

2m11.2777.5

Université de Montréal

Mise au point d'une épreuve ELISA indirecte pour la détection d'anticorps
anti-leptospires chez l'espèce canine

par

Marcelo Juan Ribotta

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires, option microbiologie

Septembre 1999

Marcelo Juan Ribotta



2.5 FEB 1962

SF
607
U54
2000
V.002



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Mise au point d'une épreuve ELISA indirecte pour la détection d'anticorps
anti-leptospires chez l'espèce canine

présenté par:

Marcelo Juan Ribotta

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Serge Messier:	Président du jury
Dr. Réal Lallier:	Directeur de recherche
Dr. Robert Higgins:	Codirecteur de recherche
Dr. Marcelo Gottschalk:	Codirecteur de recherche
Dr. K. R. Mittal:	Membre du jury

Mémoire accepté.....99-12-20.....

SOMMAIRE

Une épreuve ELISA indirecte a été développée pour la détection d'anticorps anti-leptospires dans des sérums d'origine canine. Une préparation antigénique spécifique de genre, stable à la chaleur et produite à partir de *Leptospira interrogans* sérovar Pomona a été utilisée dans cette technique immuno-enzymatique. D'autre part, une détermination de la prévalence des séroréacteurs envers différents sérovars de leptospires a été effectuée chez l'espèce canine au Québec, à l'aide du test ELISA et du test d'agglutination microscopique (MAT).

La préparation antigénique, élaborée à partir du sérovar Pomona, a réagi avec les sérums de lapin contre les sérovars Bratislava, Pomona, Autumnalis, Grippytyphosa et Icterohaemorrhagiae. Cette technique ELISA a démontré une spécificité relative de 95.6% avec 158 sérums d'origine canine, lesquels étaient négatifs à une dilution de 1:100, par le MAT, envers les sérovars Pomona, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Grippytyphosa et Hardjo. La sensibilité relative de l'épreuve a été de 100% avec 21 sérums d'origine canine, lesquels démontraient des titres supérieurs ou égaux à 1:100 envers un ou plusieurs sérovars. Parmi les chiens qui présentaient des titres d'anticorps anti-leptospires, le titre prédominant était dirigé contre le sérovar Pomona dans 66.7% des cas (14/21). Des titres prédominants contre le sérovar Bratislava ont été trouvés chez deux chiens, alors qu'un titre prédominant contre Grippytyphosa a été trouvé chez un seul animal. Quatre chiens ont uniquement présenté une réaction 1:100 contre le sérovar Icterohaemorrhagiae.

Cette épreuve ELISA s'est avérée facile à standardiser et techniquement plus avantageuse que le MAT, par le fait qu'elle utilise une préparation antigénique qui peut être préparée de routine et en grandes quantités. En conclusion, il apparaît que cette

épreuve est sensible et elle serait utilisable comme épreuve de tamisage pour la recherche d'anticorps anti-leptospires chez l'espèce canine, avec une confirmation subséquente des résultats positifs par le MAT.

TABLE DES MATIÈRES

	page
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiv
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
1. Taxonomie des membres du genre <i>Leptospira</i>	5
1.1. Nomenclature.....	5
1.2. Classification antigénique classique.....	6
1.3. Classification génétique.....	9
1.3.1. Hybridation ADN-ADN.....	9
1.3.2. Analyse par les endonucléases de restriction (REA).....	10
1.3.3. Présence de gènes ou de séquences de l'ADN spécifiques....	10
1.3.4. Amplification génomique arbitraire (RAPD).....	11
2. Caractéristiques des membres du genre <i>Leptospira</i>	11
2.1. Morphologie et structure génétique.....	11
2.2. Mobilité.....	13
2.3. Besoins nutritifs.....	13
2.4. Croissance.....	14

2.5. Composition antigénique.....	15
3. La leptospirose.....	24
3.1. Mode de transmission et état de porteur.....	24
3.2. Voies d'infection.....	25
3.3. Les manifestations cliniques chez les animaux	26
3.4. Les manifestations cliniques chez l'humain.....	26
3.5. Contrôle et prévention de la leptospirose.....	27
4. La leptospirose chez l'espèce canine.....	28
4.1. Sérovars impliqués en Amérique du Nord.....	29
4.2. Manifestations cliniques.....	30
4.3. Pathogénie de la leptospirose canine.....	31
5. Le diagnostic de la leptospirose.....	32
5.1. Méthodes directes.....	32
5.1.1. Isolement des leptospirés.....	32
5.1.2. Méthodes de visualisation des leptospirés.....	34
5.1.3. Méthodes moléculaires.....	35
5.2. Méthodes indirectes.....	36
5.2.1. Épreuve d'agglutination microscopique (MAT).....	36
5.2.2. Épreuve ELISA.....	37
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	42
Article: Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antileptospiral antibodies in dogs.....	43
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	69

V. BIBLIOGRAPHIE.....	75
VI. ANNEXES.....	91

LISTE DES TABLEAUX

	page
REVUE DE LA LITTÉRATURE	
Tableau 1. Caractéristiques phénotypiques permettant de différencier certaines espèces dans la famille des <i>Leptospiraceae</i>	8
Tableau 2. Pathogénie de la leptospirose canine.....	33
MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	
Table I. Frequency distribution of the optical densities at 450 nm (OD ₄₅₀) values in an indirect ELISA using a heat-stable antigen from serovar Pomona of negative canine sera (N=158) against different serovars, as tested by MAT.....	61
Table II. Determination of relative specificity and sensitivity of ELISA for the detection of antileptospiral antibodies in dog sera.....	62
ANNEXES	
Tableau I. Valeurs de densité optique à 450 nm (OD ₄₅₀) obtenues avec une épreuve ELISA indirecte utilisant une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir des sérovars Pomona, Bratislava et Icterohaemorrhagiae et différents sérums de lapin.....	94

Tableau II. Distribution des valeurs de densité optique à 450nm (OD ₄₅₀) obtenues avec une épreuve ELISA indirecte utilisant une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir du sérovar Pomona et différents sérums de chien MAT positifs et négatifs.....	95
---	----

LISTE DES FIGURES

page

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

- Figure 1. Optical density (OD₄₅₀) results of indirect ELISA using a heat-stable antigen from serovar Pomona and rabbit antisera against *Leptospira interrogans* serovars Pomona (P), Bratislava (B), Autumnalis (A), and Icterohaemorrhagiae (I), *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa (G) and negative rabbit serum (Ne)..... 60
- Figure 2 SDS-PAGE gel of *Leptospira interrogans* serovars Pomona (P), Autumnalis (A), Hardjo (H), Icterohaemorrhagiae (I) and Bratislava (B), and *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa (G) heat stable antigenic preparation that were silver stained. Arrows indicate the positions of mol. weight markers in KDa..... 63
- Figure 3. Immunoblot of heat-stable antigenic preparation from serovar Pomona resolved by SDS-PAGE and reacted with the positive canine serum (Lane A), the anti-Pomona rabbit serum (Lane B) and the five of seven MAT negative but ELISA positive canine sera (Lanes C to G). Positions of molecular mass markers are indicated on the left.. 64

ANNEXES

- Figure 1. Valeurs de densité optique à 450 nm (OD_{450}) obtenues dans une épreuve ELISA indirecte utilisant différentes concentrations d'une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir du sérovar Pomona (A, B et C) et différents sérums de lapin MAT positifs et négatifs..... 92
- Figure 2. Stabilité de la préparation antigénique produite à partir du sérovar Pomona..... 93
- Figure 3. Immunotransfert d'une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir des sérovares Pomona (P), Bratislava (B), Icterohaemorrhagiae (I), Hardjo (H), Autumnalis (A) et Grippytyphosa (G), séparée par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide) et mise en présence du sérum de chien utilisé comme contrôle positif fort dans le test ELISA. Les positions des standards de poids moléculaires sont indiquées à gauche..... 96
- Figure 4. Immunotransfert d'une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir des sérovares Pomona (P), Grippytyphosa (G), Bratislava (B), Icterohaemorrhagiae (I), Autumnalis (A) et Hardjo (H), séparée par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide) et mise en présence du sérum de lapin anti-Pomona. Les positions des standards de poids moléculaires sont indiquées à gauche..... 97

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AcM:	Anticorps monoclonaux
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARNr:	Acide ribonucléique ribosomal
BRENDA:	Analyse de l'ADN par endonucléases de restriction bactériennes
C:	Cytosine
DAP:	Diaminopurine
ELISA:	“ Enzyme-linked immunosorbent assay ” (ELISA, test immuno-enzymatique)
EIA:	“ Enzyme immunoassay ” (EIA, test immuno-enzymatique)
G:	Guanine
H:	“ Heavy chain ” (chaîne lourde de l'Ig)
ICSB:	Comité International sur la Bactériologie Systématique
Ig:	Immunoglobuline
KDa:	Kilodalton
<i>L.</i> :	<i>Leptospira</i>
L:	“ Light chain ” (chaîne légère de l'Ig)
LLS:	“ Lipopolysaccharide like-substance ”
LPS:	Lipopolysaccharide
MAT:	Test d'agglutination microscopique
NDTP :	Haptène nondialyzable non-lipidique extrait de l'antigène TM
OD ₄₅₀ :	Densité optique à 450 nm
OLS:	Oligosaccharide

PBST:	PBS avec 0.05% de Tween 20
PCR:	Réaction de polymérisation en chaîne
PGFE:	Electrophorèse en gel pulsé
RAPD:	“ Randomly amplified polymorphic DNA ” (Amplification génomique arbitraire)
REA:	Analyse par les endonucléases de restriction
RIA:	“ Radioimmunoassay ” (radioimmunoessai)
<i>rrf</i> :	gène codant pour l'ARNr 5S
<i>rrl</i> :	gène codant pour l'ARNr 23S
<i>rrs</i> :	gène codant pour l'ARNr 16S
SD:	“ Standard deviation ” (déviatiion standard)
SDS-PAGE:	“ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ” (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium).
TBS:	Bouillon trypticase soy
TM:	Antigène “ type-main ”
TSCL:	Sous-Comité sur la Taxonomie de <i>Leptospira</i>

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet et plus particulièrement

- Le docteur Réal Lallier, professeur titulaire au Département de pathologie et de microbiologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance, ses conseils, pour son soutien financier et pour sa disponibilité tout au long de ce projet.
- Le docteur Robert Higgins, professeur titulaire au Département de pathologie et de microbiologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour sa co-direction, pour sa grande disponibilité, pour son aide grandement appréciée pour les travaux écrits, pour ses encouragements, pour ses grandes qualités humaines, pour sa patience et pour ses judicieux conseils tout au long de ce projet.
- Le docteur Marcelo Gottschalk, professeur agrégé au Département de pathologie et de microbiologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour sa co-direction, pour sa constante présence, pour ses précieux conseils et pour les travaux effectués dans son laboratoire.
- Le docteur Béatrice Doizé, professeur titulaire au Département de pathologie et de microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire.
- Le docteurs Serge Messier et K. R. Mittal de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

- Le docteur J. F. Prescott de l'Université de Guelph, pour m'avoir donné les sérums de lapin spécifiques de sérovar utilisés au cours de ce projet.
- Irène Bouffard du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation de Sainte-Foy, pour m'avoir donné les différentes souches de leptospires utilisées au cours de ce projet et pour m'avoir enseigné la technique d'agglutination microscopique.
- France DeLasalle, agente de recherche, pour son grand enthousiasme et pour l'aide appréciée qu'elle m'a apportée au cours de ce projet.
- Sonia Lacouture, agente de recherche, pour son assistance technique précieuse lors de la réalisation des immunotransferts.
- Tous les étudiants du GREMIP, pour m'avoir supporté et pour leur témoignages d'amitié.
- Tous mes amis d'Argentine qui m'ont soutenu lors de toutes mes années d'études.
- Ma femme, pour tous ses encouragements et son soutien moral.
- Mes parents, pour l'éducation qu'ils m'ont donnée et pour les sacrifices qu'ils n'ont pas hésité à faire pour permettre ma formation.
- Enfin, je veux exprimer toute ma gratitude et mon amour à ma mère, ma tante Cecilia, ma grand-mère Lydia et toute ma famille, qui savent être toujours là malgré l'éloignement pour m'apporter un soutien inconditionnel et m'encourager avec tendresse et confiance dans toutes les voies où je m'engage. Ces quelques mots sont bien insuffisants pour témoigner de ma reconnaissance...

Merci à tous

I - INTRODUCTION

La leptospirose est une maladie infectieuse causée par des spirochètes appartenant au genre *Leptospira*. Elle est présente sur tous les continents et peut affecter une grande variété d'espèces animales, ainsi que l'humain. Les leptospires pathogènes sont divisés en huit espèces sur la base de leurs relations génétiques et plus de 220 sérovars différents ont été jusqu'ici identifiés. La plupart de ces sérovars peuvent infecter différentes espèces animales, mais il existe, pour chaque sérovar, un réservoir, ou un hôte porteur, qui assure la persistance et la dissémination de l'organisme. Le chien est l'hôte naturel ou définitif du sérovar Canicola et il est considéré comme l'hôte accidentel de plusieurs autres sérovars.

Les sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae ont été les plus communément associés à la leptospirose canine et ce, jusqu'en 1986. Néanmoins, à partir de 1990, l'incidence de la maladie attribuée à ces deux sérovars a diminué, tandis que le nombre de cas de leptospirose canine associée aux autres sérovars, particulièrement les sérovars Grippityphosa et Pomona, a augmenté considérablement. Ce changement dans la leptospirose canine est probablement dû à l'utilisation de vaccins contre les sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae et possiblement, aux nombreux contacts dans les centres urbains et péri-urbains, entre les chiens et les mouffettes ou les raton-laveurs, lesquels agissent comme réservoirs des sérovars Grippityphosa et Pomona.

La sérologie semble être l'outil le plus fiable pour le diagnostic des infections dues à *Leptospira* spp. chez les chiens. Actuellement, le diagnostic de la leptospirose est réalisé avec le test d'agglutination microscopique (MAT). Le MAT est spécifique, mais il est laborieux, il exige la culture continue et le maniement d'organismes vivants ce qui représente un risque d'infection pour les travailleurs du laboratoire et leur interprétation est subjective. Il y a donc une nécessité pour une technique rapide, sensible et simple,

qui puisse être utilisée de routine comme épreuve de tamisage pour la détection d'anticorps anti-leptospire dans des sérums chez l'espèce canine. L'épreuve immuno-enzymatique ELISA est simple, sans danger et elle peut être facilement automatisée. Les hypothèses de ce projet étaient que l'utilisation d'un test ELISA, spécifique de genre, peut devenir un outil de tamisage idéal pour analyser un grand nombre de sérums. De plus, comme la vaccination n'offre qu'une protection spécifique de sérovar, l'exposition des chiens à d'autres sérovares que ceux contenus dans les vaccins commerciaux peut représenter un risque de transmission zoonotique.

Ainsi, l'objectif principal de ce projet était la mise au point d'une épreuve ELISA indirecte pour la détection d'anticorps anti-leptospire dans des sérums d'origine canine. L'objectif secondaire était d'évaluer l'incidence de la leptospirose canine due aux sérovares Pomona and Grippotyphosa au Québec, afin de suggérer des mesures de contrôle adéquates.

II - REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Taxonomie des membres du genre *Leptospira*

1.1. Nomenclature

Les leptospires font partie d'un groupe de bactéries hélicoïdales appelées spirochètes. Ces derniers sont des micro-organismes appartenant à l'ordre des *Spirochaetales*, lequel comprend deux familles, à savoir les *Spirochaetaceae* et les *Leptospiraceae*. Parmi les genres qui composent la première famille se trouvent, entre autres, *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, *Borrelia*, *Serpulina* et *Brachyspira*, alors que les genres *Leptospira* et *Leptonema* sont retrouvés dans la deuxième famille (Holt et coll., 1994; Ochiai et coll., 1994).

En 1982, le genre *Leptospira* comprend trois espèces. Il s'agit de *Leptospira interrogans* regroupant les souches pathogènes pour l'homme et/ou l'animal, *L. biflexa* rassemblant les souches non pathogènes isolées de l'eau, de la boue et parfois de l'homme ou de l'animal et *L. parva*, reconnue non pathogène et isolée de l'eau (Liste N° 9, I.J.S.B., 1982; Johnson et Faine, 1984). *Leptonema illini* est la seule espèce appartenant au genre *Leptonema*. Ce dernier genre est décrit par Hovind-Hougen en 1979 et sa validation est publiée en 1983 (Liste N° 10, I.J.S.B., 1983; Holt et coll., 1994).

Ce n'est qu'en 1986 que le Comité International sur la Bactériologie Systématique (ICSB), plus particulièrement le Sous-Comité sur la Taxonomie de *Leptospira* (TSCL), reconnaît la publication de Hovind-Hougen pour la désignation d'un nouveau genre, *Leptonema*, avec l'espèce *L. illini*.

En 1990, Ellis présente au TSCL, une publication sur les caractères distinctifs connus de *L. parva*, une espèce décrite par Hovind-Hougen et coll. en 1981, avec les observations subséquentes de Yasuda et coll. en 1987 et de Saito et coll. en 1987. Après

une longue discussion sur les différences entre *L. parva* et les membres des genres *Leptonema* et *Leptospira*, le TSCL accepte la proposition d'un nouveau genre, *Turneria*, avec l'espèce *T. parva* H. Cette nomenclature devait être validée mais aucune proposition n'a été publiée dans International Journal of Systematic Bacteriology et cette appellation, bien que largement utilisée, n'est pas officiellement valide.

Les membres du genre *Leptospira*, pathogènes ou saprophytes, peuvent être classifiés selon une classification sérologique classique ou selon une classification génétique. Selon la classification sérologique classique tous les leptospires pathogènes appartiennent à l'espèce *L. interrogans* et tous les leptospires saprophytes, à l'espèce *L. biflexa* (Wohl, 1996).

1.2. Classification antigénique classique

Le schéma de taxonomie des leptospires, basé sur des différences antigéniques, est le plus ancien et est ainsi qualifié de classique. Le sérovar représente le taxon de base dans cette classification. D'un point de vue pratique, les sérovats antigéniquement reliés sont réunis en sérogroupe. Les leptospires pathogènes appartenant à l'espèce *L. interrogans* sont divisés en 23 sérogroupe et en plus de 220 sérovats tandis que les leptospires saprophytes, appartenant à l'espèce *L. biflexa*, sont divisés en 38 sérogroupe et en 65 sérovats. Les espèces *L. parva* et *L. illini* contiennent respectivement un et deux sérovats (Yasuda et coll., 1987; Kmety et Dikken, 1988; Faine, 1994; Woodward et coll., 1997).

Tel que mentionné précédemment, la composition antigénique des leptospires est à la base de la classification sérologique en sérovats (Johnson et Faine, 1984). Le sérovar auquel appartient un leptospire est déterminé en trois étapes (Dikken, 1986). En

premier lieu, le leptospire est identifié à l'espèce en utilisant des critères tels que la pathogénicité, l'activité lipasique, le contenu en bases guanine et cytosine de l'ADN, ainsi que la croissance en présence de certains composants chimiques (Tableau 1) (Faine, 1994; Holt et coll., 1994). Par la suite, le séro groupe est défini à l'aide du test d'agglutination microscopique (MAT) en utilisant la souche inconnue et des antisérums de "groupe". Un antisérum de "groupe" agglutine tous les sérovars à l'intérieur d'un séro groupe avec un titre élevé et réagit peu avec les souches appartenant à d'autres séro groupes (Dikken, 1986). Finalement, on procède à la sérotypie afin de préciser le sérovar. La procédure classique utilise le MAT croisé, effectué après absorption de l'antisérum correspondant à la souche inconnue avec les antigènes hétérologues. La définition d'un sérovar est la suivante: "Deux souches sont considérées comme appartenant à des types sérologiques distincts si, après absorption croisée par une quantité appropriée de l'antigène hétérologue, l'antisérum de l'une au moins des deux souches conserve régulièrement, dans des tests répétés par rapport à la souche homologue, un titre au moins égal à 10% de celui qu'il accusait primitivement avec cette souche " (Stalman, 1987; Faine, 1994). Une méthode alternative pour classifier les leptospires sur la base de leurs différences antigéniques consiste à utiliser des anticorps monoclonaux (AcM). Des AcM spécifiques de sérovar, de séro groupe, d'espèce et même de genre ont été décrits. La classification selon cette méthode présente une corrélation avec la classification sérologique classique (Adler et Faine, 1983a; Adler et coll., 1989; Jost et coll., 1988; Wagenaar, 1994).

