

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT  
RURAL ET DE L'HYDRAULIQUE

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES  
AGRICOLES (I.S.R.A)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES  
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE  
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES  
B.P. 2057

DAKAR-HANN

*Technique Laboratoire*

*OK*

*2V0001113*

*1.1.13*

RAPPORT DE MISSION

STAGE SUR LA SEROLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE

LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES VETERINAIRES DE  
MAISONS-ALFORT (FRANCE)

11 - 22 MARS 1991

PAR

M. KONTE

REF. N°037/PAT. INF.

MAI 1991.

## RESUME

L'auteur rend compte du déroulement du stage sur la sérologie de la **Leptospirose** qu'il a effectué au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires de Maisons-Alfort sous l'égide de **l'EMVT** du 11 au 22 mars 1991.

Ce stage lui a permis de s'initier à la technique de référence en matière de diagnostic sérologique de la leptospirose et d'analyser par cette méthode 100 sérums de zébu sénégalais. 5 sérovars sont ainsi mis en évidence dont hardjobovis réputé agent abortif chez les bovins.

Sous l'égide de **l'IEMVT**, nous avons effectué, du 11 au 22 mars 1991, un stage au service de Bactériologie et Immunologie bactérienne du Laboratoire central de Recherches Vétérinaires (LCRV) de Maisons-Alfort en France, sur la sérologie de la Leptospirose animale. Madame Danièle TRAP en a assuré la Direction.

Ces travaux constituent une partie importante des recherches que nous menons actuellement dans le cadre de notre thèse de Doctorat **d'Etat** ès Sciences biologiques qui sera présentée à l'Université Cheikh **Anta** DIOP de Dakar sur le sujet suivant : "Fécondité et facteurs bactériens majeurs d'infertilité chez les femelles bovines au Sénégal ; approche séro-épidémiologiques".

Ce stage a été pour nous **l'occasion**, à la fois, de nous initier à la méthode de référence en matière de diagnostic sérologique de la Leptospirose et d'éprouver par cette technique un certain nombre de **sérums** de bovins récoltés au Sénégal pour les besoins de ladite thèse.

Les frais de voyage et de séjour ont été pris en charge par **l'IEMVT**.

#### VOYAGE ET ACCUEIL

- Départ de **Dakar-Yoff** : le samedi 9 mars à **22h30** par vol **Air** Afrique.
- Arrivée à Roissy CDG : le dimanche 10 mars à **8h30**, via Bamako et Marseille.
- Lundi 11 mars : visite à **l'IEMVT** (acte de présence), puis au LCRV (prise de contact et esquisse du programme de stage avec Mme **TRAP**) enfin au **CIES** (organisme de gestion des stagiaires pour perception de la bourse).

#### DEROULEMENT DU STAGE

##### I. Programme du stage

- Technique du test de micro-agglutination (M.A.T.)
  - . N.A.T. qualitatif
  - . M.A.T. quantitatif

.../...

- Autres techniques de sérologie-Leptospirose
  - . Macro-agglutination TR
  - . Elisa
- Elisa-Leptospirose à l'Institut Pasteur de Paris
- Techniques de la PCR
- Brucellose des petits ruminants.

## II. Exécution du programme

### A. Le test de micro-agglutination (MAT) et son application

L'initiation théorique à la méthode, d'abord faite par Mme TRAP complétée par son assistante, est aussitôt suivie de la pratique par le traitement d'une centaine de sérums de zébu sénégalais apportés par nos soins à cet effet.

#### - Définition et principe du MAT

Le test de micro-agglutination, réaction de référence, permet l'identification et le sérotypage des souches de Leptospires par la mise en évidence et le titrage des anticorps sériques spécifiques. C'est en fait l'ancienne réaction d'agglutination-lyse de MARTIN et PETIT de 1918.

Le principe consiste à mettre en présence le sérum à tester avec une culture de Leptospires, puis à évaluer au microscope à fond noir le degré d'agglutination.

#### - Antigènes ou souches de Leptospires

Un certain nombre de souches, représentatives des principaux séro-groupes, sont choisies comme antigènes destinés à l'identification d'une infection par un sérovar inconnu au moyen de l'agglutination microscopique.

Pour la sérologie bovine qui nous intéressait, onze (11) antigènes ont été retenus : icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, australis, pomona, canicola, sejroe, hardjo, autumnalis, hebdomadis, ballum et bataviae.

.../...

Les antigènes sont repiqués chaque semaine au niveau de l'Institut Pasteur (Centre national de Référence pour les Leptospires) qui ravitaille le LCRV à sa demande. Ils sont utilisés âgés de 4 jours au minimum et de 14 jours au maximum.

Avant utilisation, les antigènes sont dilués en eau physiologique tamponnée (dans du tampon Sorensen, au LCRV) de façon à obtenir une concentration de 1 à  $2.10^8$  leptospires/ml, correspondant à une densité en fond noir de ++.

