

cor.

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT
RURAL ET DE L'HYDRAULIQUE

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

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

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

DAKAR-HANN

ZV00011111

OK

11111

DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE DE LA FASCIULOSE
A E'ASCIOLA GIGANTICA CHEZ LE MOUTON

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CINETIQUE
DES ANTICORPS PAR LA METHODE ELISA

Par

O.T. DIAW, Moh. Mb. SEYE et M. SEYE

Service de Parasitologie

L.N.E.R.V.

REF. N°017/PATHO.ANIM.

MAI 1992.

RESUME

L'objet de cette étude a été d'expérimenter le test ELISA utilisant un antigène métabolique excrétion-sécrétion dans le diagnostic de la Fasciolose à **Fasciola gigantica** chez le mouton. Pour ce faire, deux agneaux âgés chacun de 3 mois et 15 jours ont été utilisés.

Ces agneaux ont reçu séparément par la voie orale, $\approx$ 300 métacercaires issues de Lymnées infestées en laboratoire.

Le suivi de ces animaux, du début de l'expérience jusqu'à leur mort naturelle, a été effectué par une série de prélèvements coprologique et sérologique .

Les analyses coprologiques se sont révélées négatives tandis que la sérologie a permis de déceler les premiers anticorps **anti-Fasciola gigantica** dès la 4ème semaine après infestation.

A l'autopsie, des douves adultes et immatures ont été récoltées successivement sur le premier et le second agneau.

Les résultats ainsi ressortis de ce premier test montrent donc que le diagnostic par la méthode ELISA est plus sensible que la coprologie et permet le dépistage précoce de la fasciolose à **Fasciola gigantica** chez le mouton.

MOTS-CLES

Fasciola gigantica - Distomatose - Infestation - Diagnostic - Coprologie - ELISA - Ovin - Sénégal.

I. INTRODUCTION

Le diagnostic anté-mortem de la fasciolose chez les animaux en vue de dégager des mesures de lutte efficace et surtout de contrôle continu approprié pose encore des difficultés quant à l'identification précise de cette maladie.

La seule méthode utilisée jusqu'ici et basée sur la coprologie recèle encore des insuffisances en ce sens que les premiers oeufs ne peuvent être clairement détectés qu'à partir du 3^e mois d'infestation période à laquelle les vers ont atteint déjà leur stade de développement adulte. Une technique plus sensible et permettant de déceler à titre précoce les tous premiers signes de la maladie s'avère donc nécessaire : tests sérologiques (4) (5). A cet effet, il existe déjà un test sérologique par la méthode ELISA qui permet de mettre en évidence l'apparition des premiers anticorps anti-fasciolaens chez des animaux malades dès la 3^e semaine d'infestation.

Ce test a été utilisé chez des moutons d'expérience suivis en laboratoire du début de leur infestation à leur mort naturelle, et nous a ainsi permis de suivre la cinétique des anticorps.

L'objectif de ce travail était donc de tester la validité de la méthode et de voir la possibilité de son utilisation comme moyen de diagnostic à titre individuel, ou de dépister la présence de la maladie au sein d'un troupeau donné.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Animaux d'expérience et infestation

Deux agneaux mâles âgés chacun de 3 mois et en provenance d'une zone indemne de trématodoses ont été utilisés. Par ailleurs, l'analyse coprologique effectuée au préalable sur ces deux agneaux avant leur infestation a également donné un résultat négatif.

Ces agneaux ont été infestés par la voie orale à partir de métacercaires de *Fasciola gigantica*.

Les métacercaires sont issues de Lymnées d'élevage infestées expérimentalement en laboratoire et suivies jusqu'à la sortie des cercaires qui se sont ensuite enkystées pour donner des métacercaires.

Le premier agneau désigné sous le n°1 a reçu en une seule prise 300 métacercaires âgées de 3 mois et 15 jours, et qui ont été conservées à 4° jusqu'au moment de leur utilisation.