Tableau 1. Caractéristiques phénotypiques permettant de différencier certaines espèces dans la famille des *Leptospiraceae* (Yasuda et coll., 1987).

Caractéristiques phénotypiques	Leptospires pathogènes	Leptospires saprophytes	<i>Leptonema illini</i>	<i>Leptospira parva</i>
Pathogénicité	+	-	-	-
Croissance à 13°C	-	+	+	+
Croissance à 37°C	+	+/-	+	+
Croissance TBS	-	-	+	-
Croissance 8-az.	-	+/-	+	+
Croissance DAP	+/-	+/-	-	-
Activité lipasique	+/-	+	+	+
G+C (mol.%)	35.3-39.9	38-41	47.4	51.2-53

+ 90% ou plus des souches sont positives.

- 90% ou plus des souches sont négatives.

+/- 11-89% des souches sont positives.

TBS: bouillon trypticase soy

8-az.: 8-azaguanine (225 µg/ml)

DAP: 2-6 diaminopurine (10 µg/ml)

1.3. Classification génétique

Les méthodes de classification basées sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) comprennent l'hybridation ADN-ADN, l'analyse par les endonucléases de restriction (REA), le ribotypage, la détermination de la présence de séquences spécifiques de l'ADN, ainsi que des méthodes basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Wagenaar, 1994).

1.3.1. Hybridation ADN-ADN

Le test d'hybridation ADN-ADN permet d'observer le degré d'homologie entre les membres de la famille *Leptospiraceae*. En 1987, Yasuda et coll. utilisent le test d'hybridation de l'ADN pour caractériser les espèces de la famille *Leptospiraceae*. Ils constatent que les espèces *L. interrogans* et *L. biflexa* sont extrêmement hétérogènes. Ils proposent donc la formation de sept nouvelles espèces. Il s'agit de *L. weillii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. meyeri* et *L. wolbachii*. Les cinq premières espèces s'ajoutent à *L. interrogans* dans la catégorie des leptospires pathogènes et les deux autres se joignent à *L. biflexa* dans le groupe des leptospires saprophytes. Les résultats obtenus lors de ces études confirment la validité de la création des espèces *Leptonema illini* et *Leptospira parva*.

En 1992, Ramadass et coll. utilisent le test d'hybridation de l'ADN pour caractériser les espèces du groupe des leptospires pathogènes. Ils suggèrent, en plus des espèces pathogènes déjà proposées par Yasuda et coll. en 1987, la création d'une nouvelle espèce, *L. kirschneri*.

En 1998, Perolat et coll. en utilisant le test d'hybridation ADN-ADN confirment la création d'une nouvelle espèce pathogène, *L. fainei*.

1.3.2. Analyse par les endonucléases de restriction (REA)

En 1981, Marshall et coll. introduisent le REA, aussi appelé analyse de l'ADN par endonucléases de restriction bactériennes (BRENDA), comme méthode de classification pour le genre *Leptospira*. Le REA permet la différenciation ou la discrimination des souches à l'intérieur des différents sérovars.

La méthode consiste à extraire de l'ADN à partir d'une population homogène d'organismes, suivie d'une digestion de l'ADN par les endonucléases de restriction et de l'électrophorèse dans un gel d'agarose. La digestion produit une série de fragments, lesquels migrent dans le gel d'agarose en formant un profil de bandes. Ce profil de bandes constitue une trace digitale pour un ADN particulier. Néanmoins, la digestion par les endonucléases de restriction résulte fréquemment en la formation de cent ou même de mille fragments, lesquels gênent la différenciation entre les profils de bandes. Ces problèmes peuvent être solutionnés en utilisant des enzymes de restriction qui produisent peu de fragments d'ADN, en conjonction, avec la séparation des fragments par électrophorèse en gel par champs pulsés (PFGE).

De plus, le REA peut être utilisé en combinaison avec des sondes d'hybridation. Lorsque les sondes utilisées sont basées sur les séquences ribosomales, la méthode s'appelle ribotypage. Cette dernière méthode permet de classifier presque tous les sérovars connus (cité par Wagenaar, 1994).

1.3.3. Présence de gènes ou de séquences de l'ADN spécifiques

L'utilisation de sondes d'ADN, pour établir la présence de séquences nucléotidiques spécifiques, offre la possibilité de discriminer des souches à l'intérieur d'un même sérogroupe (cité par Wagenaar, 1994).

1.3.4. Amplification génomique arbitraire (RAPD)

Un des désavantages de l'utilisation des techniques mentionnées auparavant est la quantité d'ADN requise. Quant à la PCR, elle nécessite seulement une petite quantité d'ADN et de plus, elle peut être effectuée directement sur les cellules bactériennes. L'utilisation d'amorces arbitraires de PCR est appelé RAPD. Cette méthode permet la discrimination entre les différents sérovars de leptospires. Tous les systèmes de classification basés sur l'utilisation de l'ADN ont une très bonne corrélation avec la classification génétique réalisée par hybridation ADN-ADN décrite par Yasuda et coll. (cité par Wagenaar, 1994).

2. Caractéristiques des membres du genre *Leptospira*

2.1. Morphologie et structure génétique

Les leptospires sont des bactéries unicellulaires, Gram-négatives, mobiles, minces, de forme hélicoïdale et ayant, d'une façon typique, l'une ou les deux extrémités en forme de crochet. La longueur d'une cellule varie de 6 à 20 μm avec une longueur d'onde de 0.3 à 0.6 μm et un diamètre d'environ 0.1 μm (Holt et Stanley, 1978; Johnson et Faine, 1984; Hovind-Hougen, 1986; Baldwin et Atkins, 1987).

Les leptospires sont recouverts d'une enveloppe externe comprenant une couche de surface et une membrane externe. Sous cette enveloppe externe se trouve une couche de peptidoglycane, qui donne à la cellule sa rigidité, puis le cylindre protoplasmique. Ce dernier est délimité par la membrane cytoplasmique qui renferme les régions nucléaire et cytoplasmique. L'espace périplasmique, situé entre l'enveloppe externe et la couche de peptidoglycane, contient deux filaments axiaux ou flagelles. Ceux-ci ont une extrémité

insérée à un pôle du cylindre protoplasmique alors que l'autre extrémité est libre et se rend jusqu'à la région centrale de la cellule, sans chevaucher l'extrémité du flagelle opposé (Hovind-Hougen, 1986).

Les bactéries du genre *Leptonema* ont une longueur de 13 à 15 μm avec une longueur d'onde d'environ 0.6 μm et une amplitude de 0.13 μm . Ces bactéries diffèrent morphologiquement des leptospires par la présence de tubules cytoplasmiques. L'extrémité du flagelle s'insère par une paire de disques, semblables à ceux des flagelles des bactéries Gram-négatives, tandis que deux paires de disques sont observées chez les membres du genre *Leptospira* (Hovind-Hougen, 1979; Faine, 1994). *L. parva* se distingue des espèces *L. interrogans* et *L. biflexa* par une cellule plus courte 3.5 à 7.5 μm , avec une longueur d'onde moins étendue 0.3-0.36 μm et une amplitude de 0.13 à 0.14 μm (Faine, 1994). Contrairement aux autres leptospires, *L. parva* présente de petites vésicules au niveau de la couche de surface, lorsque cette dernière est détachée. De plus, ses flagelles se chevauchent au centre de la cellule (Hovind-Hougen et coll., 1981).

Sur le plan génétique, des études effectuées sur quelques souches révèlent des particularités. Le génome est constitué de deux chromosomes circulaires, l'un de 3850 à 5450 kb et l'autre de 350 kb. Ce dernier n'est pas un plasmide car il contient le gène *asd* qui code pour une enzyme (l'aspartate bêta-semi-aldéhyde déshydrogénase) essentielle dans la biosynthèse des acides aminés et de la paroi et il est qualifié de petit chromosome. Par comparaison avec une bactérie telle que *Escherichia coli*, les gènes codant pour les ARNr sont originaux par leur nombre et leur organisation. En effet, ils sont peu nombreux 2 copies du gène *rrs* (codant pour l'ARNr 16S), 2 copies du gène

rrl (codant pour l'ARNr 23S) et une copie du gène *rrf* (codant pour l'ARNr 5S)) et répartis isolément sur le chromosome.

2.2. Mobilité

Les leptospires sont mobiles grâce à des flagelles périplasmiques (filaments axiaux ou endoflagelles). Les mouvements caractéristiques des leptospires dans les milieux liquides ou fluides apparaissent comme une alternative entre le mouvement de rotation sur leur axe long et le mouvement de translation en direction de l'extrémité sans crochet. Au microscope à fond noir, on distingue un mouvement en pas de vis (mouvement de tire-bouchon), des mouvements d'allongement et de raccourcissement successifs (mouvements d'accordéon) et des ondulations (mouvements de serpents) (Holt et coll., 1994).

2.3. Besoins nutritifs

Les leptospires sont aérobies stricts, catalase positive, oxydase négative et chimio-organotrophes. Ils utilisent des acides gras ou des alcools gras ayant 15 atomes ou plus comme source de carbone et d'énergie. Ils n'utilisent pas les hydrates de carbone ou les acides aminés comme source d'énergie. Les seules sources d'azote reconnues sont les sels d'ammonium et la désamination d'acides aminés. Les leptospires n'incorporent pas les bases pyrimidiques et l'adjonction de 5-fluoro-uracile (100 µg/ml) est mise à profit pour rendre partiellement sélectifs les milieux de culture. De plus, ils ont besoin des vitamines B₁ et B₁₂ et certaines souches requièrent de la biotine. Le phosphate, le calcium, le magnésium et le fer (Fe⁺³) ou la portion hème,

comme l'hémoglobine ou l'hématine sont aussi indispensables (Holt et coll., 1994; Faine, 1994).

2.4. Croissance

Les membres du genre *Leptospira* sont cultivés sous des conditions particulières. Il existe de nombreux milieux commerciaux destinés à la culture des leptospires. Parmi ceux-ci, il y a des milieux qui contiennent du sérum de lapin (e.g. milieu Korthof) et des milieux sans sérum, dans lesquels on retrouve les complexes albumine sérique bovine-acide oléique ou des "tweens" comme source d'acides gras, avec l'albumine sérique bovine comme agent détoxifiant (e.g. le milieu EMJH). Parmi les autres milieux disponibles, il y a le milieu Bey and Johnson, le milieu Shenberg, le milieu SPL-5X et le milieu PLM-5. Les deux premiers ne contiennent pas d'albumine sérique bovine et sont utilisés surtout pour la préparation des vaccins.

Les leptospires sont cultivés sous des conditions d'aérobiose, à une température de 29-30° C. Le pH doit être légèrement alcalin, soit 7,7. Sous ces conditions, leur temps de génération moyen est d'environ 12 heures. Le temps d'incubation peut toutefois se situer entre 3 et 10 jours, mais plusieurs laboratoires gardent les milieux au moins 30 jours avant de donner un résultat négatif. Des milieux semi-solides, contenant entre 0.1 et 0.05 % d'agar sont recommandés pour l'isolement primaire et pour la maintenance des cultures.

Le premier signe indiquant qu'il y a croissance dans un milieu liquide est une bi-réfringence à peine perceptible, qui est vue comme un tourbillon dans le tube, lorsque celui-ci est placé contre un fond sombre. Les cultures plus abondantes sont manifestement troubles. Au contraire, le premier signe de la croissance dans un milieu

semi-solide est la formation d'un petit bouton opaque, juste en bas de la surface du milieu. Rapidement, les organismes mobiles forment une masse sphérique opaque d'environ 2 mm de diamètre (Faine, 1994).

2.5. Composition antigénique

En plus de leur utilisation en taxonomie, les antigènes leptospiriens sont aussi utilisés dans les méthodes diagnostiques. La connaissance des différents épitopes des leptospires permet de reconnaître des antigènes communs à une espèce, à un genre, ou à tous les membres de la famille des *Leptospiraceae*. L'enveloppe externe des leptospires est composée d'antigènes exposés et spécifiques de sérogroupes qui réagissent au MAT et aussi, d'antigènes spécifiques de genre non-exposés. Les antigènes spécifiques de séro groupe sont composés de lipopolysaccharides (LPS) tandis que les antigènes responsables des réactions croisées au niveau du séro groupe sont composés de protéines (Trueba et coll., 1990).

Un antigène spécifique de type ("type main" ou TM) peut être extrait des leptospires appartenant aux sérovars Kremastos (souche Kyoto) groupe *Hebdomadis*, hebdomadis (souche Hebdomadis-variant), Icterohaemorrhagiae (souche Shibaura et souche RGA), Pomona (souche pomona) et Canicola (Shinagawa et Yanagawa, 1972; Kasai et Yanagawa, 1974; Adachi et Yanagawa, 1978) à l'aide du phénol (90 %) et purifié par agitation avec de l'eau, puis par un traitement enzymatique et précipitation à l'éthanol. Cette glycolipoprotéine s'avère spécifique de sérovar dans les épreuves d'immunodiffusion et de fixation du complément. Le profil du spectre d'absorption dans l'infrarouge indique que l'antigène TM est composé majoritairement de LPS (Shinagawa et Yanagawa, 1972).

La réaction de fixation du complément entre l'antigène TM d'une souche de leptospires et l'antisérum homologue est inhibée par l'haptène nondialyzable non-lipidique extrait de l'antigène TM (antigène NDTM) (Adachi et Yanagawa, 1975; Adachi et Yanagawa, 1978). La réaction d'agglutination microscopique d'une souche leptospirienne est inhibée par les antigènes homologues TM et NDTM (Adachi et Yanagawa, 1977; Sugiyama et Yanagawa, 1978).

L'inhibition de l'épreuve de radioimmunoessai (RIA) est considérée comme spécifique de sérovar. Les antigènes TM du sérovar Kremastos, souche Kyoto, induisent une forte inhibition de l'union de l'antigène $^3\text{H-TM}$ avec le sérum anti-Kremastos Kyoto. Les antigènes TM du sérovar Hebdomadis, lesquels appartiennent au même sérogroupe que le sérovar Kremastos, induisent seulement une très faible inhibition, alors que les antigènes TM des sérovars Pomona, Copenhageni et Icterohaemorrhagiae, lesquels appartiennent à des sérogroupe différents de celui du sérovar Kremastos, n'induisent pas d'inhibition (Kawaoka et coll., 1979).

La nature des épitopes de l'antigène TM n'est pas clairement établie puisqu'une partie de l'activité peut être observée à la suite de l'oxydation des hydrates de carbone par le périodate et de la digestion des protéines par des enzymes protéolytiques (Kasai et Yanagawa, 1974; Adachi et Yanagawa, 1975; Kawaoka et coll., 1979; Tsuji et coll., 1981). Plusieurs auteurs (Adachi et Yanagawa, 1977; Sugiyama et Yanagawa, 1978; Shimono et coll., 1979) émettent l'hypothèse que l'antigène TM se localiserait à la surface de la cellule suite à l'observation d'une inhibition de la réaction d'agglutination microscopique par cet antigène. Sakamoto et coll. (1985a) confirment cette hypothèse en démontrant, par microscopie électronique, que des anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope de l'antigène TM se fixent spécifiquement à la surface de la cellule.

Faine et coll. (1974) préparent un antigène spécifique de sérovar appelé fraction 4 (F4), par une extraction alcaline et des précipitations à l'éthanol puis à l'acide acétique glacé. Cet antigène est une glycolipoprotéine. Considérant sa spécificité sérologique et sa composition chimique, l'antigène F4 serait un épitope du LPS. L'oxydation de l'antigène F4 par le p-phénylène-diamine démontre que la portion saccharidique est importante pour l'activité antigénique. Adler et Faine (1978) illustrent, par immunofluorescence indirecte, que l'antigène F4 est accessible à la surface des cellules entières. En 1979, Adler et Faine observent que les antigènes F4 extraits de plusieurs sérovats croisent sérologiquement à l'intérieur et entre les divers sérogroupes. De même, Fairbrother (1985) note la présence d'une réponse immunitaire envers l'antigène F4 extrait du sérovar Pomona chez des bovins infectés expérimentalement avec des leptospires appartenant au sérovar Hardjo. Les antigènes TM et F4 réagissent différemment dans les épreuves d'immunodiffusion, d'inhibition de l'hémagglutination et par l'absorption sélective des antisérums (Adler et coll., 1980a).

En 1982, Ono et coll. produisent divers AcM contre l'antigène TM du sérovar Canicola et les classifient en trois groupes selon leurs réactions croisées. Les déterminants antigéniques des antigènes TM appartenant au groupe I sont reconnus par l'AcM CT3, les déterminants antigéniques du groupe II sont reconnus par l'AcM CT5 et les déterminants antigéniques du groupe III sont reconnus par l'AcM CT6. Les AcM CT3 et CT5 agglutinent fortement le sérovar Canicola et faiblement les sérovats Summeri (CT3) et Jonsis (CT5).

Un antigène glycolipidique du sérovar Canicola, extrait avec une solution chloroforme/méthanol/eau, puis purifié à l'aide de la chromatographie sur gel de silice et de la chromatographie en couche mince, réagit avec les AcM CT3 et CT5 dirigés contre

un épitope de l'antigène TM du même sérovar, indiquant que ces deux préparations possèdent des épitopes communs. En plus, cet antigène glycolipidique réagit avec le facteur du sérum Ca-3, lequel réagit avec le sérovar Broomi et avec les antisérums des sérovares Malaya, Benjomuni, Icterohaemorrhagiae et Pyrogenes. Ces faits suggèrent que plus de deux déterminants antigéniques existent sur le glycolipide (Ono et coll., 1987).

En 1992, Gitton et coll. réalisent une étude sur sept souches de *L. interrogans* appartenant à sept sérogroupes différents et sur une souche appartenant à *L. biflexa* au moyen de SDS-PAGE avec gels de gradient et immunotransfert avec sérum de lapin contre chaque souche. Les sérovares de *L. interrogans* étudiés présentent des profils électrophorétiques très semblables caractérisés par 24 bandes, dont dix sont des bandes majeures (110, 86, 76, 43, 41, 38, 34 et 21 kDa) et 14 bandes mineures (158, 139, 135, 100, 81, 67, 56, 32, 31, 29, 27, 14 et 13 kDa). Ce profil n'a pas été trouvé chez *L. biflexa*. Les résultats obtenus par immunotransfert avec les sept sérums anti-*L. interrogans* montrent huit bandes communes (110, 100, 43, 41, 38, 34, 32 et 21 kDa). De plus, ils trouvent une zone antigénique spécifique de sérovar ou de sérograve entre les bandes de 21 à 26 kDa.

En 1994, la reconnaissance d'antigènes leptospiriens par des chiens vaccinés ou infectés expérimentalement a été étudiée par Gitton et coll. Au moyen de l'épreuve MAT et par immunotransfert, ils observent que la reconnaissance immunologique des chiens est identique à celle obtenue chez des lapins (Gitton et coll., 1992). Les résultats obtenus par immunotransfert révèlent que les antigènes spécifiques de sérovar détectés par le MAT migrent à la zone de 18 à 30 kDa et que ces antigènes sont du LPS.

