

## Diagnostic sérologique par technique ELISA de l'uvéite du cheval induite par une infection leptospirosique : une alternative au test de micro-agglutination

Par :

- A. Leon, Laboratoire Frank Duncombe, / IFR 146 ICORE  
14053 Caen cedex
- S. Castagnet, Laboratoire Frank Duncombe, / IFR 146 ICORE  
14053 Caen cedex
- B. Chatrenet, VIRBAC, 13<sup>ème</sup> rue, LID, BP27, 06511 Carros  
Cedex
- G. Andre-Fontaine, B2ML, Ecole Nationale Vétérinaire de  
Nantes, atlantpole, La Chantrerie, BP40706, 44307 Nantes
- G. Fortier, Laboratoire Frank Duncombe, / IFR 146 ICORE  
14053 Caen cedexs)

### Résumé

Première cause de cécité dans l'espèce équine, l'uvéite, dans ses formes associées aux leptospires représente 60% des cas en France. Ce vice rédhibitoire est une entrave aux échanges internationaux et la part économique de cette pathologie n'est ainsi pas négligeable.

Cette étude présente le développement et la validation d'une méthode ELISA basée sur un fragment peptidique très immunogène de la protéine Hap1.

La comparaison des résultats obtenus par ELISA et MAT (test de micro-agglutination), sur 199 échantillons de sang de chevaux présentant des évidences clinique et ophtalmiques, a montré que ce nouveau test ELISA pouvait être une alternative au MAT qui reste aujourd'hui la méthode de référence. De plus, cette nouvelle méthode rapide permet de mettre en évidence une réponse immunitaire spécifique d'une infection active.

**Mots clés : ELISA, Uvéites, Cheval, Leptospires, Test de micro-agglutination**

### Summary

First cause of blindness in equine species, the uveitis, associated with leptospires represents 60 % of the cases in France. This latent defect is an obstacle in the international exchanges and the economic part of this pathology is not so unimportant.

This study present the development of an ELISA method based on a peptide fragment very immunogenic from protein Hap1.

The comparison of the results obtained by ELISA and MAT (micro-agglutination test), on 199 samples of blood from horses presenting clinical and ophthalmic evidences, had showed that this new ELISA test could be an alternative to the MAT which remains the reference method. Furthermore, this new rapid assat allows bringing to light a specific immunizing answer of an active infection

**Key-words : ELISA, uveitis, horse, leptospirosis, MAT**

## Introduction

Du fait de son mode de vie, le cheval est fréquemment exposé à l'infection par des leptospires. Première cause de cécité dans cette espèce, l'uvéite, dans ses formes associées aux leptospires représente 60% des cas en France. Ce vice rédhibitoire est une entrave aux échanges internationaux et la part économique de cette pathologie n'est pas négligeable (Faber *et al.*, 2000).

Le test de micro-agglutination (MAT), technique de diagnostic séro-groupe-spécifique, reste la méthode de référence pour le diagnostic des infections à leptospires et donc des uvéites dues à des leptospires. Cependant, elle demeure laborieuse puisqu'elle nécessite de maintenir toutes les cultures de leptospires en phase exponentielle de croissance. Par ailleurs, le résultat fourni est insuffisant quant à la prise en charge thérapeutique qui diffère selon qu'il s'agit d'une récurrence ou non (Levett, 2001).

En collaboration avec le laboratoire Virbac, le Laboratoire Frank Duncombe a mis au point une méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), alternative au MAT, basée sur la reconnaissance d'un fragment peptidique très immunogène (PP, brevet 2002) de la protéine Hap1 (Hemolysis Associated Protein 1). Cette protéine a la particularité d'être sécrétée par tous les leptospires pathogènes, pendant leur phase de multiplication intensive au contact de l'hôte infecté (Branger *et al.*, 2001). Cette méthode rapide permet de mettre en évidence une réponse immunitaire spécifique d'une infection active.

## 1. Méthode

Une première phase de validation a permis de définir la concentration en anti-globuline et les dilutions de sérum les mieux adaptées à l'espèce équine.

Une seconde phase a permis de tester l'ELISA sur 199 sérums de chevaux atteints d'uvéites, collectés par le laboratoire B2ML en 2002 et 2003.

## 2. Résultats

Les dilutions en anti-globuline (1g/L) au 1/8000<sup>ème</sup> ainsi que les sérums dilués au 1/400<sup>ème</sup> et au 1/800<sup>ème</sup> ont permis une bonne discrimination entre les échantillons positifs et négatifs, ce qui correspond respectivement à des DO (Densité Optique) seuils de positivité de 0,53 et 0,38.

Dans ces conditions, 199 sérums provenant de chevaux atteints d'uvéites ont été analysés par les techniques ELISA et MAT (Tableau 1).

Table 1 : Concordance entre le MAT et l'ELISA pour la Population Uvéite  
Table 1: Concordance between MAT and ELISA in uveitis population

		MAT			Total
		Positive [200-800[	Negative ≥ 800		
ELISA	Positive	45	14	32	<b>91</b>
	Negative	41	14	53	<b>108</b>
<b>Total</b>		<b>86</b>	<b>28</b>	<b>85</b>	<b>199</b>

Les résultats du MAT :

- permettent de conclure à une infection leptospirosique récente pour 14% des animaux testés (28/199) : titre  $\geq 800$ .
- ne permettent pas de conclure dans 43% des cas (86/199) : titres de 200-800. Ces titres étant très fréquemment retrouvés chez le cheval.
- rejettent l'hypothèse d'une participation des leptospires dans le déclenchement de l'uvéite dans 43% des cas (85/199) : MAT négatif.

Parmi ces 171 animaux, de titre agglutinant inférieur à 800 (85 animaux négatifs + 86 animaux aux titres 200-400), pour lesquels le MAT ne permet pas de conclure à l'implication des leptospires dans le

développement de l'uvéite, les résultats obtenus avec le test ELISA, démontrent une réaction sérologique caractéristique d'une infection leptospirosique active pour 77 sérums testés; ce qui justifie alors une prise en charge thérapeutique adaptée.

### 3. Discussion

Ce test ELISA de réalisation rapide, autorise un diagnostic des uvéites à leptospires chez le cheval plus efficace par la détection d'anticorps précoces, au regard du MAT qui détecte les anticorps agglutinants plus tardifs. De plus, la présence d'anticorps anti-PP caractérise une leptospirose en cours d'évolution et donne la possibilité de la différencier d'une infection antérieure. L'efficacité de ce test pourra être appréhendée pour les autres expressions cliniques associées aux leptospires afin de déterminer l'impact réel de la leptospirose dans la pathologie équine.

### Références

Branger, C., Sonrier, C., Chatrenet, B., Klonjkowski, B., Ruvoen-Clouet, N., Aubert, A., Andre-Fontaine, G., Eloit, M., 2001. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infection and Immunity* 69, 6831-6838

Faber, N.A., Crawford, M., LeFebvre, R.B., Buyukmihci, N.C., Madigan, J.E., Willits, N.H. 2000. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2731-2733.

Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296-326.

