-); le tableau II indique la disposition et la dilution de chaque composant.

TABLEAU II Détermination de la quantité optimale d'antigène. Disposition et dilution de chaque composant.

Titre sérum		20	40	80	160	320	640	20	40	80	160	320	640
Ag (µg/ml)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7,5	C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	E	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5	F	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7,5	G	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10	H	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ = sérum positif ; - = sérum négatif.

Dans le but de choisir les critères les mieux adaptés, une plaque est préparée pour chaque combinaison des paramètres suivants : tampon de dilution (PBS ou carbonate) et dilution du conjugué (1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000). Huit plaques sont donc nécessaires pour titrer l'antigène en fonction de tous ces critères. La dilution optimale de l'antigène sera celle pour laquelle la moyenne des DO du sérum positif au 1/320 moins la moyenne des DO du sérum négatif au 1/40 est la plus grande, séparant donc au mieux un sérum positif d'un sérum négatif. Le tampon de dilution et la dilution du ligand optimaux sont ceux pour lesquels cette différence est la plus grande.

Pour les antigènes préparés ici, par congélation/décongélation, ce sont des dilutions de l'antigène de 7,5 µg/ml (tampon PBS et conjugué au 1/2000) qui ont donné les meilleures distinctions des témoins positifs et négatifs (Tabl. III). Ce critère, fonction de la qualité de la préparation de l'antigène, doit obligatoirement être testé à chaque nouvelle préparation de protéines.

L'emploi, comme tampon de dilution de l'antigène, de PBS ou de carbonate a donné des résultats très semblables. Finalement, le PBS a été retenu par simplification, ce même tampon étant utilisé à d'autres étapes de la technique. Étant donné qu'une très faible proportion de l'antigène se fixe sur la paroi plastique (phase solide), il est nécessaire de laver au moins cinq fois les puits après cette incubation. Afin de standardiser le remplissage par le tampon de lavage de chaque

TABLEAU III Résultats obtenus pour le titrage de l'antigène.

Ag (µg/ml)	Moy. DO +/320	Moy. DO -/40	Ecart
3	0,295	0,170	0,125
5	0,413	0,206	0,207
7,5	0,594	0,225	0,369
10	0,575	0,264	0,309

La plaque dont les résultats sont exposés ici est celle pour laquelle le tampon est du PBS et le ligand est dilué au 1/2000 (moy. DO +/320 = moyenne des 2 DO obtenues pour le pool de sérums positifs dilué à 1/320 et moy. DO -/40 = moyenne des 2 DO obtenues pour le pool de sérums négatifs dilué à 1/40).

puits, les plaques sont immergées. Après une incubation de 5 min, le tampon de lavage est expulsé par mouvements brusques au-dessus de l'évier.

Agencement des sérums

La disposition retenue, donnant les écarts-types les plus faibles, est représentée dans le tableau IV. La plaque est divisée en quatre quartiers identiques contenant un exemplaire de chacun des 24 sérums. La moyenne des quatre densités optiques obtenues est effectuée et acceptée comme valable si son écart-type est faible. Chaque quartier doit contenir dans la première colonne un sérum *target*, un sérum positif, un sérum négatif, du PBS. Dans les cinq autres colonnes de chaque quartier, les 20 sérums à tester sont répartis. L'ensemble de ces sérums est dilué au 1/100 car à cette dilution les sérums positifs sont bien distincts du négatif (Fig. 1).

TABLEAU IV Agencement des sérums (voir texte).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
B	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12
C	13	14	15	16	17	18	13	14	15	16	17	18
D	19	20	21	22	23	24	19	20	21	22	23	24
E	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
F	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12
G	13	14	15	16	17	18	13	14	15	16	17	18
H	19	20	21	22	23	24	19	20	21	22	23	24

Protocole de lecture

Afin de pallier les variations inter-plaques, chaque plaque n'est pas lue à un temps donné mais à une DO donnée, atteinte par un sérum *target* préparé à

l'avance en grande quantité et dont la densité optique est constamment représentative du degré d'avancement de la réaction. Ceci permet d'avoir des plaques comparables car lues dans un contexte immunoenzymatique identique. En effet, on constate avec cette méthode une bonne reproductibilité des résultats obtenus pour le témoin positif et pour le témoin négatif (Fig. 2). En pratique, la colonne 1 de chaque plaque, contenant deux des quatre échantillons du *target*, est lue de minute en minute après l'ajout du substrat. Lorsque la moyenne de ces deux DO atteint un seuil prédéterminé, les plaques sont lues entièrement.