Les diverses préparations de leptospires, avec toutes les caractéristiques et propriétés du LPS (Vinh et coll., 1986) ont été appelées "lipopolysaccharide-like substances" (LLS) (Shimuzu et coll., 1987) parce que les auteurs doutent de l'authenticité du lien KDO-like et parce que la substance s'avère non-toxique, comme le LPS des bactéries Gram-négatives. Néanmoins, la chromatographie sur papier du KDO des LPS provenant du sérovar Hardjo révèle que ces LPS ont la même mobilité électrophorétique que l'authentique KDO (Vinh et coll., 1989).

Les profils électrophorétiques du LPS extrait des leptospires par une solution phénol-eau chaude, selon la méthode de Wesphal et Jann (1965) sont très différents de ceux observés avec du LPS lisse provenant des bactéries Gram-négatives. Les profils présentent trois bandes principales et diffuses localisées entre 18 à 30 kDa et d'autres bandes compatibles avec la région du core des bactéries Gram-négatives en forme de canne (Faine, 1994). Les profils électrophorétiques de l'enveloppe externe et du LPS provenant de divers sérovares et l'immunotransfert à l'aide d'AcM spécifiques d'un épitope du LPS, permettent de constater que les LPS sont une partie constituante de l'enveloppe externe (Cinco et coll., 1988). Plusieurs études utilisant des AcM démontrent que le LPS est spécifique de sérovar ou de sérogroupe et qu'il possède plusieurs épitopes (Jost et coll., 1986; Farelly et coll., 1987; Ono et coll., 1987; Chapman et coll., 1988; Kelson et coll., 1988). Un épitope commun se retrouve chez l'antigène TM et le LPS du sérovar Copenhageni, car des AcM dirigés contre un épitope de nature saccharidique de ce sérovar réagissent avec les deux préparations dans une épreuve d'immunodiffusion (Jost et coll., 1986).

L'immunité dans la leptospirose est d'origine humorale et les anticorps impliqués dans les réactions d'agglutination et d'opsonisation ont une grande importance. Les LPS

sont les seuls antigènes leptospiériens identifiés comme opsonisants et agglutinants (Adler et Faine, 1983b; Jost et coll., 1986; Farelly et coll., 1987). Des études récentes indiquent que l'immunisation avec le LPS ou la fraction PS induit une très bonne réponse immunitaire et que celle-ci peut conférer une protection chez les animaux infectés avec des leptospires virulents appartenant à la souche homologe (Jost et coll., 1989). En 1994, Mildwinter et coll. purifient une fraction oligosaccharidique à partir de LPS provenant de *L. interrogans* sérovar Pomona. Ils observent que l'oligosaccharide (OLS) inhibe la liaison d'AcM protecteurs et opsonisants dirigés contre le LPS. De plus, l'OLS conjugué au toxoïde diphtérique induit la production d'anticorps, lesquels agglutinent les leptospires appartenant à des sérovars homologues et hétérologues.

Le rôle des antigènes protéiques n'est pas clair. Nunes-Edwards et coll. (1985) étudient les antigènes protéiques du sérovar Hardjo au moyen de la radio-immunoprécipitation avec un antiserum de lapin. Ils identifient des protéines ayant des masses moléculaires entre 30 et 67 kDa, dont quelques-unes sont présentes dans l'enveloppe externe et apparemment exposées sur la surface cellulaire du leptospire. L'identité de ces protéines et leur rôle dans la pathogénicité et l'immunité envers l'infection ne sont pas connus. En 1983, Adler et Faine obtiennent un AcM (D5) spécifique à l'espèce *L. interrogans* et qui, par immunofluorescence indirecte, ne réagit pas avec les leptospires intacts. En 1988, Jost et coll. identifient un antigène protéique spécifique d'espèce (non-opsonisant et non-agglutinant) de 35 kDa dans des extraits d'enveloppe externe, mais provenant probablement du matériel périplasmique ou de la surface intérieure de l'enveloppe externe (Faine, 1994).

Un antigène extrait des sérovars Kremastos et Canicola par un traitement au Triton X-100 a été partiellement purifié sur une colonne de DEAE-cellulose puis

précipité à l'éthanol. Cet antigène est une glycoprotéine de 62 kDa démontrant une spécificité au genre *Leptospira* et qui réagit avec l'AcM GP-7 (Sakamoto et coll. 1985b). Cet anticorps monoclonal spécifique au genre *Leptospira* se fixe à l'enveloppe externe seulement lorsque cette structure est détachée du cylindre protoplasmique, suggérant de nouveau que ces épitopes se localisent sur la surface interne de l'enveloppe externe (Sakamoto et coll. 1985a). En raison de la localisation interne des épitopes, les AcM spécifiques d'espèce ou de genre sont incapables d'agglutiner les leptospires.

En 1983, Terpstra et Schoone analysent trois préparations antigéniques différentes produites à partir de sérovar *Icterohaemorrhagiae* par contre-immunoelectrophorèse croisée en utilisant un sérum de lapin anti-*Leptospira* sérovar Patoc. Ils observent que l'antigène 1 du système de référence est présent dans toutes les préparations antigéniques. Cet antigène peut être obtenu en grande quantité à partir de la préparation antigénique provenant du traitement des leptospires par la formaline et la chaleur (Terpstra et coll., 1980). L'antigène 1 contient 18.1 mg de protéines et 7 μ g de carbohydrates par ml. Le traitement avec des enzymes qui produisent la fragmentation de protéines détruit l'activité enzymatique suggérant que l'antigène est une protéine. La présence d'hydrates de carbone peut être expliquée par la nature glycoprotéique de l'antigène ou par une impureté de la préparation causée par des polysaccharides. Cet antigène soluble, probablement spécifique de genre induit la formation d'anticorps qui n'agglutinent pas les leptospires vivants. La localisation anatomique de l'antigène paraît être somatique ou subcellulaire parce que le traitement avec la formaline enlève l'enveloppe externe et endommage le cylindre protoplasmique, alors que le traitement avec la chaleur détruit le filament axial ainsi que l'enveloppe

externe. De plus, les auteurs démontrent que la préparation antigénique obtenue par un traitement avec la formaline et la chaleur présente quatre fractions probablement avec différentes spécificités.

Kelson et coll. (1988) isolent les flagelles de sérovars appartenant aux espèces *L. interrogans*, *L. biflexa* et *L. illini*. Quoique quelques différences aient été observées, les préparations flagellaires extraites à partir des différents sérovars montrent des profils électrophorétiques semblables. L'immunotransfert de ces préparations montre que les composants flagellaires dans la région de 20 à 30 kDa ont été révélés seulement par l'antisérum de lapin homologue, tandis qu'une double (doublet) protéine de 33-34 kDa ou de 35-36 kDa, dépendant de l'espèce, a été détectée par l'antisérum hétérologue. Les bandes spécifiques de sérovar dans la région de 20 à 30 kDa sont composées de LPS. En plus, sur la base de leurs résultats les auteurs établissent que les flagelles des leptospires sont immunogènes et contiennent des antigènes qui sont communs aux différents genres de la famille *Leptospiraceae*.

L'usage du détergent Triton X-114, qui solubilise le LPS et l'enveloppe externe, permet la reconnaissance, dans le sérovar Grippytyphosa, de protéines de 33 kDa supposément associées à des souches non-virulentes et de protéines de 41 et 44 kDa associées à des leptospires virulents isolés de hamsters (Faine, 1994). Dans le sérovar Pomona un rang de protéines (22, 26, 31, 35 et 42 kDa) hydrophiliques, possiblement associées à la surface cellulaire a été détecté (Zuerner et coll., 1991). En utilisant des méthodes semblables, une protéine purifiée de 64 kDa, provenant d'une protéine naturelle de 670 kDa, a été caractérisée comme étant un antigène commun à de nombreuses bactéries et comme une protéine GroE "heat shock". Cet antigène commun

dans le genre *Leptospira* paraît être localisé sous la surface cellulaire (Ballard et coll., 1990).

En 1991, Pope et Johnson étudient l'effet sur la réponse immunitaire de leptospires traités avec la chaleur ou la formaline par immunotransfert. Des cellules de *L. interrogans* RGA, vivantes et traitées à la chaleur à 56 °C ou avec la formaline ont été utilisées pour préparer les sérums anti-*L. interrogans* RGA. Les trois antisérums réagissent avec tous les sérovars testés, mais peu d'antigènes provenant des sérovars Grippotyphosa et de Hardjo réagissent avec les antisérums. La réaction croisée la plus forte a été observée avec l'antisérum préparé contre les leptospires vivants. Lorsque les auteurs ont utilisé les leptospires tués, le changement le plus évident a été la réduction des réactions croisées entre les sérovars Canicola et Pomona. La formaline semble éliminer complètement la réponse immunitaire contre les antigènes de poids moléculaires entre 14 et 20 kDa, mais expose un antigène de 23 kDa dans les souches pathogènes seulement. Cette même bande présente une faible réaction lorsqu'un antisérum contre les leptospires traités avec la chaleur a été utilisé. La chaleur élimine en plus la réponse immunitaire contre les antigènes de poids moléculaires entre 19 et 30 kDa et dégrade partiellement les bandes dans la région de 14 à 20 kDa. Les trois antisérums réagissent avec des bandes de 34 à 37 kDa. Ces dernières bandes sont des protéines flagellaires, tandis que les bandes dans la région de 14 à 30 kDa sont du LPS, lequel présente les épitopes responsables des réactions spécifiques de sérovar. Les flagelles sont localisés entre le cylindre protoplasmique et l'enveloppe externe, ce qui peut expliquer pourquoi les bandes entre 34 et 37 kDa restent de la même intensité après le traitement des leptospires. En plus, le traitement avec la chaleur ou la formaline diminue la spécificité du MAT.

3. La leptospirose

La leptospirose est une maladie infectieuse causée par des leptospires pathogènes. Elle est présente sur tous les continents et peut affecter une grande variété d'espèces animales, ainsi que l'humain (Sullivan, 1974; Rentko et coll., 1992; Scanziani et coll., 1994). Il y a des sérovars très répandus comme *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola* et d'autres sérovars qui ne se trouvent que dans certaines régions. Chaque région peut avoir ses sérotypes particuliers, lesquels sont déterminés par son écologie. De plus, chaque espèce animale peut être l'hôte d'un ou de plusieurs sérovars. L'infection est fréquente chez les rongeurs et autres animaux sauvages ou domestiques, mais chez l'humain la maladie peut être rencontrée sous une forme sporadique ou épidémique. Certaines catégories de professionnels sont plus exposées que d'autres à la leptospirose. Il y a les riziculteurs, les planteurs de canne à sucre, les mineurs, les égoutiers, le personnel des abattoirs, les éleveurs et les vétérinaires (Acha et Szyfres, 1986).

3.1. Modes de transmission et état de porteur

Les leptospires pathogènes ne peuvent pas se multiplier hors d'un hôte (Sullivan, 1974). Les habitats naturels des leptospires pathogènes sont les tubules rénaux et le tractus génital des animaux porteurs. La leptospirose peut être transmise directement ou indirectement. Les hôtes naturels agissent comme réservoirs et ils perpétuent l'infection généralement par transmission directe. Les hôtes accidentels sont infectés par transmission indirecte et ils ne perpétuent pas l'infection une fois que la source d'infection est éliminée. L'infection transplacentaire, le contact sexuel, ou encore le lait d'une mère infectée sont des modes de transmission directe, tandis que l'infection indirecte se produit par les leptospires présents dans l'environnement et provenant de

l'urine des animaux infectés. La contamination du sol, des pâturages et des cours d'eau est une menace constante pour les humains et les animaux (Baldwin et Atkins 1987; Heath et Johnson, 1994; Wohl, 1996).

Les leptospires ne sont pas des bactéries particulièrement spécifiques d'hôte, mais néanmoins, chaque sérovar peut avoir son ou ses espèces animales préférées et un réservoir, ou hôte porteur, chez lequel l'infection sous-clinique est associée à une leptospirurie prolongée. La présence d'animaux porteurs est essentielle pour la persistance et l'épidémiologie de la leptospirose. Les leptospires colonisent la surface des cellules épithéliales des tubules contournés du rein et ils peuvent y persister pendant toute la vie de l'animal. L'excrétion dans l'urine peut être intermittente ou continue. Les immunoglobulines anti-leptospires sont présentes dans les tubules rénaux et dans la vessie, mais ne tuent pas les leptospires. Les leptospires ne peuvent pas survivre dans l'urine acide mais restent viables dans l'urine alcaline. Par conséquent, les herbivores et autres espèces animales dont l'alimentation produit une urine alcaline sont relativement plus importants comme agents de dissémination de la maladie que ceux qui produisent une urine acide (Faine, 1994).

3.2. Voies d'infection

Les leptospires entrent dans le système circulatoire en pénétrant les membranes muqueuses orale, nasale, conjonctivale et génitale ou à travers des égratignures cutanées. Une fois dans le sang les leptospires se multiplient. La séquence des événements faisant suite à l'entrée des leptospires dépend de la pathogénicité du sérovar pour l'hôte et de la capacité de l'hôte à réagir à l'infection (Sullivan, 1974; Hanson, 1982; Baldwin et Atkins, 1987; Farr, 1995; Wohl, 1996).

3.3. Les manifestations cliniques chez les animaux

La leptospirose, chez les animaux, peut se présenter sous deux formes, la forme aiguë et la forme chronique. La forme aiguë est semblable chez toutes les espèces animales. Elle est caractérisée, au cours des 3 à 7 premiers jours après l'infection, par de l'irritation, perte d'appétit, fièvre, yeux rouges et quelquefois, par de la diarrhée. Il peut aussi y avoir de l'ictère et des hémorragies. L'animal peut ensuite récupérer, sinon la mort peut survenir. L'infection congénitale du fœtus dans l'utérus mène à l'avortement.

Les animaux qui survivent à la forme aiguë peuvent développer une condition de porteur dans les tubules rénaux. De plus, les leptospires peuvent persister dans d'autres organes, notamment le tractus génital (Faine, 1994).

3.4. Les manifestations cliniques chez l'humain

Les humains sont sensibles à un grand nombre de sérovars de leptospires. La période d'incubation de la maladie varie entre 1 et 2 semaines. La maladie se caractérise par deux phases: la phase de bactériémie, qui dure de 7 à 10 jours, et la phase de leptospirurie, allant d'une semaine à plusieurs mois. Les manifestations cliniques sont diverses et présentent un caractère de gravité variable. De plus, de nombreux cas demeurent inapparents ou sous-cliniques. En général, on distingue deux formes cliniques, l'ictérique et l'anictérique. La forme ictérique ou hépatonéphritique (maladie de Weil) est beaucoup moins fréquente que la forme anictérique. Elle est souvent causée par le sérovar *Icterohaemorrhagiae*, mais d'autres sérovars peuvent être impliqués. Par ailleurs, de nombreuses infections causées par le sérovar *Icterohaemorrhagiae* se manifestent sous la forme anictérique. Dans la forme classique de la maladie de Weil, les symptômes se déclenchent de façon soudaine, fièvre, myalgies, conjonctivite,

nausées, vomissements, diarrhée et constipation. La prostration peut être prononcée. Les pétéchies cutanées, les hémorragies gastro-intestinales et la protéinurie sont courantes. L'hépatomégalie, l'insuffisance rénale, l'azotémie et un déséquilibre électrolytique s'installent lorsque la leptospirémie cesse. La convalescence dure entre 1 et 2 mois.

Dans la forme anictérique, la symptomatologie est plus bénigne. La maladie ressemble souvent à la grippe et les malades récupèrent après un mois environ. La leptospirurie peut persister pendant une semaine ou plusieurs mois après la disparition des symptômes cliniques (Acha et Szyfres, 1986).

La transmission inter-humains a été rapportée, mais elle est extrêmement rare, dû au fait que les patients convalescents n'excrètent pas les leptospires pendant de longues périodes de temps et parce que l'hygiène élémentaire empêche l'infection à partir de l'urine ou du sang humain (Faine, 1994).

3.5. Contrôle et prévention de la leptospirose

Le contrôle et l'éradication de la leptospirose sont difficiles à cause du grand nombre de sérovars et d'hôtes impliqués et de l'existence d'un état porteur chez certaines espèces. De plus, l'éradication de la leptospirose n'est actuellement pas une priorité pour les centres de contrôle et de prévention des maladies.

Le traitement avec des antibiotiques est efficace au cours des 7 à 10 premiers jours suivant l'infection. La pénicilline G est le médicament de choix pour le traitement de la leptospirémie et peut être administrée pendant le cours de la maladie. La doxycycline est recommandée à la fin de la thérapie avec la pénicilline, pour éliminer les leptospires des reins.

Chez l'humain les mesures de prophylaxie reposent sur l'hygiène personnelle et sur la prévention de l'infection chez les animaux domestiques.

Chez les animaux domestiques la prévention de la leptospirose peut être réalisée d'abord par la vaccination avec des bactérines commerciales et par une hygiène adéquate. Les animaux avec des signes cliniques de leptospirose doivent être isolés pendant le traitement. De plus, le contrôle des rongeurs et l'hygiène des endroits exposés à l'urine des animaux infectés, par l'utilisation de détergents à base d'iode, doivent être stricts.

La vaccination est efficace dans la prévention de la maladie, mais ne protège pas complètement contre l'infection. Les animaux vaccinés peuvent être infectés sans présenter de signe clinique; ils peuvent même présenter une leptospirurie, quoiqu'à un degré moindre et moins longtemps que les animaux non vaccinés. Les vaccins confèrent une immunité essentiellement spécifique de sérovar. Donc, il faut connaître le ou les sérovats présents dans une zone donnée en vue d'une immunisation adéquate des animaux. De plus, à cause du fait que la durée de l'immunité induite par une bactérine dépasse rarement 6 à 12 mois, il est recommandé de donner deux injections à quatre semaines d'intervalle et ensuite effectuer une revaccination annuelle (Acha et Szyfres, 1986; Baldwin et Atkins, 1987; Farr, 1995; Wohl, 1996).

4. La leptospirose chez l'espèce canine

Le chien est l'hôte naturel ou définitif du sérovar *Canicola* et l'hôte accidentel des sérovats *Icterohaemorrhagiae*, *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Bataviae*, *Bratislava*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi* et *Pomona* (Baldwin et Atkins, 1987; Rentko et coll., 1992;

Wohl, 1996). Les hôtes naturels de ces sérovars sont les rats, les porcs, les vaches, les raton-laveurs et les souris (Baldwin et Atkins 1987).

Les sérovars *Canicola* et *Icterohaemorrhagiae* ont été les plus communément associés à la leptospirose chez les chiens (Baldwin et Atkins, 1987; Nielsen et coll., 1991; Prescott et coll., 1991; Greene, 1995). Néanmoins, des études sérologiques récentes démontrent que l'incidence de la maladie attribuée aux sérovars *Canicola* et *Icterohaemorrhagiae* a diminué, tandis que le nombre de cas de leptospirose canine associée aux autres sérovars, particulièrement les sérovars *Grippityphosa*, *Pomona* et *Bratislava*, a augmenté considérablement (Rentko et coll. 1992, Dickeson et Love, 1993; Scanziani et coll., 1994; Birnbaum et coll., 1998)

4.1. Sérovars impliqués en Amérique du Nord

Récemment, au Canada et aux États-Unis, le nombre de cas de leptospirose canine associée aux sérovars *Grippityphosa*, *Pomona* et *Bratislava* est apparu en émergence. L'émergence de ces sérovars est probablement due à l'utilisation de vaccins contre les sérovars *Canicola* et *Icterohaemorrhagiae* et aux nombreux contacts, dans les régions de banlieue, entre les chiens et les mouffettes, les raton-laveurs et les opossums, lesquels agissent comme réservoirs des sérovars *Grippityphosa* et *Pomona*. Aussi, les chiens qui sont en contact avec des porcs sont à risque pour une exposition au sérovar *Bratislava* (Bolin, 1996).

