

2/000 1046

REPUBLIQUE Du SENEGAL

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR.
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

SECRETARIAT D'ETAT A LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

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

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

EPREUVE IMMUNOENZYMOLOGIQUE SUR ANTIGENES FIGURES.
VALEUR DE LA TECHNIQUE PAR IMMUNOPEROXYDASE
INDIRECTE DANS LE DEPISTAGE DE LA TRYPANOSOMIASE
BOVINE

Par S.M. TOURE*, V. CODJA** et M. SEYE*
(avec la collaboration technique de
Mlle T. DIEYE" et M. MBENGUE*)

REF. N° 095/PARASITO.
JUILLET 1981. .

EPREUVE IMMUNOENZYMOLOGIQUE SUR ANTIGENES FIGURES.
VALEUR DE LA TECHNIQUE PAR IMMUNOPEROXYDASE
INDIRECTE DANS LE DEPISTAGE DE LA TRYPANOSOMIASE
BOVINE

Par S.M. TOURE*, V. CODJA** et M. SEYE*
(avec la collaboration technique de
Mlle T. DIEYE" et M. MBENGUE*)

INTRODUCTION

Dans une note antérieure (6), nous avons signalé les difficultés d'application pratique, en Afrique, sur une vaste échelle, de la technique de diagnostic et de dépistage des maladies parasitaires par immunofluorescence indirecte : chéreté des microscopes utilisant l'éclairage à ultraviolet et, partant, restriction de leur utilisation aux seuls laboratoires des grandes villes disposant en permanence de certaines commodités. Heureusement, la technique d'immunopéroxydase indirecte, telle que décrite et appliquée par CAILLIEZ et collaborateurs (1977) (1), et qui utilise un éclairage ~~cou-~~mn-t, permet de pallier les inconvénients de l'immunofluorescence indirecte, sans rien perdre en spécificité. Elle a même l'avantage de permettre une lecture plus rapide et moins subjective des réactions. Les deux techniques ont été essayées dans l'étude de sérums de bovins Ndama suspects de Trypanosomiase et de zébus tout à fait indemnes (6). Les Ndama suspects ont souvent présenté des réactions positives à des dilutions élevées (1/1280), aussi bien en immunofluorescence qu'en immunopéroxydase indirecte ; par contre, aucun zébu n'a donné de réaction positive, avec les deux méthodes, entre les dilutions 1/320 et 1/1280.

Après ces épreuves concluantes, nous avons voulu pousser les investigations en étudiant des sérums récoltés par l'un de nous en République populaire du Bénin (2). Deux groupes de sérums ont été analysés par les deux techniques pour confirmer la fiabilité, et la concordance des résultats ; d'autres lots l'ont été uniquement par immunopéroxydase, pour évaluer cette fois son intérêt dans le dépistage rapide de la Trypanosomiase bovine,

.../...

* Institut sénégalais de Recherches agricoles - Laboratoire national de l'Elevage et de Recherches vétérinaires B.P. 2057 - DAKAR-HANNI (Sénégal).

** Ecole inter-Etat des Sciences et Médecine vétérinaires, Université de DAKAR (Sénégal).

-MATERIEL ET METHODES

L'antigène figuré est constitué par un stock de *Trypanosoma brucei* *brucei* KARANG/67/LNERV/-, passé sur Souris et récolté pur par filtration du sang sur DEAE-cellulose selon la méthode de LANHAM (4). Après concentration par centrifugation, les *Trypanosomes* sont étalés sur lames et fixés à l'acétone, puis des cercles sont délimités sur les lames. Ensuite les étapes particulières à chaque technique ont été suivies.

- 1 - L'immunofluorescence est pratiquée selon les techniques devenues classiques (3). Le conjugué utilisé dans les épreuves est un antisérum total d'immunoglobulines bovines préparé sur Lapin et conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (préparations réalisées au laboratoire même).
- 2 - Pour l'immunopéroxydase indirecte la technique est précisément celle décrite par CAILLIEZ. Elle comporte les étapes principales suivantes :
 - dilution des sérums en tampon de Coons (*) ;
 - réaction antigène figuré - anticorps, pendant 60 minutes, à la température ambiante ;
 - lavage 10 minutes par le tampon de Coons ;
 - réaction, pendant 60 minutes, avec un sérum de lapin anti-immunoglobulines bovines conjugué à la peroxydase (**) et dilué à 1/50 ;
 - lavage 10 minutes par le tampon de Coons ;
 - révélation par le réactif de Graham-Karnowsky pendant 15 minutes (***) ;
 - lavage à l'eau distillée ;
 - montage en milieu glycérolé et examen au microscope en lumière blanche, en utilisant un objectif G x 25 (Leitz).

* Tampon de Coons, pH 7,2, soit : Véronal sodique 20,6 g ; sodium chlorure : 85 g ; acide chlorhydrique 1 N : 80,6 mg ; eau bidistillée : qsq 5 l. Au moment de l'emploi ce tampon est dilué à parties égales avec l'eau distillée et on ajoute 0,3 p.100 d'albumine bovine.

