



HAL
open science

COMPARAISON ENTRE ÉLECTROSYNÉRÈSE ET ÉPREUVES SÉROLOGIQUES CLASSIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE OVINE

Danièle Trap, R. Gaumont

► **To cite this version:**

Danièle Trap, R. Gaumont. COMPARAISON ENTRE ÉLECTROSYNÉRÈSE ET ÉPREUVES SÉROLOGIQUES CLASSIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE OVINE. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1982, 13 (1), pp.33-39. hal-00901355

HAL Id: hal-00901355

<https://hal.science/hal-00901355v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

COMPARAISON ENTRE ÉLECTROSYNÉRÈSE ET ÉPREUVES SÉROLOGIQUES CLASSIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE OVINE

Danièle TRAP et R. GAUMONT

*Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires,
Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, B.P. 67, 94703 Maisons-Alfort Cedex, France*

Summary

COMPARISON OF COUNTER-IMMUNOELECTROPHORESIS WITH STANDARD SEROLOGICAL TESTS IN THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN SHEEP. — Sera from 30 sheep experimentally infected and from 126 others with chronic brucellosis were comparatively studied by serum agglutination (SA), complement fixation (CF), rose bengal (RB), and counter-immunoelectrophoresis (CIEP) test. Standard serological tests, particularly SA and RB, essentially detect antibodies against cell-wall fractions of *Brucella* (LPS), whereas CIEP responds to intracellular antigens. Antibodies involved in this test appear late but remain a long time in the sera. CIEP is therefore recommended for screening of animals with chronic brucellosis in which SA and often CF and RB tests too negative.

Les épreuves sérologiques classiques les plus couramment employées pour le diagnostic de la brucellose, la séroagglutination lente, la fixation du complément et l'épreuve à l'antigène tamponné mettent essentiellement en œuvre l'antigène lipopolysaccharidique (LPS) de la paroi et les anticorps correspondants. La valeur de ces épreuves et leurs limites ont été soulignées chez l'animal par Nicoletti (1969), Alton *et al.* (1975) et chez l'homme par Roux (1978) en particulier. Les épreuves d'immunodiffusion en gélose font intervenir un autre système antigène-anticorps : il s'agit essentiellement d'antigènes intracellulaires et des anticorps correspondants : Diaz et

Dorronsoro (1971), Diaz (1972), Corbel (1972), Jones *et al.* (1980). Parmi ces épreuves, l'électrosynérèse, méthode simple, rapide et sensible, a été employée avec succès tant chez l'homme, Diaz *et al.* (1976), Diaz *et al.* (1978), que chez l'animal, Myers et Varela-Diaz (1979), Muhammed *et al.* (1980).

Les difficultés rencontrées lors du dépistage de la brucellose ovine par les épreuves sérologiques classiques, nous ont conduits, dans le but d'améliorer ce diagnostic, à étudier la réponse donnée par l'électrosynérèse utilisant un antigène soluble d'origine cytoplasmique. Nous

comparons dans ce travail les résultats obtenus par ces différentes méthodes.

Matériel et Méthodes

1. Les sérums

Les sérums proviennent :

- de 60 moutons appartenant à un troupeau indemne de brucellose ;
- de 30 moutons venant du même troupeau mais expérimentalement infectés par dépôt sur la conjonctive d'une suspension de *Brucella melitensis* souche 53 H38 à raison de 4×10^5 germes vivants par animal. Les animaux sont saignés 15 jours plus tard puis tous les mois ;
- de 126 moutons appartenant à un troupeau où sévissent depuis plusieurs années des avortements brucelliques. Les animaux sont saignés trois fois à 20 jours d'intervalle.

2. Les antigènes

L'antigène utilisé pour la séroagglutination lente à 37 °C (SAW), la fixation du complément (FC') et l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT) est une suspension de *Brucella abortus* souche 99 de Weybridge inactivée par la chaleur et le phénol (0,5 %) et de plus tamponnée à pH 3,65 et colorée par le rose bengale pour la dernière épreuve. Cet antigène est titré vis-à-vis du sérum étalon international anti-*Brucella abortus* (EIS ab) pour la SAW et l'EAT.