Un rapport de 50 cas de leptospirose canine à Long Island, NY, implique le sérovar *Grippityphosa* (Levitan, 1996). D'autres rapports récents identifient en Georgie, le sérovar *Grippityphosa* (Brown et coll., 1996); au Massachusetts, *Grippityphosa* et *Pomona* (Rentko et coll., 1992); au New Jersey et au Michigan,

Grippotyphosa, Pomona et Autumnalis (Hartkin et Gartrell, 1996), comme cause de l'infection chez les chiens; dans l'Etat de New York, une étude réalisée entre janvier 1980 et décembre 1995 sur 36 chiens, démontre que Grippotyphosa et Pomona ont été les sérovars prédominants dans la leptospirose canine (Birnbau et coll., 1998). En plus, un rapport d'Ontario implique le sérovar Pomona tandis que chez quatre autres chiens de la même province, les sérovars Pomona, Autumnalis ou Bratislava ont été impliqués (Prescott et coll., 1991). En 1997, Hrimivich et Prescott identifient les sérovars Grippotyphosa et Pomona comme cause de l'infection chez deux chiens, qui n'ont eu aucun contact entre eux. En 1996-1997 au Québec le sérovar Pomona a été identifié comme cause de leptospirose chez trois chiens (Kalin et coll., 1999)

4.2 Manifestations cliniques

L'expression clinique de l'infection dépend pour une bonne partie de la souche infectante. Ainsi, classiquement il est admis que les formes ictérohémorragiques sont associées au sérovar Icterohaemorrhagiae et les formes typiques et urémiques au sérovar Canicola (André-Fontaine et coll., 1994). Néanmoins, la politique vaccinale en usage actuellement chez le chien et qui utilise des vaccins préparés avec des souches appartenant à ces deux sérovars, a diminué l'incidence de la leptospirose classique caractérisée par une maladie hémorragique aiguë ou bien, par une déficience hépatique sévère subaiguë. Des rapports récents, indiquent que le syndrome clinique le plus commun est la déficience rénale aiguë causée par des sérovars différents de Icterohaemorrhagiae et Canicola (Nielsen et coll., 1991; Rentko et coll. 1992, Hartkin et Gartell, 1996; Forrest et coll., 1998; Kalin et coll., 1998).

Sur le plan clinique, la leptospirose peut prendre un aspect aigu, subaigu et même chronique. Ces différents aspects dépendent bien évidemment des caractères propres de la souche infectieuse, mais également et surtout de la sensibilité particulière de l'animal infecté. La phase aiguë de la leptospirose, chez l'espèce canine, se manifeste par plusieurs jours de léthargie, de myalgie et d'anorexie, par des vomissements, de la dépression, des douleurs musculaires et quelquefois, de la diarrhée et du sang dans l'urine. L'examen clinique des chiens affectés de leptospirose indique souvent de la dépression, de la fièvre, de la déshydratation, des douleurs abdominales et de l'ictère. La maladie endommage le foie et les reins, ce qui résulte parfois en des dommages rénaux irréversibles et même la mort de l'animal. La seule forme véritablement subaiguë observée chez le chien, correspond au développement d'un syndrome urémique consécutif à une néphrite, dont l'un des signes est la polyuropolydypsie qui s'accompagne de vomissements et de diarrhée. La mort peut survenir après l'installation d'un coma urémique. La leptospirose chronique est associée principalement à une dégénérescence chronique des reins (Baldwin et Atkins, 1987; Rentko, 1992; André-Fontaine et coll., 1994; Bolin, 1996; Wohl, 1996).

4.3. Pathogénie de la leptospirose canine

La phase leptospirémique ou bactériémique commence dès l'entrée des leptospires dans l'hôte. Le pic de leptopirémie est observé entre 4 et 12 jours post-infection lors d'une infection naturelle (Greene, 1984) et entre 2 et 5 jours lors d'une infection expérimentale (Keenen et coll., 1978; Navarro et coll., 1981). Pendant les phases subaiguë et chronique de l'infection ou chez les patients asymptomatiques, les leptospires peuvent apparaître dans l'urine. La leptospirurie peut être détectée 72 heures

après l'infection et peut persister pendant plus de six mois chez les patients non-traités. La capacité des leptospires à coloniser et à se disséminer est une condition essentielle au développement de la maladie (Tableau 2) (Baldwin et Atkins 1987).

5. Le diagnostic de la leptospirose

Les méthodes utilisées pour le diagnostic en laboratoire de la leptospirose peuvent être divisées en méthodes directes, lesquelles démontrent la présence de la bactérie dans les fluides ou les tissus du corps et en méthodes indirectes, lesquelles mesurent la réponse sérologique de l'hôte induite par une infection leptospiroïenne (Wagenaar, 1994).

5.1. Méthodes directes

Le diagnostic de la leptospirose peut être effectué par la culture des leptospires à partir du sang, de l'urine et/ou des organes comme le foie et les reins, par des méthodes de visualisation des leptospires et par des méthodes de détection de l'ADN leptospiroïen (Hartman et coll., 1984a; Champagne et coll., 1991).

5.1.1 Isolement des leptospires

Bien que la culture soit d'une importance épidémiologique évidente, les méthodes utilisées pour l'isolement et l'identification des leptospires sont lentes, coûteuses, laborieuses, non-pratiques et permettent seulement un diagnostic rétrospectif (Adler et coll., 1980b; Thiermann, 1983; Woodward et coll., 1997; Surujballi et coll., 1997b). La culture ne peut donc être utilisée sur une base routinière par les laboratoires de diagnostic (Ellis, 1986).

Tableau 2. Pathogénie de la leptospirose canine

	Exposition aux leptospires	
	Pénétration des tissus par les leptospires	
Réponse immunitaire	Réponse immunitaire non-adéquate	Pas de réponse immunitaire
Élimination des organismes	Leptospiémie	Leptospiémie
Absence de signes cliniques	Signes cliniques légers	Signes cliniques sévères
	Réponse immunitaire	Leptospiurie
	Mort	Convalescence

5.1.2. Méthodes de visualisation des leptospires

La visualisation des leptospires peut être réalisée au moyen d'un microscope à fond noir, par la coloration des frottis au nitrate d'argent, par immunofluorescence, ou par la détection avec des anticorps marqués. L'examen au microscope à fond noir des spécimens pathologiques présente une faible sensibilité (approximativement 10^4 bactéries/ml) et une spécificité médiocre. La visualisation directe est problématique, même pour une personne expérimentée et doit être considérée comme un examen d'orientation, qui doit toujours être confirmé par la culture. Par contre, la visualisation est plus intéressante quand il s'agit d'échantillons dans lesquels la concentration en leptospires est élevée (Institut Pasteur; Bolin, 1996).

La coloration au nitrate d'argent a les mêmes défauts de sensibilité et de spécificité que la microscopie à fond noir. Les résultats sont peu satisfaisants et cette technique est surtout utilisée pour la mise en évidence des leptospires dans des échantillons déjà fixés ou inclus dans la paraffine (Slee et coll., 1983).

La détection des leptospires par des anticorps marqués à la peroxydase ou à la fluorescéine augmente la spécificité. Elle peut être réalisée avec des anticorps polyclonaux ou des AcM (Ellis et coll., 1982; Prescott et coll., 1985; Stevens et coll., 1985) marqués par la peroxydase raifort (Ellis et coll., 1983; Scanziani et coll., 1991) ou par la fluorescéine (Miller et coll. 1983). L'immunofluorescence est, selon plusieurs spécialistes, la technique de choix pour le diagnostic de la leptospirose (Higgins et Champagne, 1993). Le test est rapide, sensible et peut être utilisé sur des spécimens congelés. En plus, les anticorps marqués par la fluorescence présentent une plus haute sensibilité comparativement à la culture, pour la détection des leptospires dans l'urine et dans les échantillons provenant de fœtus (Ellis et coll., 1982; Bolin et coll., 1989).

Néanmoins, l'interprétation des résultats peut être difficile et requiert un personnel de laboratoire expérimenté (Bolin, 1996).

La détection par la chimioluminescence, par le radioimmunoessai enzymatique et par ELISA sandwich a été décrite, mais ces épreuves ne sont pas communément utilisées pour la détection des leptospires (Adler et coll., 1982b; Chappel et coll., 1985; Champagne et coll., 1991; Palmer et Hookey, 1992). En 1991, une méthode ELISA sandwich a été évaluée pour détecter des antigènes leptospiériens dans des échantillons d'urine inoculée expérimentalement avec le sérovar Hardjo. La technique permet la détection de plus de 10^3 leptospires appartenant au sérovar homologue. Une telle technique, à ce niveau de détectabilité, a beaucoup d'avantages sur la visualisation au microscope à fond noir et sur la culture. Ces dernières doivent être effectuées à partir de spécimens très frais, alors que l'ELISA a la capacité de détecter des leptospires morts. De plus, l'ELISA est beaucoup plus rapide que la culture (Champagne et coll., 1991).

5.1.3. Méthodes moléculaires

Plusieurs méthodes moléculaires ont été développées pour la détection spécifique des sérovars de leptospires pathogènes à partir de spécimens cliniques, tels que sondes d'ADN, PCR et variantes de la méthodologie de la PCR.

Les essais réalisés au moyen des sondes d'ADN consistent en l'hybridation de l'échantillon d'ADN avec les sondes d'ADN spécifiques du genre *Leptospira* marquées. Différents types de sondes d'ADN sont utilisés tels que l'ADN chromosomal marqué et digéré, des fragments d'ADN clonés et une sonde d'oligonucléotides. Ces sondes peuvent être marquées radioactivement ou par la biotine. La spécificité des essais dépend de la séquence de l'ADN de la sonde et de la rigueur de l'hybridation. Il y a des

sondes qui peuvent distinguer les leptospires pathogènes des leptospires saprophytes comme des sondes spécifiques de génotype. La limite de détection est de 10^4 leptospires. En général, les sondes d'ADN sont peu populaires à cause de leur manque de sensibilité et des difficultés d'utilisation.

Les tests utilisant la PCR permettent, quant à eux, la détection des leptospires avec une plus haute sensibilité. Les essais sont basés sur les séquences d'ADN de fonction connue ou de fonction inconnue. Quoique ces méthodes soient théoriquement capables de détecter une seule molécule d'ADN dans les spécimens cliniques, elles demandent actuellement un minimum de 10 leptospires. Malheureusement, ces épreuves sont gênées par la présence d'inhibiteurs de la réaction d'amplification tels que l'hémoglobine et des sels qui sont responsables de résultats faussement positifs. De plus, ces méthodes demandent des laboratoires bien équipés et un personnel expérimenté en génétique moléculaire (Bolin, 1996; O.I.E., 1996; Woodward et coll. 1997; Wagenaar, 1994).

5.2. Méthodes indirectes

Actuellement, la sérologie est la méthode la plus utilisée pour le diagnostic de la leptospirose. Les tests les plus communément utilisés pour la sérologie sont l'agglutination microscopique et l'ELISA.

5.2.1. Epreuve d'agglutination microscopique (MAT)

Le test d'agglutination microscopique a la particularité d'utiliser des leptospires vivants. Ce test représente la méthodologie standard internationale pour le sérodiagnostic de la leptospirose (Adler et coll., 1980b; Hartman et coll., 1984a; Cousins

et coll., 1986; Cho et coll., 1989; Champagne et coll., 1991; Higgins et Champagne, 1993; Faine, 1994; Bolin, 1996; O.I.E., 1996; Surujballi et coll., 1997a; Surujballi et coll., 1997b). Le MAT offre un haut degré de spécificité mais on lui reproche plusieurs désavantages. Le MAT est fastidieux, consomme un temps excessif et représente un risque d'infection pour les techniciens, puisqu'il exige la culture continue et le maniement d'organismes vivants (Cole et coll., 1973; Hartman et coll., 1984a; Cousins et coll., 1986; Cho et coll., 1989; Champagne et coll., 1991; Surujballi et coll., 1997a; Surujballi et coll., 1997b). De plus, le MAT n'est pas facile à standardiser et il détecte seulement des anticorps capables d'agglutiner l'organisme. Les résultats sont souvent interprétés de façon subjective (Surujballi et coll., 1997a).

5.2.2. Epreuve ELISA

Plusieurs types d'ELISA, qui semblent solutionner quelques-uns des problèmes associés au MAT, ont été décrits pour la détection d'anticorps contre les antigènes leptospiriens dans les sérums d'origine humaine ou animale (Adler et coll., 1980b; Terpstra et coll., 1980; Adler et coll., 1981; Adler et coll., 1982a; Thiermann et Garrett, 1983; Waltman et Dawe, 1983; Fairbrother, 1984; Hartman et coll., 1984b; Hartman et coll., 1986; Terpstra et coll., 1985; Cousins et coll., 1986; Cho et coll., 1989; Trueba et coll., 1990; Surujballi et coll., 1997b).

Les antigènes utilisés dans ces ELISA ont été préparés selon une variété de procédures telles que l'extraction avec des détergents (Hartman et coll., 1984b; Hartman et coll., 1986; Cho et coll., 1989; Trueba et coll., 1990), la précipitation avec de l'éthanol (Fairbrother, 1984), la sonication (Adler et coll., 1980b; Adler et coll., 1981; Waltman et Dawe, 1983; Cousins et coll., 1986), l'alcalinisation (Fairbrother, 1984),

l'extraction avec la solution phénol-eau chaude (Thiermann et Garrett, 1983), l'extraction avec butanol-eau (Trueba et coll., 1990), l'extraction par la sonication et le traitement à la formaline (Fairbrother, 1984), la rupture mécanique (Trueba et coll., 1990), l'extraction avec l'acide acétique (Surujballi et coll., 1997b) ou par le chauffage des cellules entières (Terpstra et coll., 1980; Terpstra et coll., 1985). La spécificité de ces divers antigènes varie énormément. Certains sont capables de détecter les anticorps spécifiques de genre, d'autres de sérotype ou encore, de sérovar.

En 1980, Terpstra et coll. rapportent l'utilisation d'un ELISA pour la détection d'anticorps dirigés contre les leptospires chez des humains, à l'aide d'antigènes extraits par le traitement par la chaleur, à partir du sérovar *Icterohaemorrhagiae*, souche Wijnberg. Ils prétendent qu'ils détectent des anticorps spécifiques de genre et concluent que le test est sensible et relativement facile à réaliser. En plus, l'antigène peut être préparé en grandes quantités et gardé pendant plusieurs mois. En 1985, les mêmes auteurs suggèrent que la leptospirose humaine peut être diagnostiquée avec un ELISA, en utilisant un antigène extrait à partir de différents sérovars, par un traitement par la chaleur.

En 1983, Waltmann et Dave utilisent un ELISA avec des antigènes du sérovar *Pomona* soniqués, pour la détection d'anticorps anti-leptospires dans le sérum de porc. Ils concluent que la sensibilité, la spécificité, la spécificité de genre, la simplicité et la rapidité de cet ELISA, font que cette technique est très appropriée comme épreuve de tamisage pour un grand nombre de sérums. En plus, ils proposent qu'en changeant la spécificité d'espèce de l'anticorps conjugué à l'enzyme, la technique peut être appliquée à d'autres espèces animales.

En 1982, Adler et coll. utilisent un test de ELISA pour détecter des immunoglobulines M (IgM) et des IgG spécifiques dans le sérum de bovins infectés ou immunisés avec le sérovar Hardjo. Ils observent que la cinétique de la réponse humorale telle que mesurée par le MAT et par l'ELISA diffèrent, ce qui suggère que les deux tests détectent des complexes antigènes-anticorps différents. Un ELISA utilisant des antigènes d'enveloppe externe et qui détecte les IgG et les IgM d'origine canine contre différents sérovars de leptospires a été développé et évalué en Europe (Hartman et coll., 1984b; Hartman et coll., 1986). Dans ces essais, les IgM sont détectables dès la première semaine après l'infection, avant que des anticorps agglutinants puissent être détectés. Les IgG sont produites chez les chiens infectés à partir de la deuxième semaine et persistent pendant de longues périodes de temps. Ainsi, des chiens affectés de leptospirose aiguë présentent des titres élevés d'IgM et des titres bas d'IgG, tandis que des chiens vaccinés ou avec une infection plus ancienne, présentent des titres élevés d'IgG et des titres faibles d'IgM. Des tests semblables, utilisant des antigènes soniqués pour détecter anticorps anti-leptospires dans les sérums humains, bovins et ovins, ont été développés (Adler et coll., 1980a; Adler et coll., 1981; Cousins et coll., 1986). Le principal objectif des ces ELISA est l'identification des infections récentes, à cause de la nature transitoire des anticorps IgM.

En 1989, Cho et coll. préparent un antigène d'enveloppe externe à partir des sérovars Pomona, Sejroe et Hardjo à l'aide d'une solution de SDS à 0,04%. Puis, ils enlèvent la solution SDS des complexes protéiques qu'elle avait formés avec des cations de triéthylammonium, dans un solvant organique. Ensuite, ils récupèrent l'antigène précipité et l'utilisent dans une épreuve ELISA pour détecter, chez des bovins, les anticorps sériques contre les trois sérovars. Les auteurs observent un certain nombre de

réactions croisées faibles avec d'autres sérovars. Ce bas niveau de réactions croisées est, en plus, observé avec les antigènes leptospiriens présents dans la phase phénol d'une extraction phénol-eau (Thiermann et Garrett, 1983), avec les antigènes d'enveloppe externe contenant SDS (Hartman et coll., 1984b; Hartman et coll., 1986), avec des antigènes provenant d'autres procédures telles que la sonication (Adler et coll., 1980b; Fairbrother, 1984), l'extraction alcaline (antigène F4) et les extractions avec de l'éthanol (Fairbrother, 1984). Ces réactions croisées peuvent être dues à la contamination avec des antigènes somatiques spécifiques de genre, ou à la localisation dans la surface intérieure de l'enveloppe externe des déterminants antigéniques qui présentent des réactions croisées entre différents sérovars. Par leurs résultats, les auteurs considèrent que l'ELISA est spécifique, sensible et techniquement plus avantageux que le MAT, en dépit d'une plus grande réactivité croisée avec les sérovars hétérologues. Finalement, ils concluent que la technique ELISA peut être utilisée comme épreuve de tamisage, pour la recherche d'anticorps sériques bovins contre les leptospiries.

En 1990, Trueba et coll. analysent à l'aide d'un test de EIA la sensibilité et la spécificité de quatre préparations antigéniques différentes à partir du sérovar Hardjo. Deux antigènes préparés par l'extraction avec des détergents (antigènes extraits avec du désoxycholate et antigènes "salt-altered-cell") présentent des réactions croisées contre les anticorps de plusieurs sérovars appartenant à différents sérogroupes. Par contre, un autre antigène a été préparé par une rupture mécanique de la membrane et par l'extraction avec une solution butanol-eau. Cet antigène, de nature polysaccharidique, présente un haut degré de spécificité au niveau du séro groupe. Néanmoins, des réactions croisées avec les anticorps contre le sérovar Tarassovi sont observées.

Les antigènes extraits à partir de *L. biflexa* sérovar Patoc par précipitation avec 90% d'éthanol (Palit et Gulasebharam, 1973) ou à partir de *L. biflexa* par formalinisation et par sonication (Myers et Colorti, 1978) ont une grande spécificité pour le genre *Leptospira*. D'autres préparations antigéniques telles que l'antigène TM (type-main) extraites par la technique phénol-eau à partir du séro groupe Hebdomadis (Shinagawa et coll. 1972) et la fraction F4, préparée par une extraction alcaline à partir de plusieurs sérovars de *Leptospira* (Faine et coll. 1974), ont été initialement mises en relation avec la spécificité de sérovar et de séro groupe. Néanmoins, d'autres études démontrent plus tard que l'antigène F4 présente des réactions croisées dans différents séro groupes de leptospires (Adler et Faine, 1979; Fairbrother, 1984). Des travaux plus récents démontrent que les antigènes F4 et TM sont des antigènes différents (Adler et Faine, 1980a).