** Miles Ltd.

*** Réactif de Graham-Karnowsky: diamidino-3,3' - benzidine (tétrachlorhydrate) : 100 mg ; tampon Tris - HCl à pH 7,6 : 200 ml ; eau oxygénée à 10 volumes : 2 ml.

Lorsque les réactions sont positives, les Trypanosomes apparaissent sous une coloration brun rosâtre très franche.

Les sérum proviennent d'animaux trypanotolérants au sens large, appartenant à des éleveurs privés ou à des fermes d'Etat et ils sont divisés selon les races (Borgou, Lagunaire, Somba, Pabli) et selon qu'ils sont régulièrement traités par trypanocides (donc a priori indemnes) ou traités occasionnellement, voire pas du tout (donc a priori plus ou moins parasités).

RESULTATS

Ils seront résumés sous forme de tableaux commentés.

1 - Différences entre bovins Borgou parasités ou non parasités

Des sérums de bovins de race Borgou, de la localité d'Okpara, ont été répartis en deux lots : ceux appartenant à des animaux réellement trypanosomés (analyses parasitologiques positives dans l'une de ces trois techniques : hématocrite, frottis, goutte épaisse) et ceux appartenant à des animaux réellement négatifs (par ces mêmes techniques) parce que régulièrement traités. Les positifs hébergent *T. vivax* ou *T. congolense* ou une infection mixte. Voici les résultats.

Tableau 1 : Comparaison entre Borgou positifs et négatifs.

B	Tests	N	nég	* 20	* 80	* 160	* 320	* 640	* 1 280	* 2 560	5120	MGTR
+	IFI	23	0	2	2	3	1	3	13		8	814,5
	IPI	23	0	1	0	0	1	0	2	1	18	3 028
-	I R 2 5		2	6	3	7	2	2	2	1	0	95,45
	IPI	25	5	4	2	1	5	2	0	0	6	109,7

ABREVIATIONS

B + (Borgou positifs) ; B - (Borgou négatifs) ; N (nombre de sérums) ; nég (négatifs) ; * (titres réciproques) ; MGTR (moyenne géométrique des titres réciproques, définie par ailleurs) (5) ; IFI (immunofluorescence indirecte) ; IPI (immunopéroxydase indirecte).

11 apparaît très nettement que les bovins qui hébergent des Trypanosomes réagissent assez fortement par rapport aux bovins négatifs. De plus, lorsque les dilutions sont poussées, l'immunopéroxydase indirecte l'emporte très largement (MGTR de 3 028 contre 814,5 à l'immunofluorescence).

2 - Etat de bovins Borgou traités au bromure d'homidium mis atteints de Trypanosomiase

L'évaluation de ces bovins est faite uniquement par IPI (tableau n° 2).

Tableau 2 : Borgou traités par l'homidium (Ethidium)

Test	N	neg	20*	80"	160"	320"	640 *	1 280*	2 580	5 120*	MGTR
IPI	14	1	0	2	2	2	2	0	0	5	468,0

Ces animaux traités par le bromure d'homidium sont redevenus parasitémiques seulement deux semaines après le traitement. Le niveau des anticorps, en comparaison avec ce qui précède, apparaît moyen.

3 - Etat de bovins Lagunaires de différentes localités et suivant des traitements différents (tous tests d'après la méthode d'immunopéroxydase indirecte) : tableau n° 3.

Tableau 3 : Lagunaires suivant des situations différentes

Localités	N	neg	20*	80"	160*	320*	640"	1280"	2560"	5120"	MGTR
Kpinnou (1)	13	0	0	0	1	1	5	1	3	2	1 091
Samiondji(2)	14	0	1	4	4	1	1	0	1	2	262,5
Bohicon (3)	13	0	1	3	1	3	0	0	3	2	440,6
Porto-Novo(4)	13	0	2	2	3	2	1	0	0	3	287,6

(1) Traitement par isométymidium 2 mois avant analyses.

(2) Traitement régulier par isométymidium.

(3) Irrégulièrement traités : 9 trypanosomés sur les 13.

(4) Animaux négatifs, irrégulièrement traités.

Il y a plusieurs explications possibles à ces résultats : persistance d'anticorps dans le premier cas, disparition d'anticorps dans le second, Trypanosomiase réelle dans le troisième. Il est à noter que ces animaux qui sont des taurins vrais ont des réactions moins nettes que les Borgou qui sont, en fait, des croisements entre taurins et zébus. Il est possible que les IgM soient les fractions qui renforcent la positivité des réactions chez les Borgou.

- 4 - Des analyses réalisées sur 30 bovins Somba (de Natitingou) et 12 Pabli (de Kérou) n'ont pas donné de résultats vraisemblables : altération de réactifs ?

