

COMPARAISON DES PERFORMANCES BIOLOGIQUES DE L'ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) ET DE LA DIFFUSION IN GEL ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (DIG-ELISA) DANS LE DEPISTAGE DE L'OESTROSE OVINE

Reçu le 08/04/2006 – Accepté le 13/06/2007

Résumé

L'ELISA et l'une de ses variantes la DIG-ELISA ont été testés afin d'apprécier leurs performances biologiques dans le dépistage de l'oestrose ovine. Des sérums et des gouttes de sang sur papier Wathmann provenant de 313 ovins sacrifiés à l'abattoir d'Ain Assel (El-Tarf) et conservés au laboratoire à des températures adéquates ont servi à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité de ces deux techniques.

La séroprévalence obtenue par l'ELISA est de 62,93 %. Ce taux est proche de celui de l'examen des têtes d'ovins et qui s'élève à 67,41 %. La sensibilité est donc de 93,36 %.

La dilution au 1/100^{ème} a donné pour la technique DIG-ELISA en concordance avec l'ELISA une sensibilité moyenne (67,51 %) et une bonne spécificité (91,17 %). La DIG-ELISA peut convenir donc comme outil de diagnostic de terrain dans le dépistage de l'oestrose

Mots clé : ELISA , DIG-ELISA , Oestrose.

Abstract

The ELISA and one of its variants the DIG-ELISA have been tested in order to appreciate their biologic performances in the detection of the ovine oestrose. Serums and drops of blood on Wathmann paper taken from 313 of heads of slaughtered ovine of Ain Assel (El-Tarf) and kept at the laboratory to adequate temperatures served to the assessment of the sensitivity and the specificity of these two techniques.

The séroprévalence obtained by the ELISA is of 62.93%. This rate is close to that of the test on heads of ovine and that rises to 67.41%. The sensitivity is therefore of 93.36%.

Dilution at 1/100th has given for the DIG-ELISA technique in concordance with the ELISA an average sensitivity (67.51%) and a good specificity (91.17%). The DIG-ELISA can therefore be a suitable tool of site diagnosis in the detection of the oestrosis.

Key words : ELISA , DIG-ELISA , Oestrosis.

S. SEDRAOUI¹
D.E BENOURETH²
A. MEKROUD³
M.H. DJEMLI⁴
A. BENAKHLA¹

¹ Institut des Sciences Vétérinaires Centre Universitaire El-Tarf Algérie.

² Département de Biologie Faculté de Sciences Université de Guelma Algérie.

³ Département des Sciences Vétérinaires Faculté des Sciences Université Mentouri Constantine Algérie.

⁴ Laboratoire de Parasitologie Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire Sidi Thabet Tunis Tunisie.

ملخص

() 313 " " "

% 62.93 " "

% 93.36 % 67.41

67.51 " " " " 1/100

" " " " % 91.17 %

L'oestrose ovine est une myiase due à la localisation et au développement des larves d'*Oestrus ovis* dans la sphère respiratoire supérieure. La maladie ne présente pas de symptômes pathognomoniques ; le jetage et la dyspnée peuvent la faire confondre avec d'autres affections [13].

Sur le plan lésionnel, un phénomène d'hypersensibilité local est parfois associé secondairement à des lésions pulmonaires [10].

Ces considérations ont conduit à la mise au point par de nombreux auteurs Bautista-Garfias *et al.* (1982, 1988) ; Ilchmann et Hiepe (1995) ; Yilma (1992) de diagnostics rapides et spécifiques s'appuyant sur la sérologie.

En Algérie, le seul diagnostic utilisé, à ce jour, concernant cette affection reste l'examen des têtes d'ovins sacrifiés. Cette technique basée sur la recherche de larves dans la cavité nasale et les sinus frontaux est très contraignante.

Cette étude rentre dans le cadre d'une recherche de méthodes immunologiques les mieux adaptées pour le diagnostic de l'oestrose dans notre pays. Certaines techniques comme l'immunoélectrophorèse ou l'hémagglutination passive sont peu sensibles ou lentes et grandes consommatrices de réactifs [1] ; [2].

Des études ont montré la possibilité d'emploi de la réaction immunoenzymatique ELISA [4] ; [11] ; [17] ; [9], elle nécessite néanmoins un matériel de laboratoire sophistiqué et coûteux.

La DIG-ELISA qui est basée sur le même principe que l'ELISA semble indiqué pour un dépistage de terrain notamment dans le cas de l'hypodermose bovine [3]. Il s'agit ici d'exposer les deux techniques et d'évaluer leurs performances biologiques.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de l'antigène

L'antigène est préparé à partir des larves de deuxième stade comme le préconise Bautista Grafias *et al.*, (1988).