En 1997, Surujballi et coll. utilisent des antigènes extraits par l'acide acétique à partir du sérovar Hardjo, types hardjoprajitno et hardjobovis dans une épreuve ELISA indirecte en vue de la détection des anticorps anti-Hardjo dans des sérums d'origine bovine. Les auteurs concluent que cette épreuve est facile à standardiser et à lire, reproductible, semi-automatisée et qu'elle utilise des antigènes qui ne représentent pas un risque pour les personnes. De plus, les antigènes peuvent être préparés en grandes quantités et démontrent une grande spécificité envers l'antisérum contre le sérovar Hardjo.

Parce que les chiens peuvent servir de réservoirs de leptospires et que par conséquent ils sont un risque pour la transmission de la leptospirose aux humains, l'utilisation du test ELISA spécifique de genre ou spécifique de sérovar devient un outil de tamisage idéal pour analyser un grand nombre de sérums.

III – MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

**Development of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the
Detection of Leptospiral Antibodies in Dogs**

Marcelo J. Ribotta, Robert Higgins, Marcelo Gottschalk and Réal Lallier

Soumis pour publication au Canadian of Journal Veterinary Research

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

* Corresponding author. Mailing address: Dr. Robert Higgins, Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

Phone: (450) 773-8521 ext. 8304.

Fax: (450) 778-8119. XXXXXXXXXX

ABSTRACT

Serology plays an important role in the diagnosis of leptospirosis. Few laboratories have the resources, expertise and facilities to perform the microscopic agglutination test (MAT). Thus, there is a need for a rapid and simple serological test that could be used in any diagnostic laboratory. In this study, a genus-specific heat-stable antigenic preparation from *Leptospira interrogans* serovar Pomona was used in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of leptospiral antibodies in dog sera. This antigenic preparation reacted with rabbit antisera against *L. interrogans* serovars Bratislava, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae and Pomona and with rabbit antiserum against *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa. The ELISA showed a relative specificity of 95,6 % with 158 dog sera which were negative at a dilution of 1:100 in the MAT for serovars Pomona, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Hardjo and Grippotyphosa. The relative sensitivity of this assay with 21 dog sera which revealed serovars MAT titres of ≥ 100 to different serovars was 100%. This assay is easily standardized, technically more advantageous than MAT, and uses an antigenic preparation that can be routinely prepared in large amounts. It was that this ELISA is sufficiently sensitive test to be used as an initial screening test for the detection of leptospiral antibodies in canine sera, with subsequent confirmation of positive test results with the MAT.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a disease of worldwide distribution that affects domestic animals, wildlife, and humans (1). It is caused by spirochetes belonging to the genus *Leptospira*. The pathogenic leptospirens are grouped into eight species on the basis of their genetic relationships and more than 200 serovars have been identified throughout the world (2,3,4). Most of these serovars can infect different animal species, but there is a primary host reservoir for each serovar which ensures the survival and dissemination of the organism (5). The dog is the maintenance host for serovar Canicola and is considered as an incidental host for a variety of other serovars (6).

Until 1986, canine leptospirosis, was mainly associated with serovars Canicola and Icterohaemorrhagiae (7,8). However, since 1990, the incidence of cases attributed to both these serovars has considerably decreased, whereas the number of reports of canine leptospirosis associated with other serovars, particularly Pomona and Grippityphosa, has increased (5,6,9-14). Serovars Pomona and Grippityphosa are associated with a syndrome of acute renal failure in dogs (7,8,12). These apparent epizootiologic changes in canine leptospirosis are likely to be due to the widespread use of canine vaccines containing serovars Canicola and Icterohaemorrhagiae and possibly, increased contacts in suburban areas between dogs and skunks or raccoons which serve as maintenance hosts for serovars Pomona and Grippityphosa (2). Because leptospiral vaccines can only provide a serovar specific protection, the exposure of dogs to serovars other than those contained in commercial bacterins may represent a potential risk of zoonotic transmission.

Serology appears to be the most reliable tool for the diagnosis of infections due to *Leptospira* spp. in dogs. Diagnosis of leptospirosis is currently performed with the

microscopic agglutination test (MAT), which is recognized as the international standard technique (15). The MAT is specific, but is laborious, requires maintenance of live organisms which are potentially dangerous for laboratory workers, and its interpretation is relatively subjective (16). There is a need for a rapid, sensitive and reliable procedure that could be used in the routine diagnostic laboratory to detect antibodies against leptospire in dogs. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is simple, safe, easily automated and thus, a very suitable procedure for the examination of a large number of sera.

The purpose of the present study was to develop an indirect ELISA to be used as an initial screening test for the detection of the genus-specific antibodies against *Leptospira* in canine sera. The specificity and sensitivity of the indirect ELISA relative to the MAT were estimated.

MATERIALS AND METHODS

CULTURE

Leptospira interrogans serovars Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Bratislava and Autumnalis and *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa came from the Animal Pathology Laboratory of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, St. Foy, Quebec. These organisms were grown in PLM 5 *Leptospira* medium (Intergen Company, Purchase, NY, USA) at 29 °C in aerobic conditions for 6 days.

ANTIGENIC PREPARATION

The antigenic preparation was produced according to the procedure of Terpstra *et al.* (17), from the serovars listed above. The organisms were grown as above and harvested after five to six days by centrifugation (10 000 x g, for 45 min). The organisms were washed twice by centrifugation (10 000 x g, for 45 min) in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.3). The pellet from 100 mL of culture was resuspended in 100 mL of PBS (pH 7.3). The culture was killed with formalin (final concentration of 0.5% V/V). The killed culture was heated in a bath with boiling water for 30 min and then centrifuged to remove insoluble material at 10 000 x g for 30 min. The supernatant was used as antigen. Antigens were stored at -70 °C and were found to be stable for at least four months.

PROTEIN CONCENTRATION

The total protein content of the heat-stable antigenic preparation was estimated with the BCA protein assay kit according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockfort, IL, USA). Bovine serum albumine Fraction V (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used as the standard.

RABBIT SERA

Rabbit antisera against *Leptospira* serovars Pomona, Grippotyphosa, Autumnalis and Icterohaemorrhagiae were kindly provided by Dr. J. F. Prescott, University of Guelph, Guelph, Ontario. These sera were used as positive controls in the MAT and for determination of the optimal concentration of the antigen. A serum from a rabbit experimentally inoculated with a Bratislava culture which was previously heated at 56°C for 30 min, was produced in this study, as previously described (18).

CANINE FIELD SERA

Field serum samples obtained from dogs referred for different pathological conditions to the Small Animal Clinic of the College of Veterinary Medicine of the University of Montreal, to private clinics in different regions of the province of Quebec and to the Animal Pathology Laboratory of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, St. Foy, Québec, were collected and stored at -20 °C until use. One hundred and fifty eight sera with MAT negative titers at a dilution of 1:100 against serovars Pomona, Hardjo, Bratislava, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae and Grippotyphosa were used to determine the relative specificity of the ELISA. For determination of relative sensitivity

of the ELISA, 21 dog sera showing MAT titers of ≥ 100 to different serovars were employed.

IMMUNE SERA

A Beagle dog was injected intravenously with a killed formalin Pomona strain, five times at 7-days intervals (18). Antibody response was monitored by MAT. The dog received a "booster" injection at 7 weeks after the first injection and a blood sample was collected two weeks after the last injection. The dog was housed and fed according to the guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care. Serum from the dog was tested for different serovars by MAT to ascertain the absence of antileptospiral antibodies before immunization.

MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST (MAT)

The MAT was performed as described by Cole *et al.* (19) in microtiter plates and tested with the antigens of serovars Hardjo, Pomona, Bratislava, Autumnalis, Grippityphosa and Icterohaemorrhagiae. Serial twofold dilutions of the sera were made in PBS (pH 7.3) starting from 1:50. MAT was performed by incubating the sera at 37 °C for 90 min with suspensions of live leptospire (transmittance at 400 nm equal 60-75%) of each strain. The titer was the reciprocal of the highest dilution of the serum in which 50% of leptospire were agglutinated or lysed. The level of significance for the MAT was 1:100.

ELISA PROCEDURE

Antigen coating: All ELISA were performed in Nunc 2-69620 microtiter plates with 96 flat bottom wells (Canadian Life Technologies, Burlington, ON). During all incubation periods, the plates were sealed with acetate covers to prevent evaporation. The antigens prepared from serovar Pomona were diluted in sodium carbonate buffer (pH 9.6), at optimal concentration which was established by checkerboard titration. All wells of the microtiter plates, excluding those of the outermost columns, were sensitized by adding 100 μ L of the diluted antigen per well. The plates were incubated at 4°C overnight and then washed (5 X) with PBS supplemented with 0.05 % Tween 20 (PBST).

Determination of optimal antigen concentration: The plates were incubated with the following antigen concentrations: 220, 22, 4.4 , 2.2 and 1.1 μ g of protein/mL. They were tested against 1:800 dilution of positive sera against serovars Autumnalis, Pomona and Icterohaemorrhagiae, 1:400 dilution of positive sera against serovar Grippotyphosa, 1:200 dilution of positive sera against serovar Bratislava and 1:200 dilution of negative sera at a constant dilution of conjugate 1:8000; peroxidase-conjugated affinity pure goat anti-rabbit (H+L), (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, USA).

Test sera: Dog sera were diluted 1:200 in PBST just prior use. A volume of 100 μ L was added in duplicate wells, each of which was located in an opposed quadrant. The plates were incubated for 15 min at room temperature and then washed five times as above.

Peroxidase conjugate: An optimal concentration 1:3000 as determined by a checkerboard titration of peroxidase-conjugated IgG fraction of rabbit antidog IgG

(heavy and light chains) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) was freshly prepared in PBST. The conjugate (100 μ L per well) was then allowed to react for 15 min at room temperature, followed by three washings with PBST.

Substrate: TM Blue (Intergen Company, Purchase, NY, USA) was used as the substrate. After the substrate (100 μ L per well) had been incubated for 5 min at room temperature, 50 μ L of 1N H₂SO₄ was added to each well to stop the reaction. All plates were read at 450 nm with a UV max kinetic microplate reader computer RS 232 (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA, USA).

Control sera: A set of 4 control wells was included in duplicate in each plate. The first control was a MAT-positive serum serovars Pomona 1:6400, Grippotyphosa 1:1600, Bratislava 1:1600 and Icterohaemorrhagiae 1:800 (from a naturally infected dog) which resulted in an optical density at 450 nm of approximately 3.5 after 5 min of substrate development (strong positive control); the second was a MAT-positive serum serovar Pomona 1:100 (from a dog experimentally inoculated with a killed formalin Pomona strain) which resulted in an optical density of approximately 2.0 (intermediate positive control); the third was a MAT-negative serum which resulted in an optical density of approximately 0.06 and one well in which PBST was added instead of serum. In these control wells, all other reagent were added in the exact sequence and amounts as described. Results of the entire plate were accepted if the OD₄₅₀ values in the control wells were within limits with $\leq 10\%$ coefficient of variation for each control.

Data Interpretation: The average absorbance at 450 nm (A_{450}) values equal to or greater than 0.29 were considered positive, whereas A_{450} values less than 0.29 were considered negative reactions.

Statistical analyses: Relative sensitivity and specificity of the ELISA for the detection of antileptospiral antibodies in dog sera were determined in comparison to the MAT as described by Zweing and Robertson (20). Sensitivity is calculated as:

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}}$$

where TP is the number of sera positive by MAT and ELISA; FN is the number of sera positive by MAT but negative by ELISA.

Specificity is calculated as:

$$\text{Specificity} = \frac{\text{TN}}{\text{FP} + \text{TN}}$$

where TN is the number of sera negative by MAT and ELISA; FN is the number of sera negative by MAT but positive by ELISA.

SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL

ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) AND IMMUNOBLOTTING

The heat-stable antigenic preparations from *L. interrogans* serovar Pomona, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis and Bratislava and *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa, were submitted to SDS-PAGE using the discontinuous buffer system of Laemmli (21) in 12.5 % SDS-polyacrylamide vertical slab gels. Samples were evaporated on a Savant Speed Vac Concentrator and stored at - 20 °C until tested. Finally, the samples were rehydrated in solubilization buffer, boiled for 5 min and each lane was loaded with 15 µL of samples. Low molecular weight standards (Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, QC, Canada) were included in every gel. Minigels were silver

stained for proteins. Proteins gel were transferred to nitrocellulose membranes overnight at 30 V using the methanol-Tris-glycine system described by Towbin *et al.* (22). After blocking unreacted sites with casein (2 % w/v), the membranes were incubated with the ELISA positive serum from a naturally infected dog, the MAT positive rabbit serum against serovar Pomona, five of seven MAT negative but ELISA positive canine sera or the an ELISA negative canine serum (diluted 1:200 in the blocking buffer) for 2 h at room temperature. Membranes were washed five times of 5 min with a solution of Tris-saline, and incubated 1h with optimally diluted peroxidase-conjugated IgG fraction of rabbit antidog IgG (heavy and light chains) or peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). The alkaline phosphatase reactions were visualized following incubation of the nitrocellulose membrane with 0.06 % 4-chloro-1-naphtol (Sigma Chemical Co.) in cold methanol mixed with H₂O₂ in Tris-HCl. Transblotted molecular weight markers were stained with Ponceau S following the manufacturer's protocol (Sigma Chemical Co.).

RESULTS

DETERMINATION OF THE OPTIMAL ANTIGEN CONCENTRATION

The optimal concentration of the antigenic preparation obtained for serovar Pomona was determined to be 22 µg protein per mL. In this ELISA, the heat-stable antigenic preparation reacted with rabbit antisera against all four *L. interrogans* serovars tested and with the rabbit antiserum against *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa (Figure 1). The heat-stable antigenic preparation from serovars Icterohaemorrhagiae and Bratislava showed reactivity against all five rabbit antisera listed above (data not shown). The three antigenic preparations gave considerably higher A_{450} values with homologous rabbit antiserum (data not shown).

ESTIMATION OF THE CUT-OFF POINT

Table I illustrates the frequency distribution of values of 158 canine sera obtained with indirect ELISA using heat-stable antigen of serovar Pomona. These sera were MAT negative at a dilution 1:100 for serovars Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Pomona, Grippytyphosa, and Bratislava. The mean OD_{450} value was calculated to be 0.069 with a standard deviation (SD) of 0.055. The cut-off value for the interpretation of positive and negative samples was set as the mean plus 4 SD, calculated to be 0.289. This value was rounded off to 0.29.

ESTIMATION OF RELATIVE SPECIFICITY AND SENSITIVITY OF THE ELISA

Considering a cut-off value of 0.29, the specificity and sensitivity of the ELISA relative to the MAT was shown to be 95.6 % and 100 %, respectively (Table II). Of the 158 sera MAT negative, 151 responded with OD₄₅₀ values that were above the cut-off point. Thus, 7 of 158 sera with no detectable anti-leptospiral antibodies by MAT, cross-reacted in this ELISA. Among 21 dogs with serum MAT antibody titers, the predominant titer was directed against serovar Pomona in 66.7 % of the sera (14/21). Predominant titers against serovars Grippytyphosa and Bratislava were found in one and two dogs, respectively. Four dogs showed a unique reaction to serovar Icterohaemorrhagiae. Predominant titers to serovars Autumnalis and Hardjo were not found in any of the dogs.

ANALYSIS OF THE HEAT-STABLE ANTIGENIC PREPARATION

The procedure used for preparation of the heat-stable antigenic preparations is simple and reproducible. Several lots which exhibit the same reactivity in the ELISA have been made. The total protein content of the heat-stable antigenic preparations from 100 mL of culture medium is sufficient to test 4000 serum samples in duplicate.

Silver stained SDS-PAGE separated gel of the antigenic preparations with a protein specific stain revealed the presence of a band at 81.2 kDa in all serovars, except for serovar Hardjo. Other bands were identified at 33.9 kDa (except for serovars Pomona and Autumnalis), 28.2 kDa for serovars Bratislava and Hardjo, 26.3 kDa (except for serovars Bratislava and Hardjo), 22.9 kDa for serovars Pomona and Hardjo and 20.9 kDa for serovar Autumnalis (Figure 2). In the immunoblot developed with the

positive canine serum intensely stained bands were observed at approximately 81.2, 37.2, 33.9 (except for serovar *Icterohaemorrhagiae*), 14.8, 13.2 and 12 kDa in all serovars (data not showed). These bands were superimposed on a diffusely stained background. In addition, two bands at 40.7 and 31.6 kDa and a region intensely stained ranging from 19 to 27 kDa were observed for serovar *Pomona* (Figure 3). Three bands at 61.7, 53.7 and 28.2 kDa were observed for serovar *Bratislava*. This latter band was also visualized for serovar *Hardjo* (data not shown). Normal canine serum did not react with heat stable antigenic preparations (data not shown). All the bands noted above for serovar *Pomona* with the positive canine serum were also detected by the anti-*Pomona* rabbit serum, except the 81.2 and 37.2 kDa bands (Figure 3). Three bands around the 14.4 kDa region were identified in all serovars (data not shown). The immunoblot with the five of seven MAT negative but ELISA positive canine sera showed a antibody production against low molecular mass antigens, around the 14.4 kDa region and the 19-27 kDa region (Figure 3).

DISCUSSION

This study indicates that an indirect ELISA using a heat-stable leptospiral antigenic preparation made from commonly occurring serovars is a specific, sensitive and practical test for the detection of antibodies against canine leptospires. The results of this immunoassay were expressed relative to those obtained with the internationally recognized MAT.

The ELISA developed in this study had a sensitivity of 100% relative to the MAT when canine sera with MAT titres of ≥ 100 to different serovars were tested. The ELISA had a specificity of 95.57% relative to the MAT. Of the 158 sera MAT negative tested, 7 reacted in the ELISA. This relative specificity value which was obtained with sera defined by the MAT, may be an underestimation of the true specificity of the indirect ELISA. It may be more likely that these sera contain non-agglutinating leptospiral antibodies that are detectable by ELISA but not by the MAT, which can only detect agglutinating antibodies. Since the ELISA can detect both agglutinating and non-agglutinating antibodies, it should have a higher sensitivity than the MAT. Indeed, a number of ELISA with higher sensitivities than the MAT have been reported for the detection of anti-*Leptospira* antibodies (23-27). In one of these studies (26), an indirect ELISA detected non-agglutinating antibodies in the sera of infected dogs during the initial stage of infection. Thus, it is possible that the indirect ELISA detected leptospires-specific non-agglutinating antibodies in the seven sera which gave discrepant results in this study. On immunoblot, five of these seven sera recognized some antigens visualized by the anti-Pomona rabbit serum and the positive canine serum (Figure 3).

These results could indicate the presence of leptospire-specific non-agglutinating antibodies in these sera. Nevertheless, the possibility that sera gave true false positive results due to the presence of cross-reacting antibodies can not be ruled out.

The procedure used for the production of the antigenic preparation is reproducible. A major advantage of the heat-extracted antigen is its stability. It could be stored for a period of at least four months. The results of the present study are in accordance with the results obtained by Terpstra *et al.* (28) who reported that the antigenic preparation could be stored for a long time.