L'antigène utilisé pour l'électrosynérèse (ES) est préparé à partir de la souche *Brucella abortus* 2308 S d'Olitzi. Cette souche cultivée sur gélose tryptose additionnée de 4 % de sérum est laissée durant trois jours à l'étuve à 37 °C en atmosphère contenant 10 % de gaz carbonique. La culture recueillie en solution physiologique à 8,5 ‰, phénolée à 5 % est filtrée sur gaze puis lavée trois fois en tampon phosphate pH 7,2. Une suspension contenant 300×10^9 germes par ml est préparée et soumise aux ultrasons 5 fois 1 minute (à l'aide d'un désintégrateur Soniprep 150, amplitude 18), en ayant soin de maintenir la température aux alentours de + 4 °C par un bain réfrigéré. Après centrifugation d'une heure à 75 000 g (ultracentrifugeuse Beckman, Gagny). Le surnageant est recueilli et constitue l'antigène. Des études préliminaires, Thorel (1967), Trap (1969) ont montré qu'il était constitué en grande partie de protéines : un dosage de biuret effectué sur absorptiomètre électronique LKB 2074 donne une concentration de 5 mg/ml. Un titrage en échiquier effectué vis-à-vis d'un sérum antibrucellique de titre élevé détermine la dilution d'emploi lors des épreuves d'électrosynérèse.

3. Les méthodes

Les épreuves de séroagglutination lente, de fixation du complément et à l'antigène tamponné sont effectuées et interprétées selon les normes fixées par la législation française dans l'arrêté interministériel du 23 mars 1981 (Législation française, 1981).

L'épreuve d'électrosynérèse (ES)

Principe : Cette épreuve encore appelée contre-immunoelectrophorèse, immunoelectrodifffusion et immunoelectroosmophorèse fut introduite par Bussard en 1959. Elle a pour principe l'utilisation au cours d'une électrophorèse du courant d'endosmose comme l'ont montré Gentilini et Pinon (1972) ; celui-ci provoque, dans des conditions techniques choisies (support, tampon, voltage), la migration élective, au sein du gel, des globulines sériques vers la cathode tandis que l'antigène se déplace vers l'anode. La rencontre entre ces deux constituants, en cas de réaction spécifique, se concrétise par l'apparition de raies de précipitation.

Technique : Les épreuves d'ES sont réalisées sur des plaques de verre de 10,5 cm sur 4,4 cm recouvertes de 8 ml d'agarose B (Pharmacia, Bois d'Arcy) à 1 % en tampon tris-barbitone à pH 8,6 (tris : 2,889 g barbitol sodium 4,878 g, barbitone 1,233 g pour 1 litre). Seize séries de deux puits de 2 mm de diamètre espacés de 4 mm sont percés dans la gélose et reçoivent 6 µl d'antigène ou de sérum.

Après avoir déposé les sérums du côté de l'anode et l'antigène du côté de la cathode, les plaques sont placées sur une cuve à migration électrophorétique (Apelab, Bagneux) dont les bacs sont remplis de tampon tris barbitone. La migration s'effectue durant 90 min sous un courant de 5 mA par plaque. Après arrêt de la migration, les raies de précipitation peuvent être repérées immédiatement. Toutefois, cette lecture est beaucoup plus facile si, après lavage des plaques pendant 24 h en solution physiologique et séchage de 3 à 4 h à 37 °C, celles-ci sont colorées dans un bain de bleu de Coomassie (1 g de bleu de Coomassie pour 90 ml d'éthanol à 96°, 20 ml d'acide acétique pur et 90 ml d'eau distillée), suivi de plusieurs bains de lavage dans le mélange précédent : éthanol, acide acétique, eau distillée.

L'épreuve allergique est effectuée sur les moutons atteints de brucellose chronique. Les animaux sont éprouvés au niveau de la paupière. Deux allergènes différents ont été employés : la

Tableau 1. - Résultats des épreuves de SAW, FC', EAT, ES effectuées sur des sérums de moutons expérimentalement infectés

Nombre de sérums ayant présenté en SAW		Nombre d'épreuves positives correspondantes en		
		FC'	EAT	ES
Moins de	15 UI/ml : 61	10	6	16
	15 UI/ml : 30	19	14	20
	30 UI/ml : 22	14	18	17
	60 UI/ml : 29	24	28	25
	120 UI/ml : 18	18	18	16
	240 UI/ml : 13	13	13	12
Plus de	240 UI/ml : 9	9	9	6
	TOTAL : 182	107	106	112
% de positifs		58,8 %	58,2 %	61,5 %