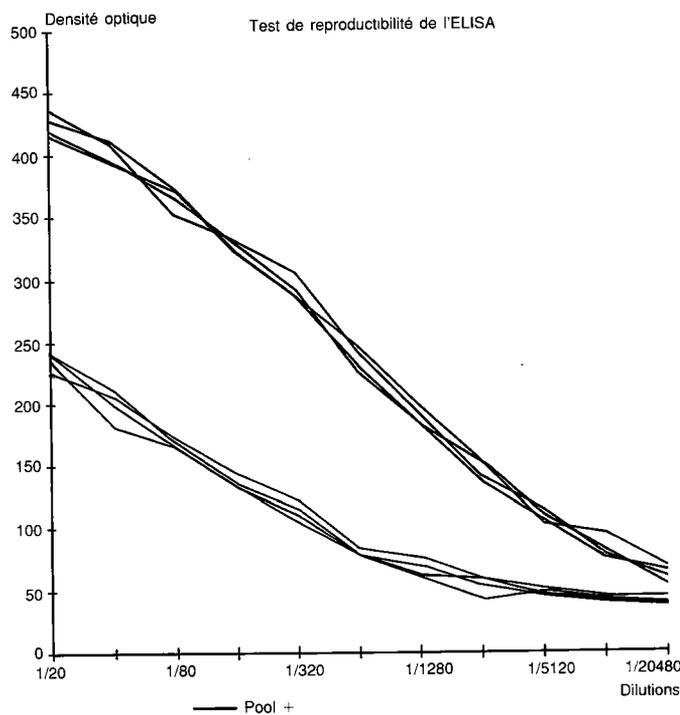


Fig. 2 : Deux pools de sérums sont testés à différentes dilutions sur quatre plaques différentes avec le protocole optimisé de la technique ELISA.

Gestion des résultats

L'utilisation de l'ordinateur permet une meilleure gestion des résultats. Ainsi, l'emploi d'un traitement de texte simplifie la tenue d'une feuille de route pour chaque plaque testée (annexe 1) et l'utilisation d'un tableur se révèle particulièrement intéressante. En effet, la redondance des sérums, testés quatre fois par plaque, nécessite le calcul de la moyenne et de l'écart-type de chacun des 24 sérums. Après la saisie, automatisée ou manuelle, des 96 DO correspondant à une plaque dans les colonnes d'un tableur, ce dernier

ELISA N° 56	
Date de la manipulation:.....	08/08/89
Intitule:.....	Cinétique post-traitement
Marque de la plaque:.....	Dynatech M129B (lot 12.365)
Antigène	
Nature de l'antigène.....	KARANKASSO/83/CRTA/57
Date de préparation:.....	Avril 1989
Concentration de la solution mère:.....	1,75mg/ml (Lowry 1)
Concentration utilisée:.....	7,5ug/ml
Tampon de dilution utilisé:.....	PBS (pH 7,4)
Temps d'incubation:.....	16 heures
Sérums	
Echantillons:.....	T. congo 5
Témoin positif:.....	pool + au 1/100
Témoin négatif:.....	pool - au 1/100
"Target":.....	815(8/08/86) au 1/100
Temps d'incubation:.....	3 heures
Réaction colorée	
Nature du ligand:.....	RAB/IgG(H+L)-PO
Dilution du ligand:.....	1/2000
Temps d'incubation:.....	2 heures

Annexe 1 : Exemple de feuille de route à remplir pour chaque plaque.

permet un calcul rapide et sans erreur des moyennes et écart-types (annexe 2). Il permet de soustraire le bruit de fond (moyenne des DO des puits PBS) à chaque valeur calculée. Il est également possible de rapporter le résultat du *target* à une valeur stricte d'avancement de la réaction prédéterminée. Par voie de conséquence, celui de tous les sérums est modifié et devient alors réellement comparable plaque à plaque.

CONCLUSION

L'étude de différents paramètres a permis, dans le cas de sérums de bovins infectés par *T. congolense*, la mise au point d'un protocole améliorant la reproductibilité des dosages immunoenzymatiques. Deux notions importantes ont été abordées: la répétition du test de chaque sérum et le protocole de lecture de la réaction colorée.

R. Bocquentin, C. Duvallet

ELISA 56													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C	Saisie automatique ou manuelle												
D	des densités optiques												
E													
F													
G													
H													
	moyenne	1	2	3	4	5	6						
A													
B		MOYENNE(L(-12)C(-3);L(-12)C(+3);											
C		L(-8)C(-3);L(-8)C(+3))											
D													
	écart type	1	2	3	4	5	6						
A													
B		ECARTYPE(L(-20)C(-3);L(-20)C(+3);											
C		L(-16)C(-3);L(-16)C(+3))											
D													
	correction	1	2	3	4	5	6						
A													
B		L(-16)C-L20C5* X /(L18C5-L20C5)											
C													
D													
	résultats	1	2	3	4	5	6						
A													
B		SI(L(-8)C2 Y ;"+ ";"")&SI(L(-8)Cs Z ;"- ";"")											
C													
D													
	sérums	1	2	3	4	5	6						
A	Target												
B	T+												
C	T-												
D	PBS												

Annexe 2 : Exemple de feuille de calcul sur tableur donnant les moyennes, écarts-types, données corrigées, résultats et identification des 20 sérums correspondants. Les formules indiquées représentent le contenu des 24 cellules de chacun des 4 tableaux ; X, Y, Z représentent respectivement le seuil du target, le seuil négatif et le seuil positif.