- Broyer 75 L2 dans 30 ml d'une solution de tampon phosphate PBS pH7,2 (NaCl 4% ; KH₂PO₄ 0,1% ; KCl 0,1% ; Na₂HPO₄ ; 12H₂O 1,79%,).
- Centrifuger le broyat à 10.000 g pendant 30 min. à 4°C.
- Doser les protéines du surnageant selon la méthode modifiée de Lowry *et al.*, (1951) sur microplaques Nunc ELISA, avec de l'albumine bovine (B.S.A.).
- Déterminer la densité optique (D.O.) à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption à $\lambda = 550$ nm.

Sérum

Les sérums et les gouttes de sang déposés sur papier wathmann (carré de 3 cm²) proviennent de trois cents treize ovins sacrifiés à l'abattoir d'Ain Assel et dont 211 têtes sont infestées par des larves d'*Oestrus*.

Les tests utilisés

L'ELISA [4, 11, 9, 17]

- La veille du test, sensibiliser des microplaques NUNC, en déposant avec une pipette multicanaux dans chaque puits 100 μ l de solution d'antigène à

2,5 μ g/ml de tampon carbonate 0,1M pH 9,6 (Na₂CO₃ 0,192% ; NaHCO₃ 0,38%).

- Après une incubation d'une heure à 37°C, les plaques sont recouvertes avec du papier d'aluminium et placées à 4°C pour une nuit.
- Le lendemain, vider les plaques et les soumettre à quatre lavages automatiques au tampon PBS-Tween 20 à 0,1% (PBST).
- Saturer les sites non spécifiques par 200 μ l par puits d'une solution de gélatine à 0,5% dans du tampon carbonate.
- Incuber les plaques une heure à 37°C.
- Vider les plaques et ajouter 100 μ l/puits du sérum dilué dans du PBST contenant 0,5% de gélatine (PBSTG), (les sérums à tester, ainsi que les sérums de référence, positifs et négatifs, sont déposés en triplicats).
- Incuber les plaques 1 heure à 37°C.
- Effectuer ensuite quatre lavages automatiques avec du PBST, et déposer 100 μ l/puits de la solution de conjugué marqué à la peroxydase et diluée en PBSTG.
- Incuber les plaques une heure à 37°C.
- Après quatre lavages automatiques avec du PBST suivi de 2 lavages manuels à la pissette avec du PBS simple, déposer pour la révélation 100 μ l/puits d'une solution d'A.B.T.S. préparée extemporanément [pour une plaque, mélanger 15 ml de tampon citrate 0,1M pH4 (acide citrique 2% ; NaOH 0,65%) + 60 μ l d'H₂O₂ modifiée (25 μ l H₂O₂ + 725 μ l tampon citrate) + 75 μ l de solution d'A.B.T.S. (A.B.T.S. Boeringher 0,1 g dans 4,5 ml H₂O)].
- Couvrir les plaques et les incubées une heure à 37°C.
- La lecture s'effectue au spectrophotomètre à $\lambda = 405$ nm.

Les résultats sont exprimés en moyenne avec écart type des densités optiques corrigées, exprimées par le lecteur de plaques.

Les résultats pour chaque sérum à tester peuvent aussi s'exprimer en pourcentage d'anticorps par rapport à un pool de sérum de référence positive et un pool de sérum de référence négative : % AC : (Moy.D.O. ech.-Moy.D.O Ref.Neg.)/(Moy.D.O Ref.Pos.- Moy.D.O Ref. Neg.) X 100.

La DIG-ELISA [6, 8]

La mise au point de cette technique est facile.

- Sensibiliser des boîtes de pétri avec 10 ml d'antigène à 2,5 μ g/ml de tampon carbonate à 0,1M pH 9,6.
- Incuber les boîtes pendant une nuit à + 4°C.
- Laver les boîtes 3 fois avec du PBS, pH 7,2.
- Couler chaque boîte avec 20 ml de gélose SEA KEM. EM à 1% contenant de la gélatine à 0,5% dans du sérum physiologique.
- Réaliser des puits de 3mm de diamètre à l'emporte pièce dans la gélose refroidie.
- Déposer 10 μ l de sérum à tester/puits dilués au 1/100 dans du PBST.

- Laisser diffuser pendant 3 heures à température ambiante.
- Retirer la gélose des boîtes, et procéder à des lavages (3 fois) avec du PBST.
- Sécher les boîtes puis ajouter 10 ml/boîte de conjugué marqué à la peroxydase (Jackson) dilué au 1/15000 dans du PBST.
- Incuber les boîtes 1 heure et demi à température ambiante.
- Après 3 lavages avec du PBST, suivis de 2 avec du PBS, une gélose de révélation à 0,75% dans du tampon citrate à 0,1M pH 4 additionné de 240 µl d'H₂O₂ modifiée et 300 µl d'A.B.T.S. est coulée dans chaque boîte.
- La lecture se fait après trois minutes à température ambiante. Le résultat est considéré négatif (0) s'il n'y a pas de coloration, faiblement positif (++) en cas de coloration moyenne et nettement positif (+++) si la coloration est intense.