Le second animal désigné sous le n°2 a reçu à peu près le même nombre de métacercaires âgées également de 3 mois et 15 jours mais à la différence que ces métacercaires avaient subi un choc thermique de courte durée (congélation involontaire survenue au cours du temps de conservation).

2. Prélèvements de fécès et de sang pour analyses (voir tableau de prélèvements)

a) Prélèvements de fécès et analyses coprologiques

Pendant le suivi des animaux, des prélèvements de fécès suivis d'analyses coprologiques ont été effectués avant infestation d'abord, ensuite au rythme d'un prélèvement par semaine à partir de la 3^e ayant suivi l'infestation.

b) Prélèvements de sang et épreuves sérologiques

Des prélèvements de sang individuels en vue de la récolte de sérums destinés aux tests sérologiques ont été également faits avant infestation d'abord (étape J 0-1) ensuite le jour même de l'infestation (étape J0) et enfin une fois par semaine jusqu'à la mort naturelle des animaux (étapes J0+ 1, J 0 + 2, J 0 + 3, etc...). Les analyses sérologiques ont été réalisées à partir de la technique ELISA de dosage des anticorps utilisant un antigène métabolique excrétion - sécrétion.

3. Préparation de l'antigène et épreuve ELISA

Des dourves adultes ont été déposées dans une boîte de pétri et laissées pendant 3 heures avec un peu d'eau distillée. Le produit des excrétions - sécrétions a été récolté, ensuite tamisé et centrifugé. Le surnageant a été recueilli puis mis en aliquots après en avoir déterminé le taux de protéines par référence à la table nomographe de E. ADAMS.

TABLEAU N°1 : PRELEVEMENTS DE SANG ET DE FECES

AGNEAU N° 1

Etape	Date	Nature prélèvement	N° prélèvement
Jo - 1 avant infest.	20.2.90	Fécès - sang	22
Jo jour infest.	21.2.90	Fécès - sang	24
Jo + 7 1ère sem.	28.2.90	Sang	26
Jo + 14 j 2ème sem.	7.3.90	Sang	28
Jo + 21 j 3ème sem.	14.3.90	Sang + fécès	30
Jo + 28 j 4ème sem.	21.3.90	Sang + fécès	32
Jo + 35 j 5ème sem.	28.3.90	Sang + fécès	34
Jo + 42 j 6ème sem.	3.4.90	Sang + fécès	36
Jo + 49 j 7ème sem.	10.4.90	Sang + fécès	38
Jo + 56 j 8ème sem.	17.4.90	Sang + fécès	40
Jo + 62 j 9ème sem.	24.4.90	Sang + fécès	42
Jo + 70 j 10ème sem.	2.5.90	/Sang + fécès	44
Jo + 77 j 11ème sem.	9.5.90	Sang + fécès	46
Jo + 84 j 12ème sem.	16.5.90	Sang + fécès	47
Jo + 91 j 13ème sem.	23.5.90	Sang + fécès	48
Jo + 98 j 14ème sem.	30.5.90	Sang + fécès	49

AGNEAU N°2

Etape	Date	Nature prélèvement	N° prélèvement
Jo - 1 avant infest.	20.2.90	Fécès - sang	23
Jo jour infest.	21.2.90	Fécès - sang	25
Jo + 7 j 1ère sem.	28.2.90	Sang	27
Jo + 14 j 2ème sem.	7.3.90	Sang	29
Jo + 21 j 3ème sem.	14.3.90	Sang + fécès	31
Jo + 28 j 4ème sem.	21.3.90	Sang + fécès	33
Jo + 35 j 5ème sem.	28.3.90	Sang + fécès	35
Jo + 42 j 6ème sem.	3.4.90	Sang + fécès	37
Jo + 49 j 7ème sem.	10.4.90	Sang + fécès	39
Jo + 56 j 8ème sem.	17.4.90	Sang + fécès	41
Jo + 62 j 9ème sem.	24.4.90	Sang + fécès	43
Jo + 70 j 10ème sem.	2.5.90	Sang + fécès	45

Deux dilutions de sérums ont été testés pour les épreuves sérologiques : une dilution au 1/100 et une dilution au 1/1000 avec une concentration unique du conjugué à la peroxydase dilué au 1/5000 et de l'antigène titrant 6 mg/ml utilisé à raison de 10 µg/ml.