Tableau 2. - Résultats des épreuves de SAW, FC', EAT et ES effectuées sur des sérums de moutons atteints de Brucellose chronique

Nombre de sérums ayant présenté en SAW		Nombre d'épreuves positives correspondantes en		
		FC'	EAT	ES
Moins de	15 UI/ml : 267	48	5	60
	15 UI/ml : 68	45	22	28
	30 UI/ml : 10	8	6	5
	60 UI/ml : 4	4	4	3
	120 UI/ml : 3	3	3	2
	240 UI/ml : 2	2	2	2
Plus de	240 UI/ml : 2	2	2	1
	TOTAL : 356	112	44	101
% positifs		31,4 %	12,4 %	28,3 %

brucelline (INRA) et la brucine (Roger Bellon). Les injections sont effectuées soit par voie sous cutanée avec une seringue (0,5 ml par animal) soit au dermojet (0,1 ml par animal). La lecture de la réaction est faite 48 h après l'injection.

Résultats

1. Spécificité de l'électrosynérèse

Les 60 sérums de moutons appartenant à un troupeau indemne de brucellose et pour lesquels

les épreuves de SAW, FC' et EAT sont négatives, furent soumis à l'ES. Aucune raie de précipitation ne fut observée avec l'antigène protéique employé dans ce travail.

2. Sensibilité de l'ES par rapport aux épreuves sérologiques classiques

Les moutons étudiés ont été saignés à plusieurs reprises.

a) Sur les moutons expérimentalement infectés, les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 1. Dans ce tableau sont indiqués, pour

chaque valeur de titre agglutinant en SAW, le nombre de sérums positifs correspondant en FC', EAT et ES. Si l'on considère comme positifs en SAW, non seulement les animaux faisant plus de 60 UI/ml mais aussi ceux faisant 30 et 60 UI/ml accompagnés d'une fixation du complément positive, 77 bêtes sur 182 soit 42,3 % seulement sont réagissantes dans cette épreuve.

L'examen du tableau 1 montre que la FC' et l'EAT sont de valeur sensiblement équivalente avec 58,8 % et 58,2 % respectivement. L'électrosynérèse apparaît comme l'épreuve la plus sensible avec 61,5 % d'animaux dépistés. Les quatre épreuves sont simultanément positives

pour 65 bêtes soit dans 35,7 % des cas seulement. Par contre, si l'on admet qu'une seule épreuve positive parmi les quatre permet de considérer l'animal comme positif, 132 bêtes sont alors dépistées soit dans 72,5 % des cas.

Il est particulièrement intéressant de noter que plusieurs sérums très positifs en SAW, FC' et EAT sont négatifs en ES, tandis que des sérums négatifs en SAW et même en FC' et EAT sont, par contre, réagissants en ES. On constate que les premiers sérums correspondent aux prises de sang effectuées juste après l'infection expérimentale alors que les seconds ont été prélevés plusieurs semaines après celle-ci. L'électrosyné-