Résultats

Les performances biologiques des deux tests, ELISA et DIG-ELISA peuvent être déterminées par la spécificité et la sensibilité. Définissons ces deux notions :

La sensibilité d'un test est la probabilité d'obtenir une réponse positive par une technique de diagnostic ou de dépistage chez un sujet malade ou infecté.

La spécificité d'un test est la probabilité d'obtenir une réponse négative par une technique de diagnostic ou de dépistage chez un sujet indemne.

Tableau 1: Concordances entre sujets infectés et sujets non infectés

Technique de diagnostic	Sujets malades (infectés)	Sujets non malades (non infectés)
Réponse positive	a (VP)	b (FP)
Réponse négative	c (FN)	d (VN)

VP:Vrais positifs, FP:Faux positifs, FN:Faux négatifs, VN: Vrais négatifs

La sensibilité est le rapport $a / a+c$ (VP/(VP+FN)); La spécificité s'exprime par $d/b+d$ (VN/(VN+FP))

Il faut signaler ici que sensibilité et spécificité varient souvent en sens inverse : avec une technique très sensible le risque d'erreur par défaut ou faux négatifs (c) est faible mais celui des erreurs par excès ou faux positifs (b) peut augmenter.

Résultats de L'ELISA

Sur les 313 ovins sacrifiés, 211 étaient porteurs d'*Oestrus* ce qui représente un taux de 67,41%.

L'analyse par le test ELISA des 313 sérums prélevés sur ces animaux a révélé une séroprévalence de 62,93% (tab. 2).

Ce résultat est sensiblement proche de celui obtenu par l'examen des têtes d'ovins. Il a été relevé 14 cas de faux négatifs c'est-à-dire 14 ovins porteurs de larves d'*Oestrus* mais ayant des titres d'AC en dessous du

seuil de positivité. La sensibilité de l'ELISA est donc de 93,36 %.

Tableau 2 : Prévalence de l'oestrose ovine à l'abattoir d'Ain-Assel évaluée par le test ELISA et l'examen des têtes.

Technique de dépistage	Nbr d'animaux examinés	Nbr d'animaux positifs	Prévalence %
Examen des	313	211	67,41
ELISA	313	197	62,93

4.2. Résultats de la DIG-ELISA

Cette technique a été testée sur 313 sérums provenant des mêmes animaux. La dilution de 1/100^{ème} a été préconisée par Chauvin (1996) et Benakhla (1999).

A chaque fois la sensibilité et la spécificité de la DIG ont été déterminées par rapport à l'ELISA. Les résultats de concordance de l'ELISA par rapport à la DIG-ELISA sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Concordance ELISA par rapport à la DIG-ELISA avec une dilution du sérum au 1/100^{ème}

		ELISA		
		-	±	+
DIG	-	93	03	61
ELISA	++	9	11	03
	+++	0	0	133

La dilution 1/100^{ème} a donné une sensibilité de 67,51 % et une spécificité de 91,17%.

Discussion

Les techniques ELISA et DIG-ELISA ont présenté en tant qu'outil de diagnostic rapide de l'oestrose des sensibilités différentes.

Le test ELISA a donné une bonne sensibilité s'élevant à 93,36 %. Il est classé par différents auteurs en tête de liste des techniques immunologiques [7].

Il a par ailleurs l'avantage d'être appliqué aux lactosérums et au lait de mélange [4] ; [5].

L'étude de la fiabilité de la DIG-ELISA par rapport à l'ELISA avec une dilution de sérum au 1/100^{ème} comme le préconise le laboratoire d'immunopathologie des maladies parasitaires de l'INRA de Tours (France) [6] ; [3]. Ce dernier a mis en évidence vis-à-vis des hypodermes une sensibilité moyenne de 70,07% et une bonne spécificité (91,13%).

Etant donné que ce test ne nécessite pas de prélèvements sanguins, souvent mal acceptés par les éleveurs, n'exige aucun appareillage pour la lecture des résultats et qu'il est 10 fois moins cher que l'ELISA, celui-ci peut très bien convenir comme technique de terrain, pour la séroprévalence des troupeaux.

Les avantages de l'immunodiagnostic, par ELISA et ses variantes, dans le cas des enquêtes épidémiologiques des maladies parasitaires réalisées dans le contexte algérien ont été rapportés par

différents auteurs [3, 12, 16]. Ces derniers ont mis en évidence la possibilité de la fabrication et la purification d'antigènes de maladies comme la gale, la fasciolose, l'hypodermose et l'oestrose par nos laboratoires. Toutefois, pour que l'immunodiagnostic devienne un test de routine il faut que nos techniciens ne butent pas sur le problème d'approvisionnement en réactifs et produits chimiques.