Serogroup/serovar-specific leptospiral antigens are known to consist of LPS and serogroup cross-reactive antigens are composed of proteins (24). The present study indicates that the heat-stable antigenic preparations from the serovars Pomona, Icterohaemorrhagiae and Bratislava reacted with all five anti-leptospire rabbit sera tested but that the highest titres were, as expected, found with the homologous serum. The immunoblot revealed antibody production against low molecular mass antigens, around the 14.4 kDa region and the 19-27 kDa region in antigenic preparations from serovar Pomona (Figure 3). The bands around the 14.4 region were also detected in the antigenic preparations of serovars Bratislava, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Hardjo and Gripotyphosa. These observations confirm previous results obtained by Gitton *et al.* (29). After infection by an virulent strain, unvaccinated and vaccinated dogs exhibited an antibody production against low molecular mass antigens, around the 14 kDa region. In unvaccinated dogs, these antibodies were not serogroup specific. The first serogroup specific antibodies produced were directed against the 18-25 kDa region. These serovar-specific epitopes, could be responsible for the greater reactivity of the homologous serum in the different ELISA procedures. This finding supports the results obtained by

Terpstra *et al.* (28) who indicated that this antigenic preparation could be prepared from different serovars and may contain serogroup and possibly type-specific fractions apart from the broadly reactive genus-specific fraction or fractions.

In this study, the ELISA detected positive sera for canine leptospirosis caused by serovars Pomona, Bratislava, Grippityphosa and Icterohaemorrhagiae. The reactivity with serovars Pomona and Grippityphosa is of particular relevance because these are emerging serovars in many parts of the world.

In conclusion, the ELISA for the detection of canine anti-leptospire antibodies developed in this study proved to be sensitive, rapid and easy to perform. This assay uses a non-hazardous and reproducible antigenic preparation, is objectively interpreted and is repeatable. Consequently, the ELISA described in this report will be a particularly valuable screening test in routine diagnostic laboratories that do not have the facilities or expertise to perform MAT and in laboratories that do not carry out routinely tests for leptospirosis, although confirmation of a diagnosis by MAT at a specialized reference laboratory would be recommended.

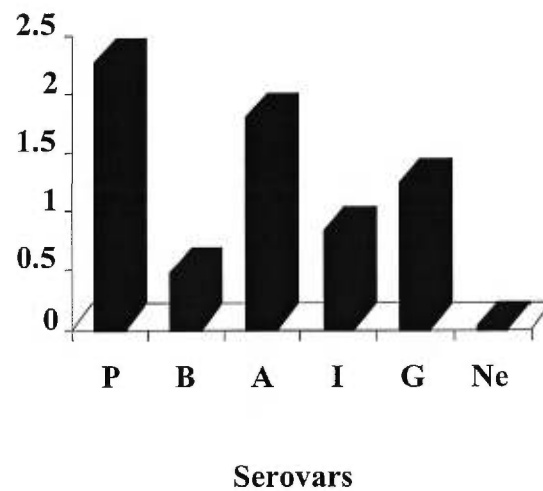
Optical Density (450 nm)

Figure 1. Optical density (OD₄₅₀) results of indirect ELISA using a heat-stable antigen from serovar Pomona and rabbit antisera against *Leptospira interrogans* serovars Pomona (P), Bratislava (B), Autumnalis (A), and Icterohaemorrhagiae (I), *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa (G) and negative rabbit serum (Ne)

Table I. Frequency distribution of the optical densities at 450 nm (OD₄₅₀) values in an indirect ELISA using a heat-stable antigen from serovar Pomona of negative canine sera (N=158) against different serovars, as tested by MAT^a.

OD ₄₅₀	No. of sera	
≤ 0.019-0.039	35	
0.04-0.079	67	
0.08-0.119	28	
0.12-0.159	10	
0.16-0.199	4	
0.2-0.239	3	
0.24-0.279	3	
0.28-0.289	1	
≥ 0.29	7	
Total (N)	158	
ELISA Antigen	N^b	Mean OD^c ± 1 SD
Pomona	151	0.069 + 0.055

^aMAT negative at a dilution of 1:100 for serovars Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Hardjo, Autumnalis and Bratislava.

^bN = 151 since for the calculation of mean OD₄₅₀ values, seven samples showing OD₄₅₀ values greater than 0.29 were excluded.

^cOptical density

Table II. Determination of relative specificity and sensitivity of ELISA for the detection of leptospiral antibodies in dog sera.

		MAT		
		Positive (n = 21)	Negative (n = 158)	Total (n = 179)
ELISA	Positive (n = 28)	21	7	28
	Negative (n = 151)	0	151	151
	Total (n = 179)	21	158	179

Relative sensitivity = 100%

Relative specificity = 95.6%

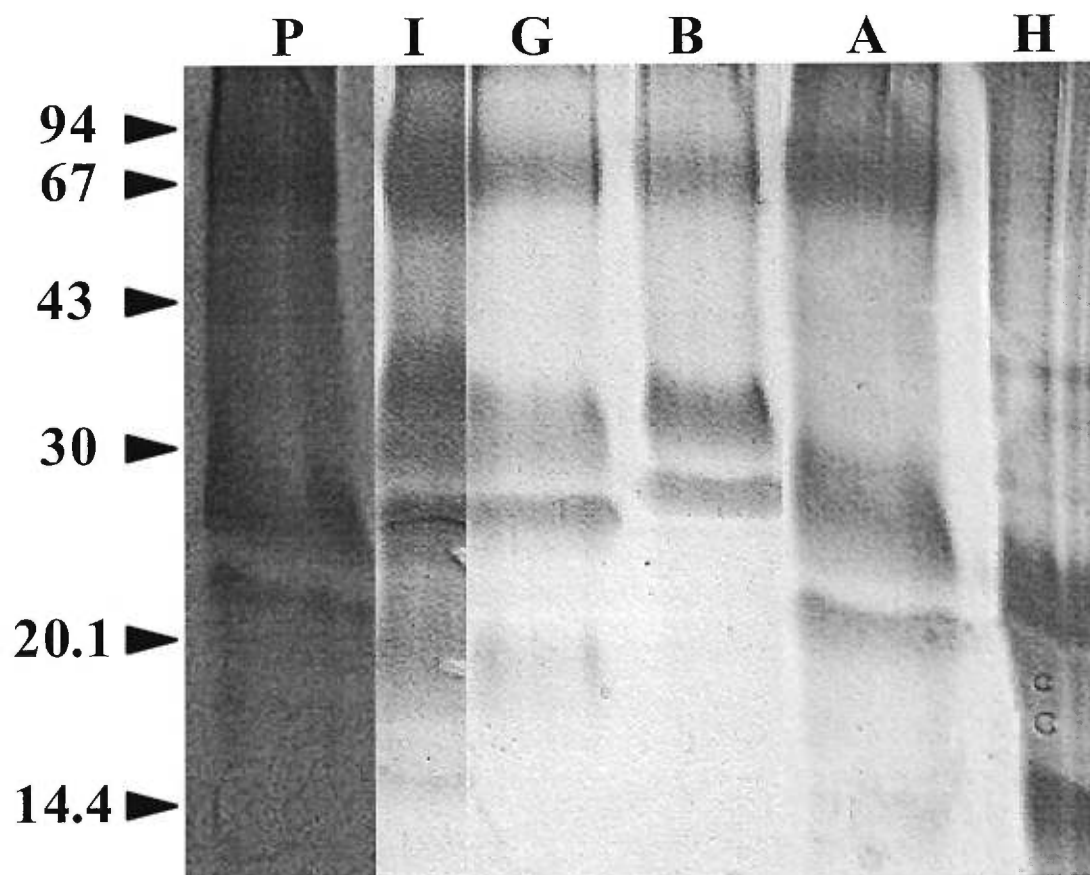


Figure 2. SDS-PAGE gel of *Leptospira interrogans* serovars Pomona (P), Autumnalis (A), Hardjo (H), Icterohaemorrhagiae (I) and Bratislava (B), and *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa (G) heat stable antigenic preparation that were silver stained. Arrows indicate the positions of mol. weight markers in KDa.

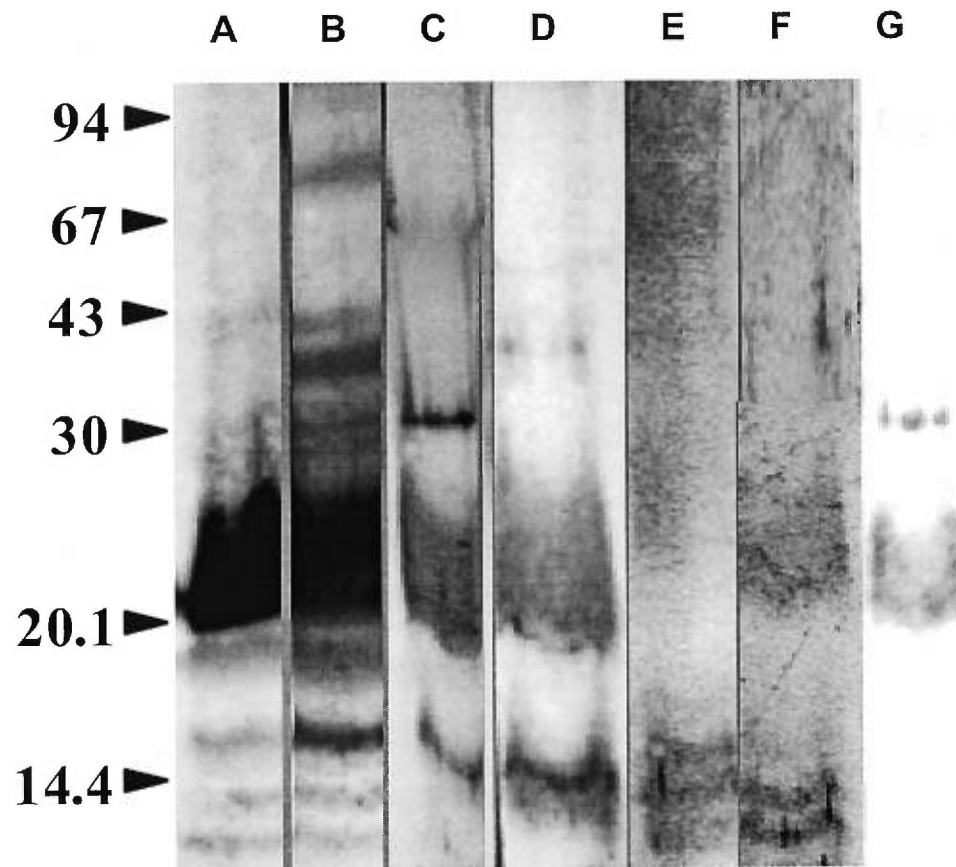


Figure 4. Immunoblot of heat-stable antigenic preparation from serovar Pomona resolved by SDS-PAGE and reacted with the positive canine serum (Lane A), the anti-Pomona rabbit serum (Lane B) and the five of seven MAT negative but ELISA positive canine sera (Lanes C to G). Positions of molecular mass markers are indicated on the left.

REFERENCES

1. **BALDWIN CJ, ATKINS CE.** Leptospirosis in dogs. *Comp Cont Educ Prac Vet* 1987; 9: 499-507.
2. **BOLIN CA.** Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. *Sem Vet Med Surg (Small Anim)* 1996; 3: 166-171.
3. **WAGENAAR JA.** *Leptospira*. In: *Leptospirosis: Diagnosis and Pathogenesis* (PhD thesis). Utrecht: Universiteit Utrecht, Faculteit diergeneeskunde, 1994: 9-31
4. **PEROLAT P, CHAPPEL RJ, ADLER B, BARANTON G, BULACH DM, BILLINGHURST ML, LETOCART M, MERIEN F, SERRANO MS.** *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 851-858.
5. **BIRNBAUN N, BARR SC, CENTER SA, SCHERMERHORN T, RANDOLPH JF, SIMPSON KW.** Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J Small Anim Med* 1998; 39: 231-236.
6. **RENTKO VT, CLARK N, ROSS LA, SCHALLING SH.** Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Int Med* 1992; 6: 235-244.
7. **WOHL JS.** Canine Leptospirosis. *Comp Cont Educ Pract Vet* 1996; 18: 1215-1225.
8. **FORREST LJ, O'BRIEN RT, TREMELLING MS, STEINBERG H, COOLEY AJ, KERLIN RL.** Sonographic renal findings in 20 dog with leptospirosis. *Vet Radio Ultrasound* 1998; 39: 337-340.
9. **PRESCOTT JF, FERRIER RL, NICHOLSON VM, JOHNSTON KM, BRENT H.** Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. *Can Vet J* 1991; 32: 481-486.

10. **LEVITAN DM.** Long Island canine renal/hepatic syndrome is likely due to leptospirosis. *Vet. News, New York Vet Med Soc* 1996; 61: 3-4.
11. **HARKIN KR, GARTELL CL.** Canine leptospirosis in New Jersey Michigan: 17 cases (1990-1995). *J Am Anim Hop Assoc* 1996; 32: 495-501.
12. **BROWN A, ROBERTS W, MILLER MA, DEVIS DA, BROWN SA, BOLIN CA, JARECKI-BLACK J, GREENE CE, MILLER-LIEBL D.** *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209: 1265-1267.
13. **HRINIVICH K, PRESCOTT JF.** Leptospirosis in 2 unrelated dogs. *Can Vet J* 1997; 38: 509-510.
14. **KALIN M, DEVAUX C, DIFRUSCIA R, LEMAY S, HIGGINS R.** Three cases of canine leptospirosis in Quebec. *Can Vet J* 1999; 187-191.
15. **SURUJBALLI O, MARENGER R, EAGLESOME MD, SUGDEN EA.**
Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo antibodies in bovine sera. *Can J Vet Res* 1997; 61: 260-266.
16. **CHAMPAGNE MJ, HIGGINS R, FAIRBROTHER JM, DUBREUIL D.**
Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *Can J Vet Res* 1991; 55: 239-245.
17. **TERPSTRA WJ, LIGTHART GS, SCHOONE GJ.** Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1980; 247 A: 400-405.

18. **FAINE S.** Methods. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994: 305-329.
19. **COLE JR, SULZER CR, PURSELL AR.** Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 1973; 25: 976-980.
20. **ZWEIG MH, ROBERTSON EA** Clinical validation of immunoassays: a well-designed approach to a clinical study. In: Chaw DW and Perlstein MT eds. *Immunoassay: a Practical Guide*. San Diego, California: Academic Press Inc, 1987: 97-127.
21. **LAEMMLI UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
22. **TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
23. **ADLER B, MURPHY M, LOCARNINI SA, FAINE S.** Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 452-457
24. **TRUEBA GA, BOLIN CA, THOEN CO.** Evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of bovine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type hardjobovis. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2: 323-329.
25. **THIERMANN AB, GARRETT LA.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars Hardjo and Pomona in cattle. *Am J Vet Res* 1983; 44: 884-887.

26. **HARTMAN EG, VAN HOUTEN M, VAN DER DONK JA, FRIK JF.** Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Immunol Immunopathol* 1984; 7: 33-42
27. **SURUJBALLI O, HENNING D, MARENGER R, HOWLETT C.** Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type hardjobovis antibodies in bovine sera. *Can J Vet Res* 1995; 61: 267-274.
28. **TERPSTRA WJ, LIGTHART GS, SCHOONE GJ.** ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 377-385.
29. **GITTON X, BUGGIN DAUBIÉ M, ANDRÉ F, GANIÈRE JP.** Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs. *Vet Microbiol* 1994; 41: 87-97.

IV – DISCUSSION ET CONCLUSIONS

DISCUSSION

Cette étude indique qu'une épreuve ELISA indirecte, utilisant une préparation antigénique stable à la chaleur, est une épreuve spécifique, sensible et pratique pour la détection d'anticorps anti-leptospires chez l'espèce canine. Les résultats de cette épreuve ont été exprimés relativement à ceux obtenus avec le test d'agglutination microscopique (MAT).

L'épreuve ELISA développée dans cette étude avait une sensibilité relative au MAT de 100% lorsque 21 sérums d'origine canine avec des titres ≥ 100 envers un ou plusieurs sérovars ont été testés. L'épreuve ELISA avait une spécificité relative au MAT de 95.6%. Des 158 sérums MAT négatifs testés, 7 ont réagi dans l'épreuve ELISA. Cette valeur de spécificité relative, laquelle a été obtenue avec des sérums définis par le MAT, peut être une sous-estimation de la spécificité réelle de l'épreuve ELISA indirecte. Il se peut que ces sérums contiennent des anticorps anti-leptospires non-agglutinants qui soient détectables par l'ELISA mais non par le MAT. Ce dernier test est seulement capable de détecter des anticorps agglutinants. Comme l'épreuve ELISA peut détecter les deux types d'anticorps, agglutinants et non-agglutinants, elle pourrait avoir une sensibilité supérieure au MAT. En effet, un certain nombre d'ELISA qui présentent une sensibilité supérieure au MAT, ont été décrits pour la détection d'anticorps anti-*Leptospira* (Adler et coll., 1980; Trueba et coll., 1990; Thiermann et Garrett, 1983; Hartman et coll., 1984; Surujballi et coll., 1997b). Dans une des ces études (Hartman et coll., 1984), une épreuve ELISA indirecte détectait des anticorps non-agglutinants dans des sérums de chiens infectés pendant l'étape initiale de

l'infection. Par conséquent, il est possible que l'épreuve ELISA indirecte détecte des anticorps non-agglutinants anti-leptospires dans les 7 sérums qui ont donné des résultats divergents dans cette étude. A l'immunotransfert, 5 de ces 7 sérums reconnaissent quelques-uns des antigènes visualisés par le sérum de lapin anti-Pomona et le sérum de chien utilisé comme contrôle positif fort dans l'épreuve ELISA (Figure 3). Ces résultats peuvent indiquer la présence d'anticorps non-agglutinants spécifiques de leptospires dans ces sérums. Néanmoins, la possibilité que ces sérums aient donné des résultats faussement positifs dus à la présence des anticorps qui donnent des réactions croisées dans cette épreuve ELISA, ne peut pas être écartée.

La procédure utilisée pour la préparation antigénique est reproductible (Figure 1, Annexes). Un avantage majeur est la stabilité de la préparation antigénique. Elle peut être gardée pendant au moins quatre mois (Figure 2, Annexes). Les résultats de cette présente étude sont conformes à ceux obtenus par Terpstra et coll., (1985). Ces auteurs indiquent que la préparation antigénique peut être gardée pendant une longue période de temps.

Les antigènes spécifiques de séro groupe sont composés de LPS tandis que les antigènes responsables des réactions croisées au niveau de séro groupe sont composés de protéines (Trueba et coll., 1990). Le présente étude indique que la préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir des sérovars Pomona, Icterohaemorrhagiae et Bratislava réagit avec les cinq sérums de lapin anti-leptospires testés (Tableau I, Annexes). Néanmoins, le plus haut titre a été trouvé avec le sérum homologue (Tableau II, Annexes). L'immunotransfert a révélé la production d'anticorps contre les antigènes de la région de 14.4 kDa et de la région de 19-27 kDa dans la préparation antigénique produite à partir du sérovar Pomona (Figure 3). Les bandes

autour de la région de 14.4 kDa ont été observées dans la préparation antigénique produite à partir des sérovars Bratislava, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Hardjo et Grippytyphosa (Figures 3 et 4, Annexes). Ces observations confirment les résultats antérieurs obtenus par Gitton et coll., 1994. Après l'infection par une souche virulente, les chiens vaccinés et non vaccinés ont démontré une production d'anticorps autour de la région de 14.4 kDa. Ces anticorps n'étaient pas spécifiques de sérotype chez les chiens non vaccinés. Les premiers anticorps spécifiques de sérotype ont été produits contre la région de 18-25 kDa. Ces épitopes, spécifiques de sérovar, peuvent être responsables de la plus grande réactivité du sérum homologue dans l'épreuve ELISA. Ces observations supportent les résultats obtenus par Terpstra et coll. (1985) qui indiquent que cette préparation antigénique peut être préparée à partir de différents sérovars. D'autre part, les auteurs signalent que la préparation antigénique peut contenir des fractions spécifiques de sérotype et peut-être même de sérovar, en plus de la fraction ou des fractions spécifiques de genre.