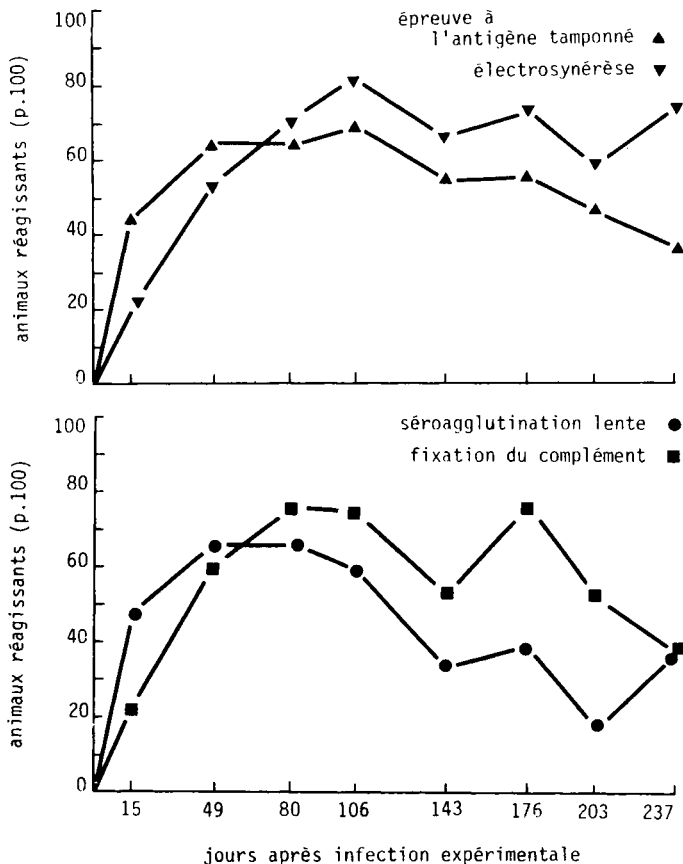


Fig. 1. — Comparaison entre épreuves de SAW, FC', EAT et ES effectuées sur des sérums de moutons expérimentalement infectés.

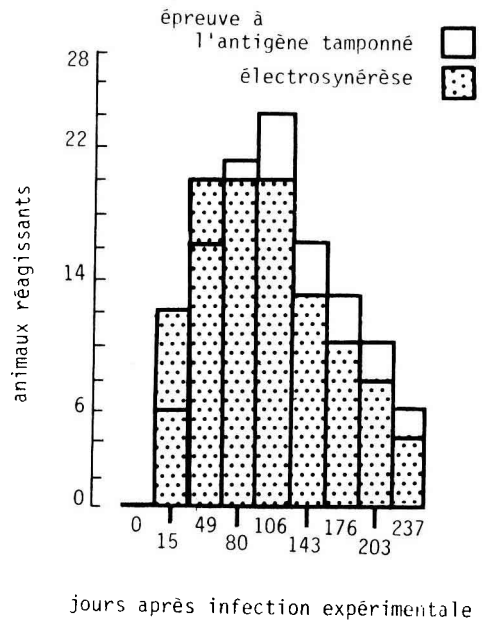
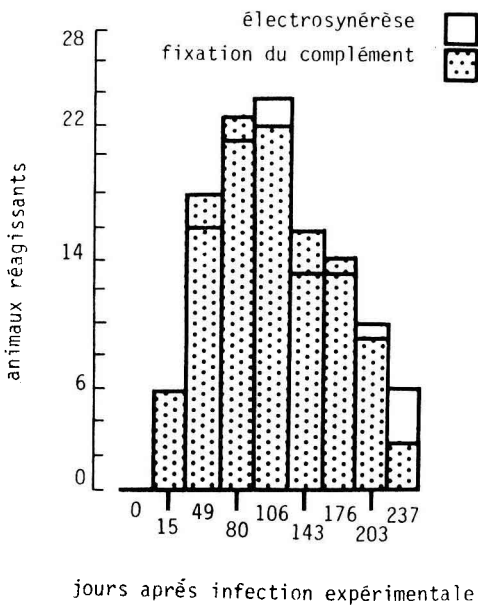
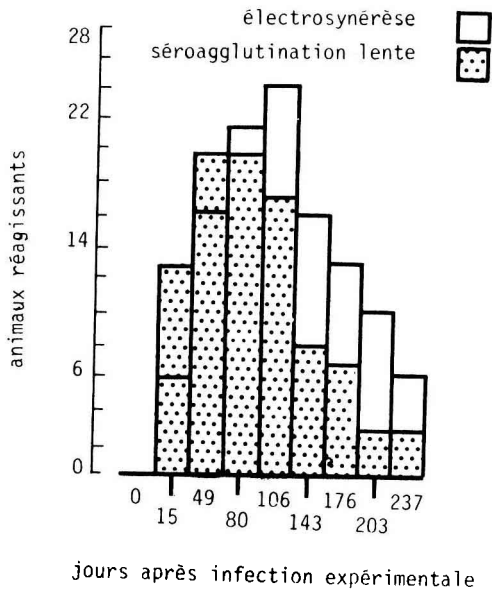


Fig. 2. — Comparaison entre SAW et ES, FC' et ES, EAT et ES sur des sérums de moutons expérimentalement infectés.

rèse met donc en œuvre des anticorps apparaissant tardivement dans les sérums mais persistant aussi plus longtemps chez l'animal. La figure 1 représente l'évolution dans le temps du pourcentage d'animaux réagissants dans chaque épreuve sérologique employée. La figure 2 compare pour chaque jour de prélèvement le nombre d'animaux trouvés positifs en ES avec celui de la SAW, de la FC' et de l'EAT.