CONCLUSION

Le dépistage de l'oestrose, basé sur la recherche des larves dans les fosses nasales et les sinus frontaux est très contraignant. L'introduction de moyens de diagnostic plus rapides et faciles à réaliser devient une nécessité. A ce propos, la technique ELISA reste par sa grande sensibilité et sa grande spécificité le meilleur outil de diagnostic de l'oestrose. Là où on ne dispose pas d'appareillage adéquat (lecteur de microplaques par exemple) la DIG-ELISA, test de sensibilité moyenne, peut être employé pour la détection des troupeaux.

REFERENCES

- [1]- Baustitas-Garfias C.R. ; Ruiz-Navarrete A. ; Morales M.F. ; Morilla G.A. Anticuerpos circulantes contra larvas de *Oestrus ovis* (Diptera : *Oestridae*) en cabras infestadas naturalmente. *Folia. Entomol. Mex.*, **52**, (1982). 75-86.
- [2]- Baustita-Garfias C.R.; Angulo-Contreras R.M. ; Garay-Garzon E. Sérologie diagnosis of *Oestrus ovis* (Diptera:*Oestridae*) in naturally infested sheep. *Med. Vet. Entomol.*, **2** , (1988). Pp: 351-355.
- [3]- Benakhla A. L'hypodermose bovine en Algérie : approche d'un plan de lutte. Thèse de Doctorat es Sciences, (1999). Université Mentouri Constantine (Algérie).
- [4]- Boulard C. Avantages de l'immunodiagnostic de l'hypodermose bovine établi par hémagglutination passive et par l'ELISA, à partir de sérum et de lactosérum sur la Numération. *Ann. Rech. Vet.*, **16**, (1985). 335-343.
- [5]- Boulard C. et Villejoubert C. Use of pooled serum or milk samples for the epidemiological surveillance of hypodermosis. *Vet. Parasit.* **39**, (1991). 171-183.
- [6]- Boulard C. Immunodiagnostic des maladies parasitaires des animaux de rentes *Rapport STD III*, Station PAP . (1996). INRA de Tours France.
- [7]- Chauvin A. ; Argenté G. ; Boulard C. Les méthodes de diagnostic de l'hypodermose. Utilisation pratique dans la lutte contre cette affection. *Rev. Med. Vét.*, **139**, (1988). 521-525.
- [8]- Chauvin A. Immunodiagnostic des maladies parasitaires des animaux de rentes. *Rapport STD III*, Station PAP. (1996). INRA de Tours France.
- [9]- Deconinck P. ; Pangui L.J. ; Carrière L. ; Dorchies Ph. Dépistage sérologique de l'oestrose ovine au Sénégal par la technique ELISA. *Rev. Med. Vet.*, **146**, (1995). 265-268.
- [10]- Dorchies Ph. ; Yilma M.J. ; et Savey M. Lung involvement in ovine oestrosis: Prevalence of lung abscesses and intestinal pneumonia. *Vet. Rec.*, (1993). 133: 325.
- [11]- Haralampidis S.T. ELISA in the sero-epidemiology of sheep and goats. *Bull.Hellenic Vet. Med. Soc.*, **38**, (1987). 215-223.
- [12]- Hemissi A., Mekroud A. et Benakhla A. Contribution à la mise au point de la purification des protéines antigéniques de *Fasciola hepatica*. Application au diagnostic immunologique par le test ELISA. *IV Colloque de Médecine Vétérinaire*, (2000). I.A.V. El-Tarf, 30 et 31 mai.
- [13]- Horak I. et Snijder A.J. The effect of *Oestrus ovis* infestation on merino lambs. *Vet. Rec.*, **94**, (1974). Pp:12-16.
- [14]- Ilchmann G. et Hiepe T. Immunological studies on the diagnosis of *Oestrus ovis* infestation. *Monatshefte für veterinärmedizin*, **40**, (1995). 304-307.
- [15]- Lowry O.H.; Rosberough N.J.; Farr A.L. et Randal R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, (1951). 265-275.
- [16]- Mekroud A. et Benakhla A. Serodiagnostic de la fasciolose des ruminants. Etude comparative de deux variantes sérologiques (ELISA et DIG-ELISA). *IV Colloque de Médecine Vétérinaire*, (2000). I.A.V. El-Tarf, 30 et 31 Mai.
- [17]- Yilma J.M. Contribution à l'étude de l'épidémiologie, du diagnostic immunologique, et de la physiopathologie de l'oestrose ovine. Thèse (1992). Institut National Polytechnique de Toulouse France.