La redondance du même sérum, testé quatre fois sur une plaque, permet de limiter les variations intra-plaques en diminuant au maximum le rôle intempestif de l'emplacement de l'échantillon sur les microplaques (*edge effect*). La moyenne des quatre densités optiques obtenues pour un sérum est associée à un écart-type qui la valide ou au contraire amène à retester le sérum.

Le suivi de la réaction enzymatique de transformation du substrat en produit coloré est assuré par l'évolution de la densité optique d'un pool de sérums donné, le *target*. Utilisé de façon strictement identique sur toutes les plaques, ce dernier sera un indicateur de l'avancement de la réaction beaucoup plus précis qu'un temps donné de lecture. En effet, on constate des variations non négligeables, de l'ordre de plu-

sieurs minutes, pour qu'un même sérum atteigne la même densité optique lors de deux essais différents. Il est donc nécessaire de comparer les plaques ayant le même degré d'avancement, c'est-à-dire la même atteinte pour le *target*, plutôt qu'un même temps de lecture atteint pour une plaque.

Ces deux notions, redondance et temps de lecture, permettent de comparer des sérums testés lors d'essais différents : la moyenne est calculée pour chaque sérum ainsi que l'écart-type, puis la feuille de calcul du tableur corrige les valeurs obtenues. Les corrections sont de deux types : la moyenne obtenue pour les puits PBS, utilisé comme blanc, est ôtée à chaque moyenne puis ces dernières sont affectées d'un coefficient correspondant au seuil prédéterminé du *target* divisé par la valeur réellement atteinte par ce dernier (annexe 2). On se trouve alors en présence de données exprimées dans le même contexte et donc parfaitement comparables entre sérums. Ainsi, le test répété d'un pool de trois sérums positifs et d'un pool de sérums négatifs montre la bonne reproductibilité obtenue avec les différentes améliorations du protocole (Fig. 2, annexe 3).

Préparation de l'antigène :	
Purification des trypanosomes (colonne de DEAE-Cellulose)	4 heures
Congélation / décongélation (12H/LN ₂) (12H/4°C)	≥ 5 fois
Récupération des protéines (18000rpm / 30min / 4°C)	
Dosage quantitatif (méthode de Lowry)	3 heures
Titration de la concentration optimale d'antigène	1 journée
Tests sérologiques :	
Sensibilisation des plaques (200 ul Ag / PBS;Tween 0.1%)	Nuit/temp. amb.
Lavages (PBS;Tween 0.1%)	5 x 5min
Dilution des sérums (200 ul 1/100 /PBS;Tween 0.1%;RSI 2%)	
Incubation en 4 quartiers de 24 sérums	3H/temp. amb.
Lavages (PBS;Tween 0.1%)	5 x 5min
Dilution et incubation du conjugué (200 ul 1/2000 /PBS;Tween 0.1%)	2H/temp. amb.
Lavages (PBS;Tween 0.1%)	5 x 5min
Incubation du substrat à l'abri de la lumière	= 30min
Lecture de la plaque lorsque le target a atteint le seuil prédéterminé	
Gestion des résultats :	
Saisie des 96 D.O. dans un tableur	

Annexe 3 : Protocole simplifié de la technique ELISA après optimisation.

La redondance imposée ne permet que le test de 20 sérums par plaque, mais il s'agissait ici du test qualitatif d'un petit nombre de sérums et non du *screening* d'une population importante. C'est pourquoi l'aspect qualitatif du test a été amélioré au détriment de l'aspect quantitatif, nécessaire pour le suivi de populations importantes.

BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (C.). Improvement of the reproducibility of the ELISA test for anti-*Trypanosoma congolense* antibody-detection in cattle. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (2) : 179-186.

Simplicity and the potential automatization make the ELISA test a universal tool for the detection of antibodies, and, more recently, of antigens. But the reproducibility of results is not very good, due to many varying factors. We tried to improve the reproducibility of the ELISA test for the detection of anti-*Trypanosoma congolense* antibodies in cattle. For that, buffers are always used at room temperature to avoid temperature gradients in the plates. All volumes are increased to 200 µl per well. Non-activated rabbit serum is used to block non-specific sites and to reduce background signal. Better results were obtained with a homologous antigen (*T. congolense*) than with a heterologous one (*T. evansi*). Titration of the antigen concentration to be used must be checked for each new batch. A distribution is proposed which would permit a testing of each serum four times per plate and thus to calculate the mean and standard deviation for each serum. Finally, we propose that the reading should no longer be a function of time after contact between enzyme and substrat, but a function of the progress of the reaction measured in a target serum. Results show a very good reproducibility and in addition we propose a computerized monitoring system. *Key words* : Cattle - ELISA Test - *Trypanosoma congolense* - Burkina Faso.