Dans cette étude, l'épreuve ELISA indirecte a détecté tous les cas positifs de leptospirose canine causés par les sérovars Pomona, Bratislava Grippytyphosa et Icterohaemorrhagiae. La réactivité avec les sérovars Pomona et Grippytyphosa est d'une importance particulière puisque ces sérovars sont en émergence dans différentes parties du monde. Comme dans des rapports antérieurs qui décrivent, des cas de leptospirose canine à partir de Massachusetts, Michigan, New Jersey, Georgi⁶, New York, Ontario et Québec, la leptospirose canine a été attribuée à d'autres sérovars que ceux contenus dans les vaccins commerciaux (Rentko et coll., 1992; Brown et coll., 1996; Harkin et Gartrell, 1996; Birnbaum et coll., 1998; Prescott et coll., 1999; Kalin et coll., 1999). La détermination du sérovar impliqué n'a pas été facile à cause de

l'existence de réactions croisées entre les sérovars Pomona et Grippytyphosa. Néanmoins, sur la base du titre le plus élevé, les sérovars impliqués ont été Pomona (14 chiens), Bratislava (deux chiens), Grippytyphosa (un chien). L'émergence des ces sérovars est probablement due à l'utilisation de vaccins contre les sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae et possiblement, aux nombreux contacts dans les centres urbains et péri-urbains, entre les chiens et les mouffettes ou les raton-laveurs lesquels agissent comme réservoirs des sérovars Pomona et Grippytyphosa. En plus, les chiens qui sont en contact avec des porcs sont à risque pour une exposition au sérovar Bratislava (Bolin, 1996). Quatre chiens ont uniquement présenté une réaction 1:100 contre le sérovar Icterohaemorrhagiae. A cause du manque d'histoire clinique reliée à ces sérums et de l'impossibilité de faire une deuxième prise de sang, il est difficile d'estimer si ces sérums positifs résultent ou non d'une infection.

CONCLUSIONS

L'épreuve ELISA indirecte développée dans cette étude pour la détection d'anticorps anti-leptospires s'est avérée sensible, rapide et facile à exécuter. Cette épreuve, utilise une préparation antigénique reproductible et non-hasardeuse, est objectivement interprétée et est répétitive. Par conséquent, l'épreuve ELISA décrite dans ce rapport serait un précieux test de tamisage dans les laboratoires de diagnostic qui n'ont pas la facilité ou l'expertise pour exécuter le MAT et dans les laboratoires où la leptospirose n'est pas un diagnostic fréquent. Toutefois, la confirmation subséquente des résultats positifs par le MAT est recommandée.

L'existence d'une séroprévalence chez les chiens est inquiétante pour la santé publique puisque le fort contact entre les chiens et les humains peut fournir le lien entre un réservoir et un humain sensible à la maladie. Par conséquent, la production d'un vaccin pour l'espèce canine contenant les sérovars Pomona, Grippotyphosa et Bratislava en plus des sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae est recommandée.

V - BIBLIOGRAPHIE

- Acha P. N. et Szyfres B.** 1986. Leptospirose. In: Zoonoses et Maladies Transmissibles Communes à l'Homme et aux Animaux. 2 ed. Office International des Epizooties. 90-98.
- Adachi Y. and Yanagawa R.** 1975. Possible role of protein(s) as antigenic determinants of the type-specific main antigen of *Leptospira* Kremastos strain Kyoto. Infect. Immun. **11**: 1325-1331.
- Adachi Y. and Yanagawa R.** 1977. Inhibition of leptospiral agglutination by the type-specific main antigens of leptospiras. Infect. Immun. **17**: 466-467.
- Adachi Y. and Yanagawa R.** 1978. Nature of antigenic determinant of serovar-specific antigen of *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis. Microbiol. Immunol. **22**: 525-533.
- Adler B., Ballard S. A., Miller S. J. and Faine S.** 1989. Monoclonal antibodies reacting with serogroupe and serovar specific epitopes on different lipopolysaccharide subunits of *Leptospira interrogans* serovar Pomona. FEMS Microbiol. Immunol. **47**: 213-218.
- Adler B., Cousins D. V., Faine S. and Robertson G. M.** 1982a. The bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo as measured by enzyme-immunoassay. Vet. Microbiol. **7**: 577-585.
- Adler B., Chappel R. J. and Faine S.** 1982b. The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. **252 A**: 405-413.
- Adler B. and Faine S.** 1978. Serological and protective antibodies responses of rabbits to leptospiral antigens. J. Med. Microbiol. **11**: 401-409.

- Adler B. and Faine S.** 1979. Serological cross-reactions of leptospiral lipopolysaccharide (F4) antigen. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg.* **244 A:** 291-301.
- Adler B. and Faine S.** 1983a. Species- and genus-specific antigens in *Leptospira* revealed by monoclonal antibodies and enzyme immunoassay. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg.* **255 A:** 317-322.
- Adler B. and Faine S.** 1983b. A Pomona serogroup-specific agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies. *Pathology* **15:** 247-250.
- Adler B., Faine S. and Gordon L. M.** 1981. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a serological test for detecting antibodies against *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in sheep. *Aust. Vet. J.* **57:** 414-417.
- Adler B., Faine S. and Yanagawa R.** 1980a. Comparative studies on two antigens (F4 and TM) extracted from leptospire. *J. Clin. Microbiol.* **12:** 7-9.
- Adler B., Murphy A. M., Locarnini S. A. and Faine S.** 1980b. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **11:** 452-457.
- André-Fontaine G., Ruvoen-Clouet N. et Ganière J. P.** 1994. Données récentes sur la leptospirose canine. *Rec. Méd. Vét.* **170:** 663-668.
- Baldwin C. J. and Atkins C. E.** 1987. Leptospirosis in dogs. *Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.* **9:** 499-507.
- Ballard S. A., Faine S. and Adler B.** 1990. Purification and characterization of a protein antigen from *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, common to a wide range of bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **136:** 1849-1857.

- Birnbaun N., Barr S. C., Center S. A., Schermerhorn T., Randolph J. F. and Simpson K. W.** 1998. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J. Small Anim. Med.* **39**: 231-236.
- Bolin C. A.** 1996. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*. **3**: 166-171.
- Bolin C. A., Zuerner R. L. and Trueba G.** 1989. Comparaison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type *hardjobovis* in bovine urine. *Am. J. Vet. Res.* **50**: 1001-1003.
- Brown A., Roberts W., Miller M. A., Devis D. A., Brown S. A., Bolin C. A., Jarecki-Black J., Greene C. E. and Miller-Liebl D.** 1996. *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa infection in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **209**: 1265-1267.
- Cinco M., Banfi E. and Panfili E.** 1988. Leptospiral lipopolysaccharide presence in the outer envelope: electrophoretic evidence and immunological specificity. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **269 A**: 277-283.
- Cole J. R., Sulzer C. R. and Pursell A. R.** 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Microbiol.* **25**: 976-980.
- Cousins D. V., Robertson G. M. and Hustas L.** 1985. The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars Hardjo, Pomona and Tarassovi in cattle. *Vet. Microbiol.* **10**: 439-450.
- Champagne M. J., Higgins R., Fairbrother J. M. and Dubreuil D.** 1991. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody

sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 239-245.

Chapman A. J., Adler B. and Faine S. 1988. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *J. Med. Microbiol.* **25**: 269-278.

Chappel R. J., Adler B., Ballard S. A., Faine S., Jones R. T., Millar B. D. and Swainger J. A. 1985. Enzymatic radioimmunoassay for detecting *Leptospira interrogans* serovar Pomona in the urine of experimentally-infected pigs. *Vet. Microbiol.* **10**: 279-286.

Cho H. J., Gale S. P., Marsi S. A. and Malkin K. L. 1989. Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovars Pomona, Sejroe et Hardjo in cattle. *Can. J. Vet. Res.* **53**: 285-289.

Dickeson D. and Love D. N. 1993. A serological survey of dogs, cats, and horses in southeastern Australia for leptospiral antibodies. *Aust. Vet. J.* **70**: 389-390.

Dikken H. 1986. Serological identification using the classical cross-agglutinin method and the factor sera method. In: *The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*. W. A. Ellis et T. W. A. Little (eds.). Martinus Nijhoff. 69-81.

Ellis T. M., Robertson T. M., Hustas L. and Kirby M. 1983. Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust. Vet. J.* **60**: 364-367.

Ellis W. 1986. *The Present State Of Leptospirosis Diagnosis and Control*. Eds. W. A. Ellis, T. W. A. Little. Philadelphia: Dordrecht Martinus Nijhoff. 13.

- Ellis W., International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the meeting , 13 and 15 September 1990, Osaka, Japan. 1992. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 330-334.**
- Ellis W. A., O'Brien J. J., Neill S. D., Ferguson H. W. and J. Hanna. 1982. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. Vet. Rec. 110: 147-150.**
- Faine S. 1994. Taxonomy, Classification and Nomenclature. In: Leptospira and Leptospirosis. Boca Raton, Florida: CRC Press. 117-141.**
- Faine S., Adler B. and Palit A. 1974. Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific lipopolysaccharide antigen in *Leptospira*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 52: 311-319.**
- Fairbrother J. M. 1984. Serological interrelationship of *Leptospira* serovar and genus-specific antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 20: 1089-1093.**
- Fairbrother J. M. 1985. Antibody response to genus and serovar specific leptospiral antigen in *Leptospira* infected cows. Am. J. Vet. Res. 46: 1422-1426.**
- Farr, W. R. 1995. Leptospirosis. Clin. Infect. Dis. 21: 1-6.**
- Farrelly H. E., Adler B. and Faine S. 1987. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. J. Med. Microbiol. 23: 1-7.**
- Forrest L. J., O'Brien R. T., Tremelling M. S., Steinberg H., Cooley A. J. and Kerlin R. L. 1998. Sonographic renal findings in 20 dog with leptospirosis. Vet. Radiol. Ultrasound 39: 337-340.**

- Gitton X., André-Fontaine G., André F. and Ganière J. P.** 1992. Immunoblotting study of the antigenic relationships among eighth serogroups of *Leptospira*. Vet. Microbiol. **32**: 293-303.
- Gitton X., Daubié M.B., André F., Ganière F. P. and André-Fontaine G.** 1994. Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs. Vet. Microbiol. **41**: 87-97.
- Greene C. E.** 1995. Bacterial diseases. In: Ettinger S. J., Feldman E. C. eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 4th ed. Philadelphia:WB Saunders. 367-376.
- Hanson L. E.** 1982. Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective. J. Am. Vet. Med. Assoc. **181**: 1505-1509.
- Harkin K. R. and Gartell C. L.** 1996. Canine leptospirosis in New Jersey Michigan: 17 cases (1990-1995). J. Am. Anim. Hop. Assoc. **32**: 495-501.
- Hartman E. G., Van Houten M., Van der Donk J. A. and Frik J. F.** 1984a. Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Immunol. Immunopathol. **7**: 33-42.
- Hartman E. G., Van Houten M., Van der Donk J. A. and Frik J. F. Van der Donk J. A.** 1984b. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM and IgG specific ELISA. Vet. Immunol. Immunopathol. **7**: 245-254.
- Hartman E. G., Van den Ingh T.S.G.A.M. and Tothuisen J.** 1986. Clinical, pathological, and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM and IgG specific ELISA. Vet. Immunol. Immunopathol. **13**: 261-271.

- Heath S. E. and Johnson R.** 1994. Clinical update: leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **205**: 1894-1898.
- Higgins R. et Champagne M. J.** 1993. La leptospire porcine. *Méd. Vét. Québec.* **23**: 6-12.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H., Stally J. T. and Williams S. T.** 1994. The Spirochetes. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9^o ed.*, Williams et Wilkins Co., Baltimore. 27-31.
- Holt Stanley C.** 1978. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* **42**: 114-160.
- Hovind-Hougen K.** 1979. *Leptospiraceae*, a new family to include *Leptospira* Noguchi 1917 and *Leptonema* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**: 245-251.
- Hovind-Hougen K.** 1986. Morphology of leptospires. Electron microscopic studies in relation to the classification of *Leptospira*. In: *The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*. W. A. Ellis et T. W. A. Little (eds.). Martinus Nijhoff. 1-11.
- Hovind-Hougen K., Ellis W. A. and Birch-Andersen.** 1981. *Leptospira parva* sp. nov.: some morphological and biological characters. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **250 A**: 343-354.
- Hovind-Hougen K. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira* . Minutes of the meeting , 5 and 6 September 1986, Manchester, England.** 1987. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 472-473.
- Hrinivich K. and Prescott J. F.** 1997. Leptospirosis in 2 unrelated dogs. *Can. Vet. J.* **38**: 509-510.

- Institut Pasteur.** Méthodes de laboratoire leptospirose-borréliose de Lyme: Méthodes de laboratoire pour le diagnostic biologique de la leptospirose. Cap. 1: 6-55.
- Johnson R. C. and Faine S.** 1984. The Spirochetes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. N. R. Krieg et J.G. Holt (eds.), Williams et Wilkins Co., Baltimore. 38-39; 62-67.
- Jost B. H., Adler B. Vinh T. and Faine S.** 1986. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. J. Med. Microbiol. **22**: 269-275.
- Jost B. H., Adler B. and Faine S.** 1988. Reaction of monoclonal antibodies with species specific determinants in *Leptospira interrogans* outer envelope. J. Med. Microbiol. **27**: 51-57.
- Jost B. H., Adler B. and Faine S.** 1989. Experimental immunisation of hamster with lipopolisaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. J. Med. Microbiol **29**: 115-120.
- Kalin M., Devaux C., Difruscia R., Lemay S. and Higgins R.** 1999. Three cases of canine leptospirosis in Quebec. Can. Vet. J. 187-191.
- Kasai N. and Yanagawa R.** 1974. Studies on the antigen determinant group of the type specific antigen of *Leptospira Canicola*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt, I. Orig. Reihe **228 A**: 533-541.
- Kawaoka Y., Nsiki M. and Yanagawa R.** 1979. Radioimmunoassay system using a serovar-specific lipopolysaccharide antigen of *Leptospira*. J. Clin. Microbiol. **10**: 313-316.

- Kelson J. S., Adler B., Chapman A. J. and Faine S.** 1988. Identification of leptospiral flagellar antigens by gel electrophoresis and immunoblotting. *J. Med. Microbiol.* **26:** 47-53.
- Kmety E. and Dikken H.** 1988. Revised list of *Leptospira* serovars. International Committee on Systematic Bacteriology of IUMS. Groningen. The Netherlands, University Press.
- Levitan D. M.** 1996. Long Island canine renal/hepatic syndrome is likely due to leptospirosis. *Vet. News, New York Vet. Med. Soc.* **61:** 3-4.
- List N° 9.** 1982. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32:** 384-385.
- List N° 10.** 1983. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33:** 438-440.
- Marshall R. B., Wilton B. and Robinson A. J.** 1981. Identification of *Leptospira* serovar by restriction endonuclease analysis. *J. Med. Microbiol.* **14:** 162-166.
- Midwinter A., Vinh T., Faine S. and Adler B.** 1994. Characterization of an antigenic ligosaccharide from *Leptospira interrogans* serovar Pomona and its role in immunity. *Infect. Immun.* **62:** 5477-5482
- Miller D. A., Wilson M. A. and Kirkbride C. A.** 1989. Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1:** 146-149.
- Myers D. M. and Coltorti E. A.** 1978. Broadly reacting precipitating and agglutinating antigen of *Leptospiraceae*. *J. Clin. Microbiol.* **8:** 580-590.

- Nielsen J. N., Cochran G. K., Cassells J. A. and Hanson L. E.** 1991. *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection in two dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. **199**: 351-352.
- Nunes-Edwards P. L., Thiermann A. B., Bassford P. J. and Stamm L. V.** 1985. Identification and characterization of the protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Infect. Immun. **48**: 492-497.
- Ochiai S., Adachi Y. and Mori K.** 1997. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comb. nov. Microbiol. Immunol. **41**: 445-452.
- Office International des Epizooties. World organization for animal health.** 1996. Leptospirosis. In: Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. 198-206.
- Ono E., Takase H., Naiki M. and Yanagawa R.** 1987. Purification, characterization and biological properties of a glycolipid antigen reactive with a serovar-specific monoclonal antibody against *Leptospira interrogans* serovar Canicola. J. Gen. Microbiol. **133**: 1329-1336.
- Palit A. and Gulasekharam J.** 1973. Genus specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. J. Clin. Pathol. **26**: 7-16.
- Palmer M. and Hookey J.** 1992. The chemiluminescent detection of leptospiral antigens. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg. **277**: 300-308.
- Perolat P., Chappel R. J., Adler B., Baranton G., Bulach D. M., Billingham M. L., Letocart M., Merien F. and Serrano M. S.** 1998. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 851-858.

- Pope V. and Johnson R. C.** 1991. Effect of heat or formalin treatment of leptospire on antibody reponse detected by immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1548-1550.
- Prescott J. F., Ferrier R. L., Nicholson V. M., Johnston K. M. and Brent H.** 1991. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. *Can. Vet. J.* **32**: 481-486.
- Prescott J. F., Miller R. B., Nicholson V. M., Martin S. W. and Lesnick T.** 1985. Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* **52**: 210-215.
- Ramadass P., Jarvis D. W., Corner N. J. Penny D. and Marshall B.** 1992. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 215-219.
- Rentko V. T., Clark N., Ross L. A. and Schalling S. H.** 1992. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J. Vet. Int. Med.* **6**: 235-244.
- Sakamoto N., Ono E., Kida H. and Yanagawa R.** 1985a. Production of monoclonal antibodies against leptospiral genus-specific protein antigen and localization of the antigen by immunoelectron. *Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene* **259 A**: 557-563
- Sakamoto N., Ono E., Kida H. and Yanagawa R.** 1985b. Characterization of a partially purified leptospiral genus-specific protein antigen. *Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene* **259 A**: 507-519.
- Scanziani E., Calcaterra S., Luini M., Giusti A. M. and Tomba M.** 1994. Serological findings in cases of acute leptospirosis in the dog. *J. Small Anim. Pract.* **35**: 257-260.

- Scanziani E., Luini M., Fabbi M. and Pizzocaro P.** 1991. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.* **50**: 229-232.
- Shimono E., Sugiyama K. and Yanagawa R.** 1979. Specificity of serovar-specific main antigens of leptospiras shown by the infection of leptospiral microscopic agglutination. *Jpn. J. Vet. Sci.* **41**: 623-628.
- Shimizu T., Matsusaka E., Nagakura N., Takayanagi K., Yuramoto Y., Morita T., Mifuchi I. and Yanagihara Y.** 1987. Chemical properties of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Moulton. *Microbiol. Immunol.* **31**: 717-726.
- Shinagawa M. and Yanagawa R.** 1972. Isolation and characterization of leptospiral type-specific antigen. *Infect. Immun.* **5**: 12-19.
- Slee K. J., McOrist and Skilbeck N. W.** 1983. Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection. *Austr. Vet. J.* **60**: 204-206.
- Stallman S. D., International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*.** Minutes of the meeting, September 5-6, 1986, Manchester, England. 1987. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 472-473.
- Stevens A. E., Headlam S. A., Pritchard D. G., Thorns C. J. And Morris J. A.** 1985. Monoclonal antibodies for diagnosis of infection with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo by immunofluorescence. *Vet. Rec.* **116**: 593-594.
- Sugiyama K. and Yanagawa R.** 1978. Inhibition of leptospiral agglutination by the nondialyzable delipidized serovar-specific main antigens of leptospiras. *Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung I, Originalreihe* **224 A**: 261-264.