b) Sur les moutons appartenant à un troupeau atteint de brucellose chronique, les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 2. Si, comme précédemment on considère comme positifs en SAW les animaux faisant plus de 60 UI/ml et ceux faisant 30 et 60 UI/ml avec une FC' positive, 19 bêtes seulement soit 5,4 % sont dépistées par la SAW. Dans un troupeau atteint de brucellose chronique, il semble que la FC' soit, parmi les épreuves sérologiques classiques, celle qui permet de dépister le plus d'animaux. Elle est positive, en effet, dans 31,4 % des cas tandis que l'EAT ne l'est que dans 12,4 %. L'ES permet de détecter 28,3 % des animaux, ce qui confirme bien que cette épreuve fait intervenir les anticorps persistants longtemps chez l'animal. Des épreuves allergiques pratiquées sur ces moutons révèlent un taux de 24 % d'animaux réagissants.

Il faut noter que les épreuves de séroagglutination très positives correspondent à des animaux venant d'avorter chez lesquels le taux d'agglutinines s'est brusquement élevé. Enfin, 157 animaux sur 356 soit 44 % ont été trouvés positifs à l'une au moins des quatre épreuves sérologiques.

Discussion

Dans ce travail, l'électrosynérèse a été effectuée avec un antigène préparé à partir de la souche *Brucella abortus* 2308 S d'Olitzki. Cette dernière souche fut choisie car une étude effectuée par Thorel (1967) sur les antigènes cytoplasmiques solubles d'une trentaine de souches différentes de brucella a montré qu'elle donnait le plus grand nombre de raies de précipitation en analyse immunoelectrophorétique, correspondant à un minimum de 10 fractions antigéniques différentes. Ce travail confirmait aussi qu'il n'existe pas de différences qualitatives entre les antigènes endocellulaires des diverses souches mais seulement des différences quantitatives. De plus, des épreuves d'électrosynérèse furent effectuées avec des antigènes préparés selon la technique décrite

dans ce travail à partir de la souche *Brucella abortus* 99 de Weybridge (employée pour les épreuves sérologiques classiques), *Brucella melitensis* 53 H 38 (souche employée pour l'infection expérimentale des moutons) et *Brucella melitensis* Rev. 1. Aucune différence, ni dans l'apparition des raies de précipitation, ni dans leur nombre ne fut observée entre ces quatre antigènes.

L'antigène employé pour l'électrosynérèse est en grande partie de nature protéique. On sait en effet, qu'en matière de brucellose, les antigènes lipopolysaccharidiques sont peu précipitants. De plus, comme l'ont précisé Diaz *et al.* (1976) le LPS et le polysaccharide B migrent vers la cathode en ES ce qui exclut leur utilisation dans cette technique. Le nombre de raies de précipitation varie de 1 à 5 et comme ces auteurs l'ont d'ailleurs constaté, ce nombre augmente avec le temps dans les sérums, pour être maximum (5 raies) vers le troisième mois après l'infection expérimentale.

Parmi les épreuves mettant en œuvre des anticorps précipitants, l'électrosynérèse donne selon Myers *et al.* (1979) des résultats équivalents à la diffusion en gélose mais la rapidité avec laquelle les résultats sont obtenus doit la faire préférer à cette dernière.

Ce travail montre que l'électrosynérèse permet d'obtenir une réponse à un antigène autre que le LPS, impliqué en particulier dans la SAW et l'EAT, en mettant en œuvre des anticorps dirigés contre les antigènes endocellulaires. Ces anticorps sont d'apparition tardive et persistent longtemps dans les sérums. En effet, comme le montre la figure 1 pour les moutons expérimentalement infectés, on constate que 15 jours après l'infection, 48 % des animaux sont positifs en SAW, 44,5 % en EAT tandis que 22 % seulement sont réagissants en FC' et en ES. Par contre, au jour 237, si 75 % des moutons sont encore positifs en ES, la SAW, la FC' et l'EAT n'en dépistent plus que 37,5 %. L'électrosynérèse doit être employée en particulier pour le dépistage des infections chroniques. Muhammad *et al.* (1980) préconisent cette épreuve associée à l'EAT pour la surveillance des troupeaux de moutons.