REMERCIEMENTS

Nous remercions P.H. CLAUSEN pour ses conseils sur la technique ELISA, le don d'une souche de *T. evansi* et la lecture du manuscrit, ainsi que le Dr GIDEL, directeur du CRTA.

BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (C.). Mejoramiento de la reproducción del test ELISA adaptado a la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma congolense* en bovinos. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (2) : 179-186.

La posibilidad de simplificar y automatizar el test ELISA, lo convierten en un instrumento eficaz para la detección de anticuerpos y de antígenos. Sin embargo, la reproducción de los resultados presenta generalmente problemas, ocasionados por razones múltiples. Se buscó mejorar la repetición del test ELISA en un sistema de detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma congolense* en los bovinos. Los tampones fueron siempre utilizados a temperatura ambiente para evitar los gradientes de temperatura. Todos los volúmenes fueron de 200 µl por pozo. El uso de suero de conejo deplementado de conejo permitió reducir la fricción de fondo, mediante la saturación de los sitios inespecíficos. El uso de *T. congolense* como antígeno homólogo dió resultados ligeramente superiores a los de un antígeno heterólogo (*T. evansi*). Para cada nueva preparación de antígeno debe realizarse la titulación de la concentración de antígeno a utilizar. Existe la posibilidad de probar cada suero cuatro veces en una misma placa, lo que permite obtener una mediana y una desviación estándar. Finalmente, la lectura no se hace a partir de la duración del momento de contacto entre la enzima y el sustrato, sino del avance real de la reacción gracias a un suero control. Los resultados muestran una excelente reproductibilidad, siendo recomendable el uso de computadores. *Palabras claves* : Bovino - Test ELISA - *Trypanosoma congolense* - Burkina Faso.

BIBLIOGRAPHIE

1. DUVALLET (G.). Observations de bovins Baoulé et Zébu précédemment non infectés, après infection cyclique à *Trypanosoma congolense*. In : Production animale dans les régions d'Afrique infestées par les glossines. Réunion ILCA-ILRAD, nov. 1987, Nairobi, Kenya, 1988. P. 318-328.
2. ENGVALL (E.), PERLMANN (P.). Enzyme linked immunosorbent assay : quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971, 8 : 871.
3. KRICKA (L.J.), CARTER (T.J.N.), BURT (S.M.), KENNEDY (J.H.), HOLDER (R.L.), HALLIDAY (M.I.), TELFORD (M.E.), WISDOM (G.B.). Variability in the adsorption properties of microtitre plates used as solid supports in enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, 1986, 26 : 741-744.
4. LANHAM (S.M.), GODFREY (D.G.). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Expl. Parasit.*, 1970, 28 : 521-534.
5. LETHONEN (O.P.), VILJANEN (M.K.). Antigen attachment in ELISA. *J. Immun. Methods*, 1980, 34 : 61-70.
6. LETHONEN (O.P.), VILJANEN (M.K.). Antigen density in ELISA : Effect on avidity dependency. *J. Immun. Methods*, 1980, 36 : 63-70.
7. LIU (M.K.), PEARSON (T.W.). Detection of circulating trypanosomal antigens by double antibody ELISA using antibodies to procyclic trypanosomes. *Parasitology*, 1970, 95 : 277-290.

R. Bocquentin, C. Duvallet

8. LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RANDALL (R.J.). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 1951, **193** : 265.
9. LUCKINS (A.G.). Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 1977, **9** : 53-62.
10. LUCKINS (A.G.), RAE (P.F.). Comparative studies on experimental infections with *Trypanosoma evansi* using enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1976, **70** : 286.
11. NANTULYA (V.M.). An antigen detection enzyme immunoassay for the diagnosis of *rhodesiense* sleeping sickness. *Parasite Immun.*, 1989, **11** : 69-75.
12. RAE (P.F.), LUCKINS (A.G.). Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1984, **78** : 587-596.
13. VOLLER (A.), BARTLETT (A.), BIDWELL (D.E.). Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1976, **70** : 98-106.
14. WRIGHT (P.F.). Enzyme immunoassay : observations of aspects of quality control. *Vet. Immun. Immunopath.*, 1987, **17** : 441-452.
15. WRIGHT (P.F.), KELLY (W.A.), GALL (D.E.J.). Application of a timing protocol to the detection of interplate variability in the indirect enzyme immunoassay for detection of anti-*Brucella* antibody. *J. Immunoassay*, 1985, **6** : 189-205.