- Sullivan N. D.** 1974. Leptospirosis in animals and man. *Aust. Vet. J.* **50**: 216-222.
- Surujballi O., Henning D., Marenger R. and Howlett C.** 1997a. Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type hardjobovis antibodies in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.* **61**: 267-274.
- Surujballi O., Marenger R., Eaglesome M. D. and Sugden E. A.** 1997b. Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo antibodies in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.* **61**: 26-266.
- Terpstra W. J., Ligthart G. S. and Schoone G. J.** 1980. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **247 A**: 400-405
- Terpstra W. J. and Schoone G. J.** 1983. Analysis of *Leptospira* antigens by crossed immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immun.* **18**: 113-121.
- Terpstra W. J., Ligthart G. S. and Schoone G. J.** 1985. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 377-385.
- Thiermann A. B. and Garrett L. A.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars Hardjo and Pomona in cattle. *Am J. Vet. Res.* **44**: 884-887.
- Thiermann A. B.** 1983. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a new method for serological diagnosis of bovine leptospirosis. *Proc. Int. Symp. World Assoc. Vet. Lab. Diagn.* **3**: 97-103.

- Trueba A. G., Bolin C. A. and Thoen C. O.** 1990. Evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of bovine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type hardjobovis. J. Vet. Diagn. Invest. **2**: 323-329.
- Tsuji M., Kawaoka M., Naiki M. and Yanagawa R.** 1981. Isolation of antigenically active components from leptospiral serovar-specific lipopolysaccharide antigen by alkaline treatment. Microbiol. Immunol. **25**: 949-957.
- Vinh T., Adler B. and Faine S.** 1986. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. J. Gen. Microbiol. **132**: 103-109.
- Vinh T., Shi M. N., Adler B. and Faine S.** 1989. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. J. Gen. Microbiol. **135**: 2663-2673.
- Wagenaar J. A.** 1994. *Leptospira*. In: Leptospirosis: Diagnosis and Pathogenesis (PhD thesis). Utrecht: Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde. 9-31.
- Waltman W. D. and Dawe D. L.** 1983. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antileptospiral antibodies in swine sera. Am. J. Vet. Res. **44**: 153-156.
- Westphal O. and Jann K.** 1965. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Meth. Carboh. Chem. **5**: 83-91.
- Wohl J. S.** 1996. Canine Leptospirosis. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. **18**: 1215-1225.
- Woodward M. J., Swallow C., Kitching A., Dalley C. And Sayers A. R.** 1997. *Leptospira* Hardjo serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA and Immunocomb. Vet. Rec. **141**: 603-604.

Yasuda P. H., Steigerwalt A. G., Sulzer K. R., Kaufmann A. F., Rogers F. and

Brenner D. J. 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposal for seven new *Leptospira* species. Int. J. Syst. Bacteriol. **37**: 407- 415.

Zuerner R. L., Knudtson W., Bolin C. A. and Trueba C. 1991. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Microbiol. Pathogen. **10**: 311-322.

VI - ANNEXES

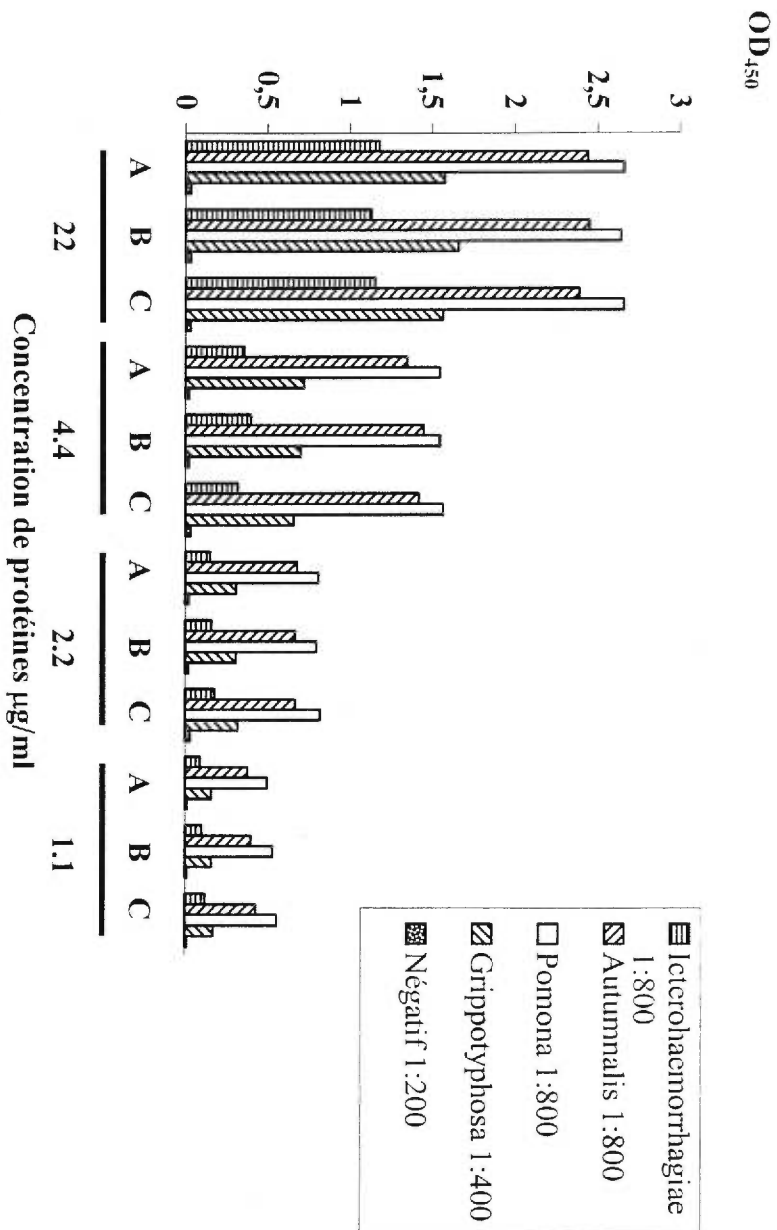


Figure 1. Valeurs de densité optique à 450 nm (OD₄₅₀) obtenues avec une épreuve ELISA indirecte utilisant différentes concentrations d'une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir du sérovar Pomona (A, B et C) et différents sérums de lapin MAT positifs et négatifs.

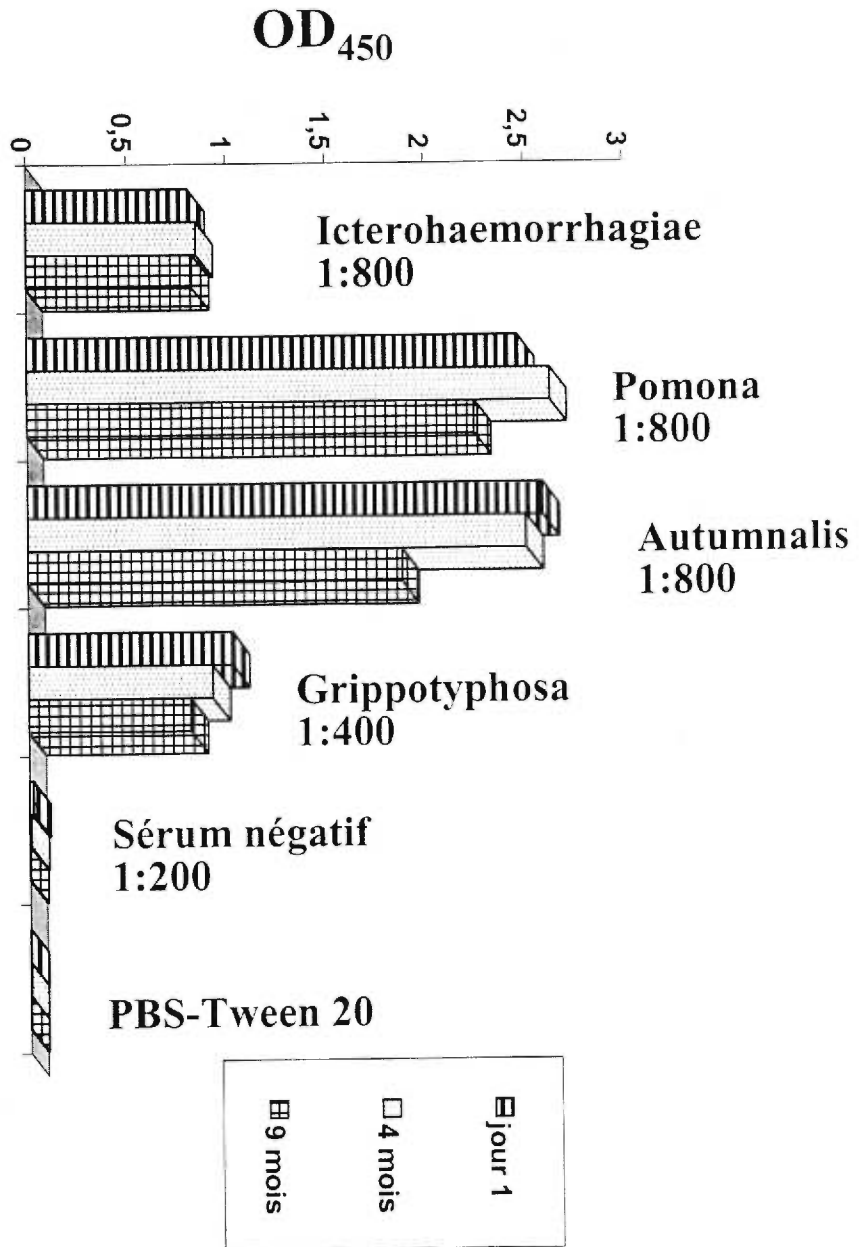


Figure 2. Stabilité de la préparation antigénique produite à partir du sérovar Pomona

Tableau I. Valeurs de densité optique à 450 nm (OD₄₅₀) obtenues avec une épreuve ELISA indirecte utilisant une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir des sérovars Pomona, Bratislava et Icterohaemorrhagiae et différents sérums de lapin .

Sérum de lapin	Préparation antigénique		
	Pomona	Icterohae- morrhagiae	Bratislava
22 µg/ml			
Icterohaemorrhagiae			
1:200	1.54	3.34	1.74
Pomona			
1:200	2.78	1.84	1.92
Grippotyphosa			
1:200	1.65	2.4	1.01
Autumnalis			
1:200	2.61	3.04	1.08
Bratislava			
1:200	0.5	0.7	3.2
Sérum négatif			
1:200	0.01	0.04	0.02

Table II. Distribution des valeurs de densité optique à 450 nm (OD_{450}) obtenues avec une épreuve ELISA indirecte utilisant une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir du sérovar Pomona et différents sérums de chien MAT positifs et négatifs.

OD_{450}	No. of sérums MAT-négatifs ^a	No. of sérums MAT-positifs ^b
$\geq 0.29-0.399$	0	0
0.4-0.799	6	6
0.8-1.199	1	1
1.2-1.599		3
1.6-1.999		1
2-2.399		1
2.4-2.799		4
2.8-3.199		1
3.2-3.599		1
3.6-3.999		3
Total (N)	7	21

^aSérums de chien MAT négatifs à une dilution de 1:100 envers les sérovary Pomona, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Grippyotyphosa, Autumnalis and Bratislava.

^bSérums de chien MAT positifs à une dilution de 1:100 envers un ou plusieurs sérovary.

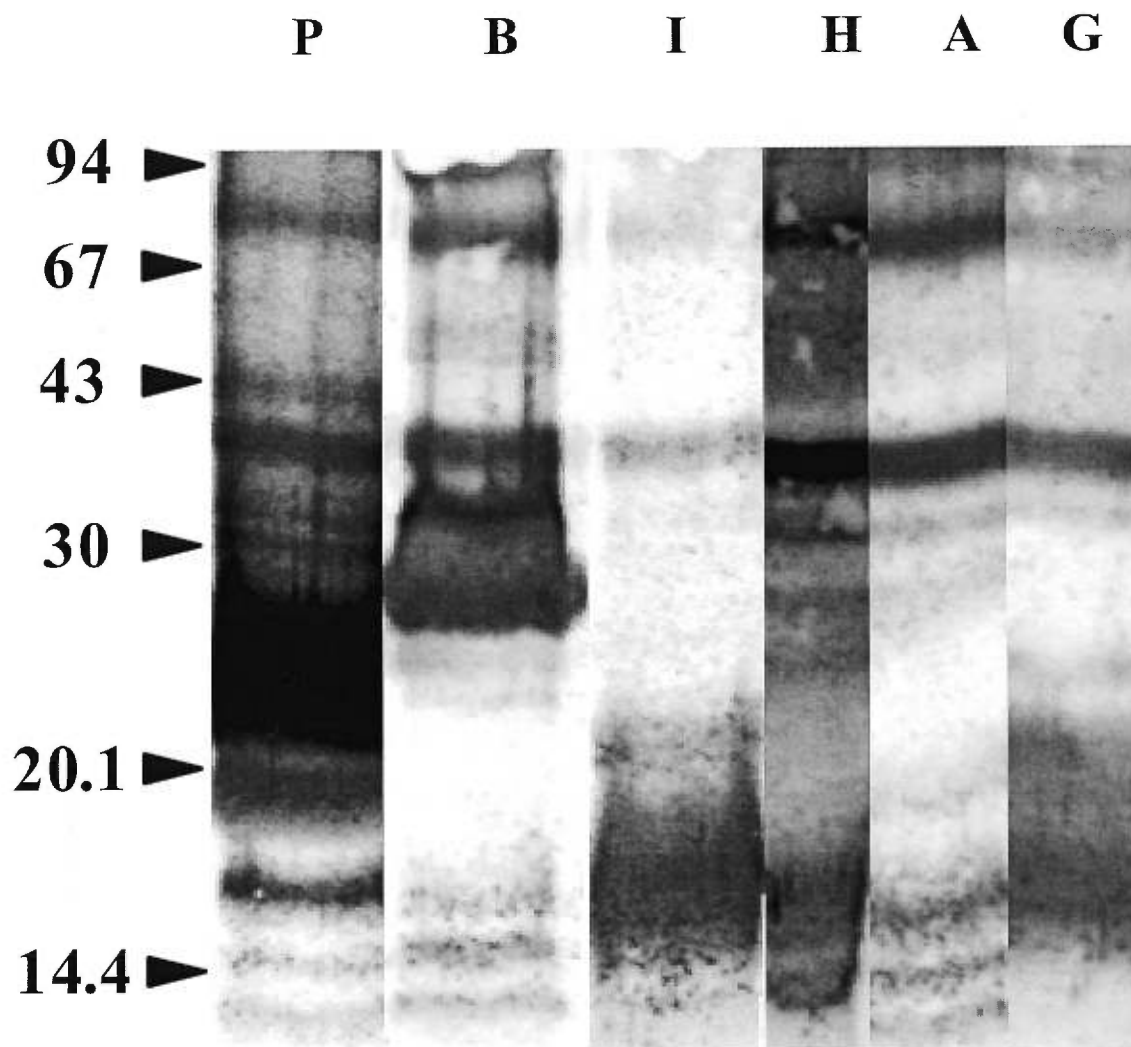


Figure 3. Immunotransfert d'une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir des sérovars Pomona (P), Bratislava (B), Icterohaemorrhagiae (I), Hardjo (H), Autumnalis (A) et Grippotyphosa, séparée par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide) et mise en présence du sérum de chien utilisé comme un contrôle positif fort dans le test ELISA. Les positions des standards de poids moléculaires sont indiquées à gauche.

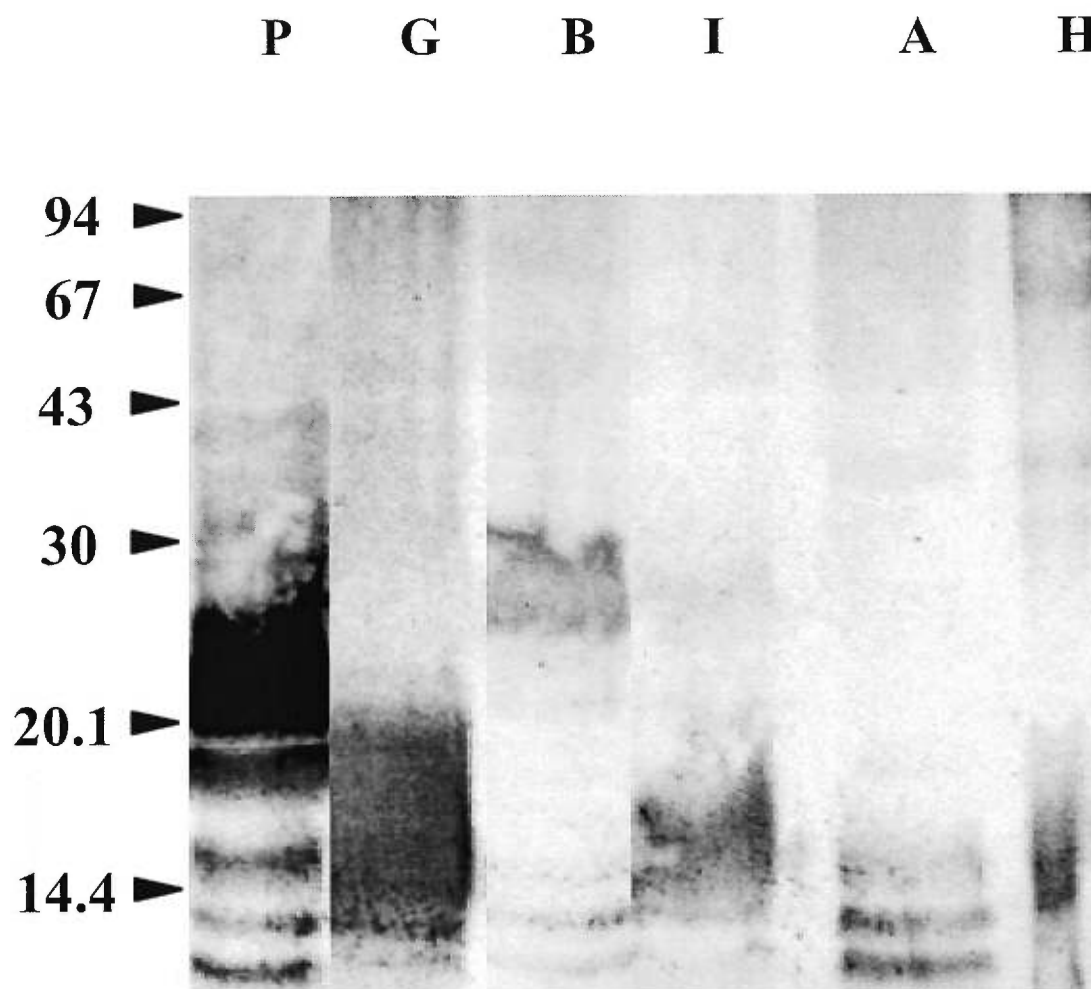


Figure 4. Immunotransfert d'une préparation antigénique stable à la chaleur et produite à partir des sérovars Pomona (P), Grippotyphosa (G), Bratislava (B), Icterohaemorrhagiae (I), Autumnalis (A) et Hardjo (H), séparée par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide) et mise en présence du sérum de lapin anti-Pomona. Les positions des standards de poids moléculaires sont indiquées à gauche



*Canadian Journal of **Veterinary Research***
*Revue Canadienne de **Recherche Vétérinaire***



339, rue Booth Street, Ottawa, Ontario K1R 7K1
Tel: (613) 236-1162 Fax: (613) 236-9681

Dr. Robert Higgins,
GREMIP,
Dept de pathologie et microbiologie,
FMV - Université de Montréal,
C.P. 5000,
St-Hyacinthe, QC,
J2S 7C6.

November 22, 1999

Dear Dr. Higgins,

I am pleased to tell you that your manuscript 99-29; 'Development of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antileptospiral Antibodies in Dogs' has been accepted for publication in the Canadian Journal of Veterinary Research. Galley proofs will be sent to you in due time and these should be carefully checked and then returned as quickly as possible.

Yours truly,



Eva Nagy, DVM, PhD
Editor, CJVR
Dept. of Pathobiology,
Ontario Veterinary College,
University of Guelph,
Guelph, Ont.
N1G 2W1
Canada
Telephone: 519-824-4120 (4783)
FAX: 519-824-5930