En pratique : si densité de ++ : employer une culture pure pour la réaction  
si densité de +ii- : diluer au 1/2  
si densité de ++++ : diluer au 1/3 (au LCRV : 1 partie d'antigène pour 2,5 partie de tampon Sorensen).

- M.A.T. (ou dépistage) qualitatif = screening

Les sérums à tester sont utilisés stériles si possibles, filtrés sur membranes de porosité 0,22 µm si contaminés, en tous les cas dilués au 1/50 (dilution du LCRV) en eau physiologique tamponnée.

Le mélange antigène-sérum s'effectue sur microplaque à fond plat en quantité égale, donnant une dilution finale des sérums au 1/100. Faire un témoin culture.

Les plaques sont agitées doucement puis placées couvertes (avec un ruban adhésif, évite l'évaporation des plaques séparées ou entre 2 plaques d'aluminium, méthode du LCRV évitant l'évaporation tout en assurant une bonne conduction thermique entre les plaques superposées) 2 h à l'étuve à 30°C, pour la méthode dite à chaud, ou une nuit à 4°C pour la méthode à froid.

Pour la lecture, transférer à l'aide d'un compte-goutte (méthode LCRV) ou d'une öse (méthode IPP) un aliquot de chaque cupule sur une lame et lire au microscope à fond noir. Il s'agit d'évaluer la quantité de Leptospires libres par rapport au témoin ; si elle est comprise entre 50 et 100 Z, la réaction est négative, si elle est inférieure à 50 Z, la réaction est positive.

Le seuils de positivité établi à ++ à la dilution de 1/100 selon les recommandations du Code Zoo-sanitaire International de 1982 est retenu par de nombreux pays bien que ce même Code propose en 1986 un seuil à 1/200.

1 à + au 1/1600 associé à hebdo. ++ au 1/200.

1 à + au 1/400 associé à **hardjo** +t au 1/200,  
hebdo. +++ au 1/100 et ballum ++ au 1/100.

1 à + au 1/200.

1 à +++ au 1/100.

2 à ++ au 1/100.

**hardjo** : 3 sérums positifs dont :

1 à + au 1/400 associé à sejroe + au 1/1600  
et hebdomadis +++ au 1/100.

1 à ++ au 1/200 associé à sejroe + au 1/400,  
hebdomadis +++ au 1/100 et ballum +++ au 1/100.

1 à ++ au 1/200 associé à sejroe + au 1/1600.

#### B. Autres techniques en sérologie-leptospirose

##### - La macro-agglutination sur lame ou TR

Réaction d'agglutination sur lame utilisant un antigène thermo-résistant (TR) préparé à partir d'une souche aquicole : Leptospira biflexa patoc.

La spécificité de sérotype disparaît dans cette réaction et les animaux récemment infectés sont seuls dépistés, contrairement au M.A.T. qu'il faut employer pour les élevages ou la leptospirose évolue depuis un certain temps.

##### - Technique Elisa

C'est la méthode classique appliquée à la recherche d'anticorps **anti-leptospires**. Elle utilise comme antigène la souche Leptospira biflexa patoc.

Technique simple mais d'exécution minutieuse, d'une bonne spécificité et d'une reproductibilité fidèle. Permet un diagnostic précoce mais aussi rétrospectif.

Lorsque la réaction est positive, l'on effectue un M.A.T. quantitatif dit de **confirmation** (au LCRV ne sont concernés que les sérums positifs à **+++** au **1/100°** pour déterminer le titre final du sérum vis-à-vis de chacun des antigènes concernés.

- M.A.T. (ou dépistage) quantitatif = confirmation

Ne sont repris que les sérums positifs au screening (**+++** au **1/100**). Ils sont alors dilués sous un volume de 50  $\mu$ l, du **1/50** au **1/6400**, en eau physiologique tamponnée sur microplaque.

L'antigène est ensuite réparti, 50  $\mu$ l dans chaque cupule réalisant une série de dilution du **1/100** au **1/6400**.

Incuber 2 h à **30°C** (ou une nuit à **4°C**), effectuer la lecture comme précédemment (notation de + à **+++** au LCRV).

La limite de positivité est définie comme la dilution la plus élevée où 50 % des Leptospires sont restés libres.

- Résultats M.A.T. des sérums de bovins sénégalais

. Sérovar ballum : 4 sérums positifs à **+++** au **1/100**  
8 sérums positifs à **++** au **1/100**

bataviae : 1 sérum positif à **++** au **1/100**  
associé à **ballum +++** au **1/100**

hebdomadis : 1 sérum positif à **+t** au **1/100**  
associé à Sejroe + au **1/1600** et à **hardjo** + au **1/400**.  
1 sérum positif à **+++** au **1/100** associé à sejroe + au **1/400** et à **hardjo ++** au **1/200**.  
1 sérum positif à **+t** au **1/100**.

sejroe : 7 sérums positifs dont :  
1 à + au **1/1600** associé à **hardjo** + au **1/400**  
et **hebdomadis +++** au **1/100**