Les sérums de référence ayant servi pour la réalisation de ces tests sont ceux récoltés sur l'agneau n°1 avant infestation pour le négatif et à la veille de la mort pour le positif.

III. RESULTATS

1. Agneau n°1

a) Coprologie

La présence d'oeufs de douve n'a pas été constatée pour l'ensemble des analyses coprologiques et la mort de l'animal est intervenue 132 jours après infestation soit à la 14ème semaine.

A l'autopsie, 39 douves adultes entières ont été récoltées au niveau du foie et on a pu également déceler la présence d'oeufs dans le parenchyme hépatique.

b) Sérologie (cf. graphique)

Dilution au 1/100

L'apparition des anticorps est intervenue dès la 3ème semaine ayant suivi l'infestation. Cependant, la courbe des densités optiques a connu une ascension dès la 1ère semaine, marquée ensuite par de légères baisses constatées à la 2è et à la 10è semaine. Le premier pic a été atteint à la 11è semaine mais la valeur de la densité optique la plus élevée a été enregistrée à la veille de la mort de l'animal soit 14 semaines après l'infestation.

.../...

TABLEAU N°2 : DENSITES OPTIQUES

Période	N° prélèvement	Mouton n°1		N° prélèvement	Mouton n°2	
		d.o.au 1/100	d.o. au 1/200		d.o. au 1/100	d.o. au 1/200
Jo + 1 Jo	22	0,073	0,052	23	0,091	0,074
Jo + 7 1ère semaine	24	0,102	0,056	25	0,077	0,056
Jo + 14 2ème semaine	26	0,072	0,055	27	0,079	0,071
Jo + 21 3ème semaine	28	0,104	0,090	29	0,093	0,070
Jo + 28 4ème semaine	30	0,210	0,150	31	0,185	0,075
Jo + 35 5ème semaine	32	0,249	0,213	33	0,229	0,175
Jo + 42 6ème semaine	34	0,301	0,247	35	0,263	0,191
Jo + 49 7ème semaine	36	0,351	0,309	37	0,264	0,224
Jo + 56 8ème semaine	38	0,369	0,317	39	0,279	0,243
Jo + 62 9ème semaine	40	0,398	0,326	41	0,269	0,243
Jo + 69 10ème semaine	42	0,432	0,317	43	0,319	0,259
Jo + 76 11ème semaine	44	0,497	0,380			
Jo + 83 12ème semaine	45	0,450	0,386			
Jo + 90 13ème semaine	46	0,460	0,403			
Jo + 97 14ème semaine	47	0,523	0,417			

. Dilution au 1/200

La même ascension de la courbe des densités optiques *est* apparue, mais les valeurs enregistrées sont plus faibles pour les mêmes sérums dilués au 1/100. Le premier pic est observé à la 9^e semaine et la valeur de la densité optique la plus élevée se situe également à la veille de la mort de l'animal.