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans ces analyses, des situations différentes conduisent à des résultats que seule une connaissance d'autres faits permet d'interpréter valablement. C'est d'ailleurs l'inconvénient des méthodes sérologiques qui sont le plus souvent insuffisantes en elles-mêmes. Nous voyons que lorsque les animaux sont réellement parasités, les réactions sont fortes. Des lectures de réactions positives sont possibles à des dilutions très élevées (1/2560 et 1/5120). En immunofluorescence, le nombre de sérum qui réagissent à ces dilutions élevées est nettement inférieur. Dans la plupart des cas, l'échelle de positivité est large et dépasse le seuil 1/320. C'est qu'en effet il s'agit de sérums provenant d'animaux qui à un moment ou un autre ont hébergé des Trypanosomes, à la différence de zébus vivant dans des zones non infestées en Glossines. Les épreuves réalisées montrent que les métis (Borgou) réagissent souvent plus fortement que les taurins vrais.

Les lectures des lames, en immunopéroxydase indirecte, sont assez rapides et la spécificité de la méthode rend possible de pousser les dilutions, tout en obtenant des réactions très franches.

On retient comme substrat chromogène qui donne des réactions indubitables le diamidino-3,3' benzidine tétrachlorhydrate. D'autres substrats utilisés en immunoenzymologie ont été essayés : acide amino 5 salicylique, orthodianisidine, orthotolidine, mis sans bons résultats ; en particulier, l'orthodianisidine donne des colorations indiscriminées même là où l'on ne devait voir aucune réaction.

L'immunopéroxydase, comme l'immunofluorescence, fait appel à des réactifs coûteux ; la première technique est certainement plus économique du fait que les conjugués sont plus dilués. Les lames spéciales vendues actuellement pour ces réactions sont trop chères pour des analyses vétérinaires de routine (90 à 100 francs CFA une seule lame !) et il est certainement préférable d'utiliser des lames ordinaires et de réaliser artisanalement les cercles par du vernis à ongle.

Malgré tout, nous ne voyons pas encore l'opportunité d'utiliser cette technique sur le terrain, bien qu'elle soit très simple dans son principe. Les services vétérinaires africains sont démunis matériellement et manquent encore de cadres pour les diagnostics de routine, Il faut un minimum de matériel et un minimum de précautions (conservation des réactifs) pour prétendre réussir ce test.

.../...

R E S U M E

Le test d'immunopéroxydase indirecte utilisant des antigènes figurés sur lames permet de déceler la Trypanosomiasse bovine avec une sensibilité supérieure à celle de l'immunofluorescence indirecte. Ce test a été appliqué dans l'étude sérologique de bovins de la République populaire du Bénin, bien connus quant à leur état parasitémique. Les résultats obtenus confèrent à la technique par immunopéroxydase indirecte des avantages réels par rapport à l'immunofluorescence : en particulier utilisation d'un éclairage ordinaire pour les lectures au microscope et possibilité d'analyser des sérums à des dilutions très élevées, tout en obtenant des réactions franches. Des lots de sérums de races bovines trypanotolérantes placées dans différentes situations ont été étudiés et les résultats discutés.

S U M M A R Y

IMMUNOENZYME TEST USING ENTIRE ANTIGENIC FIGURES.
VALUE OF THE INDIRECT IMMUNOPEROXYDASE TECHNIQUE
IN DETECTING BOVINE TRYPANOSOMIASIS

The indirect immunoperoxydase test performed by using as antigens entire parasites on slides allows the detection of bovine Trypanosomiasis with higher sensitivity than by the indirect fluorescent antibody test (IFT). Applications were made in a serological survey of cattle from the Popular Republic of Benin. The parasitemic status of the animals was first fairly defined. The results showed that the indirect immunoperoxydase technique had high advantages when compared with the IFT. The use of ordinary light for microscopic readings is of high interest. In addition it is possible to analyse sera at very high titer and still gain true reactions. Batches of sera from trypanotolerant cattle placed in different situations were analysed and the results discussed.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - CAILLIEZ (M.), POUPIN (F.) et al. - Valeur comparée de l'immunofluorescence et de l'immunocenzymologie sur antigène figuré dans le diagnostic immunologique des Trypanosomiasés africaines. Bulletin de la Société de Pathologie exotique, 1977, 70 (4) : 391-398.
- 2 - CODJA (V.) - Trypanotolérance et immunité. Recherches sur les taurins de la République populaire du Bénin. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole inter-Etats des Sciences et de Médecine vétérinaires, Dakar, 1981, publication n° 11.
- 3 - KAWAMURA (A.) - Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press, Tokyo, 1977, 2 nd edition.
- 4 - LANHAM (S.M.) - The separation of trypanosomes from blood on anion-exchange columns - Trans. Royal Society trop. Med. Hyg., 1968, 62 (1) : 4-5.
- 5 - TOURE (S.M.), SEYDI (M.) et al. - Valeur de la méthode d'immunofluorescence indirecte dans le diagnostic des Trypanosomiasés bovines et leur étude épizootiologique. Rev.Elev.Méd.vét. Pays trop., 1975, 28 (4) : 463-472,
- 6 - TOURE (S.M.) - Comparaison entre l'immunofluorescence indirecte et l'immunoperoxydase indirecte dans l'étude épizootiologique des Trypanosomiasés animales. Afrique médical, sous presse.