Cependant, la méthode souffre de manque de standardisation en leptospirose animale. Les antigènes utilisés, les méthodologies, les seuils de positivité retenus diffèrent selon les auteurs, de sorte que la corrélation entre les résultats de M.A.T. pris comme référence et l'Elisa varie de 57,7 à 100 % selon les travaux,

#### C. L'ELISA-Leptospirose à l'Institut Pasteur de Paris

Sur suggestion de Mme TRAP, nous nous sommes rendus à l'Institut Pasteur, Centre national de Référence des Leptospires, pour y pratiquer la technique Elisa-Leptospires. Nous y avons été reçu par M. BARANTON, le responsable de l'Unité des Leptospires et travaillé avec ses collaboratrices.

#### D. La technique PCR (Polymerase chain reaction)

Mme TRAP a bien voulu nous initier à cette technologie nouvelle.

Le développement des techniques de Biologie moléculaire ouvre une ère nouvelle dans le repérage de l'agent pathogène. L'insuffisance des méthodes bactériologiques et immunologiques a naturellement orienté les recherches vers la mise au point de sondes nucléiques en vue d'améliorer la rapidité et la fiabilité du diagnostic. Des sondes à ADN total radio-actives ou biotinylées ont été préparées à partir de plusieurs souches pathogènes. Elles se révèlent très sensibles puisque les plus faibles quantités qu'elles détectent sont 1,5 et 5 pg soit environ 750 à 2 500 leptospires. Elles sont spécifiques et ne réagissent ni avec un grand nombre d'autres bactéries, ni avec d'autres spirochètes (*Borrelia*), ni avec des sérovars de leptospires saprophytes. Elles permettent un diagnostic rapide (4h). Cependant, une sonde à ADN total n'hybride que partiellement avec d'autres sérovars et la quantité d'ADN détectable peut varier de 1 à 100 selon les souches. Aussi, un mélange de sondes de plusieurs sérovars a été proposé pour améliorer le champ de détection.

En revanche, dans les enquêtes épidémiologiques, la caractérisation d'un sérovar est d'une grande importance. Ceci a conduit à la recherche de sondes de petite taille, spécifiques de la séquence de gènes codant pour la structure antigénique d'un seul sérovar. Ceci a été réalisé avec le sérovar hardjo

permettant la différenciation des 2 **sérotypes** : hardjo-prajitno et hardjobovis. La majorité des avortements chez les bovins **étant** liée à hardjobovis, une telle sonde est, à l'évidence, d'un grand **intérêt**.

#### E. Brucellose des petits ruminants

5 marge de l'objet principal de notre stage, l'opportunité nous a été donnée de discuter de brucellose ovine et caprine **avec** le Docteur B. GABIN-BASTUJI responsable de la section Brucellose dans le service de Mme **TRAP**.

En effet, il s'est toujours posé à nous, au **LNERV**, le problème de résultats peu ou pas significatifs rencontré dans l'**utilisation** de l'antigène Rose Bengale dans la sérologie des petits ruminants.

Aucune explication satisfaisante n'a pu être trouvée. Il a été suggéré l'**expérimentation** d'un allergène, la "**brucellergène OCB**" pour la révélation d'un **éventuel** état d'hypersensibilité retardée **induit** par l'infection brucellique des animaux ciblés.

Il nous a été promis un don d'allergène pour cette étude.

#### AUTRES CONTACTS

- **A l'IEMVT** : entretien avec le Dr P.C. **LEFEVRE**, chef du service de Pathologie infectieuse, mandaté Conseiller scientifique du Professeur **MOREAU**, notre Directeur de Thèse à titre étranger (**non rencontré**).

- A l'Institut Pasteur : nous avons demandé **et** obtenu la cession gratuite d'un certain nombre de souches de **Leptospires** (13 nous ont été données) afin de nous permettre d'effectuer au **LNERV**, l'**identification** des sérovars par la technique de micro-agglutination sur plaque.

- Avec le Laboratoire Vétérinaire départemental de Tours : analyse de 25 sérums de bovins sénégalais en agglutination en tubes-Listériose : 12 sont **positifs** tifs avec **+++** à **+++** au 1/320 et 1 avec **++** au 1/640.

.../...

REMERCIEMENTS

Pour nous avoir assuré l'encadrement le **plus** parfait qui soit, nous tenons à remercier ici très **sincèrement** Mme TRAP et **toute** son équipe.

Nos remerciements vont aussi à M. BARANTON **et** ses collaborateurs, et surtout aux autorités de **l'IEMVT**, sans lesquelles ce stage n'aurait pu avoir lieu, ainsi que celles de **l'ISRA** qui nous ont **autorisés** à l'effectuer.

VOYAGE RETOUR

- Départ de Roissy CDG : le samedi 30 mars **1991** à **9h30** par vol directe Air France.
- Arrivée à **Dakar-Yoff** : le même jour à **14h30**.