2. Agneau n°2

L'agneau n°2 n'a, quant à lui, survécu que pendant 74 jours seulement. A l'autopsie, 56 douves immatures ont pu être prélevées au niveau du foie mais aucun oeuf n'a été observé à l'examen microscopique du parenchyme hépatique.

a) Coprologie

Aucun oeuf n'a été rencontré au cours des examens coprologiques effectués pendant l'expérience.

b) Sérologie (cf. graphique)

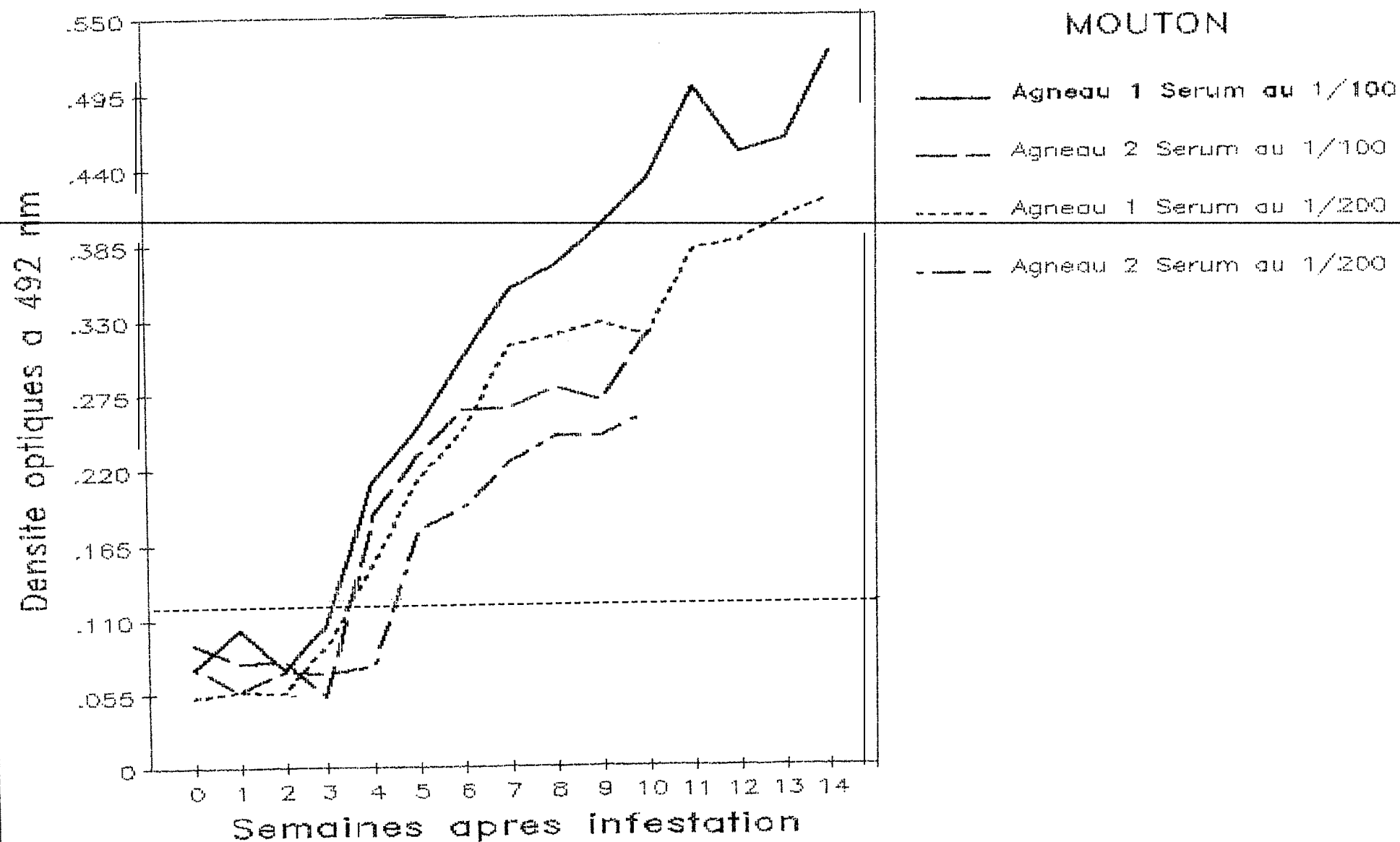
. Dilution au 1/100

Les premiers anticorps apparaissent à la 4^e semaine et le premier pic est atteint à la 6^e semaine soit deux semaines après. Comme précédemment, le maximum de la valeur des densités optiques s'observe à la veille de la mort de l'animal correspondant à la 10^e semaine après infestation et cette valeur se rapproche de celle du sérum de l'agneau n°1 à la même période mais à une dilution au 1/200.