Enfin, il faut souligner que l'électrosynérèse présente l'avantage de pouvoir être employée, à l'opposé des épreuves sérologiques classiques sur des sérums hémolysés ou présentant une activité anticomplémentaire.

Accepté pour publication, le 10 février 1982.

Remerciements

Nous adressons tous nos remerciements au personnel du Service des Maladies de la Repro-

duction pour sa collaboration dans ce travail et en particulier à Madame Tessier, qui a effectué une grande partie des épreuves d'électrosynérèse.

Résumé

Les sérums de 30 moutons infectés expérimentalement et de 126 autres appartenant à un troupeau atteint de brucellose chronique sont étudiés comparativement par la séroagglutination lente à 37 °C, la fixation du complément, l'épreuve à l'antigène tamponné et l'électrosynérèse. Tandis que les épreuves sérologiques classiques, en particulier la SAW et l'EAT, font intervenir essentiellement les anticorps dirigés contre les constituants de la paroi des brucella (LPS) l'électrosynérèse permet d'obtenir une réponse à des antigènes d'origine endocellulaire. Cette épreuve met en jeu des anticorps qui apparaissent tardivement mais persistent longtemps dans les sérums. Elle est donc recommandée pour le dépistage des animaux atteints de brucellose chronique chez qui la SAW et même souvent la FC et l'EAT sont devenues négatives.

Références

- ALTON G.G., MAW J., ROGERSON B.A., McPHERSON G.G., 1975. The serological diagnosis of bovine brucellosis : an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Aust. Vet. J.*, **51**, 57-63.
- BUSSARD A., 1959. Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel : l'électrosynérèse. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 258-260.
- CORBEL M.J., 1972. Evaluation of an immunodiffusion test for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in bovine serum. *J. Med. Microbiol.*, **6**, 67-76.
- DIAZ R., 1972. Importance de la réaction de précipitation sur gelose dans le diagnostic de la brucellose. *Ouest Méd.*, **25**, 967-968.
- DIAZ R., MARAVI-POMA E., RIVERO A., 1976. Comparison of counter immunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bull. O.M.S.*, **53**, 417-424.
- DIAZ R., MARAVI-POMA E., DELGADO G., RIVERO A., 1978. Rose bengal plate agglutination and counter-immunoelectrophoresis tests on spinal fluid in the diagnosis of *Brucella meningitis*. *J. Clin. Microbiol.*, **7**, 236-237.
- DIAZ R., DORRONSORO I., 1971. Contribucion al diagnostico serologico de brucelosis y yersiniosis. I utilidad de la reaccion de precipitacion en gel. *Rev. Clin. Esp.*, **121**, 367-372.
- GENTILINI M., PINON J.M., 1972. Intérêt de l'électrosynérèse (ou immunoélectro-diffusion) sur membrane d'acétate de cellulose dans le diagnostic de l'hydatidose. Etude comparée avec les autres réactions de précipitation. *Ann. Méd. Interne*, **123**, 883-886.
- JONES L.M., BERMAN D.T., MORENO E., DEYOY B.L., GILSDORF M.J., HUBER J.D., NICOLETTI P., 1980. Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 753-760.
- LÉGISLATION FRANÇAISE, 1981. Arrêté interministériel du 23 mars 1981. *J. Off. Repub. Fr.* 28 mars 1981, 3244-3247.
- MUHAMMED S.I., MOHAMMADI H., SAADI-NAM H., 1980. A comparison of counter-immunoelectrophoresis with the rose bengal and the serum tube agglutination tests in the diagnosis of brucellosis in sheep. *Vet. Microbiol.*, **5**, 223-228.
- MYERS D.M., VARELA-DIAZ V.M., 1979. Serodiagnosis of ram epididymitis by counter immunoelectrophoresis, using *Brucella ovis* surface R antigen. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 451-453.
- NICOLETTI P., 1969. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 1811-1816.
- ROUX J., 1978. La sérologie de la brucellose. *Med. Hyg.*, **36**, 453-456.
- THOREL M.F., 1967. *Analyse immunoélectrophorétique des antigènes dans le genre Brucella*. Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Spécialité physiologie cellulaire, Université de Paris.
- TRAP D., 1969. *Mise au point d'une technique de séparation des antigènes solubles dans le genre Brucella par chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne*. Diplôme d'Etudes Supérieures 3^e cycle, Université de Paris.