. Dilution au 1/200

Les valeurs des densités optiques ont évolué de la même manière que pour les épreuves précédentes et le pic se situe à la 8^e semaine. On note cependant une baisse de la réponse immunitaire de l'agneau n°2 dont les valeurs des densités optiques de la dilution au 1/100 sont plus faibles que celles de l'agneau n°1 à la même dilution et se rapprochent plutôt des valeurs des densités optiques de la dilution au 1/200 de ce même agneau.

GRAPHIQUE : RESULTATS SEROLOGIQUES AVANT ET APRES INFESTATION



IV. DISCUSSION

Ce test permet de déceler la présence des anticorps **anti-Fasciola**. Son intérêt majeur est la détection très précoce de ces anticorps dès la 3^e semaine d'infestation.

Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Chantal BOULARD (1) (2).

Par ailleurs, on constate qu'il y a des différences au niveau des deux agneaux en ce qui concerne les réactions aux infestations (réceptivité et réaction sérologique).

Chez l'agneau n°1, les anticorps sont plus précoces (3^e semaine) que chez l'agneau n°2 (4^e semaine). Ce dernier est mort plus rapidement (74^e jours) avec 56 doutes immatures et le premier (132^e jours) avec 39 doutes adultes.

Ces différences sont dues soit à un simple phénomène de comportement individuel comme le soulignent SANTIAGO et HILLYER (3), soit à une virulence atténuée de la souche infestante du n°2 qui a subi un léger choc thermique. Une étude répétée de cette infestation, avec un plus grand nombre d'animaux, permettra d'élucider ce problème.

V. CONCLUSION

Les résultats ressortis de ce premier test montrent en effet que la technique ELISA utilisant un antigène métabolique excrétoire - sécrétoire peut valablement être utilisée dans le dépistage précoce des anticorps anti-Fasciola **gigantica** chez le mouton.

Cependant, un test de spécificité de la réaction antigène-anticorps de **Pasciola gigantica** devra être envisagé en vue d'une meilleure connaissance sur l'existence ou non de réactions croisées avec les autres trématodoses.

.../...

Une étude beaucoup plus poussée et élargie à une plus grande échelle permettrait également de déterminer toutes les limites d'utilisation pratique de ce test.

La réalisation de tels objectifs pourrait donc servir dans l'organisation et la mise en place de moyens de contrôle et de lutte appropriés contre cette parasitose.

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

1 - BOULARD (C.), BOUVRY (M.) et ARGENTE (G.)

Comparaison de la détection des foyers de Fasciolose par test ELISA sur lacto-sérum et sérum par coproscopie.

Ann. Rech. Vét., 1985, 16 (4) ; 363-368.

2 - BOULARD (C.) et REGNAULT (A.)

L'immunodiagnostic de la Fasciolose bovine par la technique ELISA.

G.T.V., 1989, 1-B - 337, 58-68.

3 - SANTIAGO (N.), HILLYER (G.V.)

Antibody profiles by EITB and Elisa of cattle and sheep infected with **Fasciola hepatica**.

J. Parasit., 1988, 74 (5) ; 810-818.

4 - SINCLAIR (I.J.) et WASSAL (D.A.)

Sero-diagnosis of **Fasciola hepatica** infections in cattle.

Vet. Parasit., 1988, 27, 283-290.

5 - WESCOTT (R.B.), FARREL (C.J.), SHEN (D.T.)

Diagnosis of naturally occurring **Fasciola hepatica** infections in cattle with an enzyme. linked immunosorbent assay.

Am. J. Vet. Res., 1983, 45 (1), 178,179.