

REPUBLICQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU **DEVELOPPEMENT** RURAL

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (**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

CONVENTION **AIEA/ISRA N°** 4975 PORTANT
SUR L'UTILISATION DE LA TECHNIQUE
ELISA DE DETECTION DES ANTIGENES
DANS L'ETUDE DE L'INCIDENCE DE
IA TRYPANOSOMIASE ANIMALE
EN ZONE **D'ELEVAGE**
DU DIAKORE
(CROISEMENT **ZEBU NDAMA**)

RAPPORT SUR L'EXECUTION DE LA
PREMIERE PHASE
DECEMBRE 1988 - JUIN 1989

Par

A. DIAITE, **M.** SEYE, A. **MANE**
ET **Mme** T. NDIAYE

REF. **N°24/PARASITO.**
AVRIL 1990.

2V900015

7
2V0000412

02

U.12

**PROGRAMME COORDONNE DE RECHERCHE SUR
"L'UTILISATION DU DIAGNOSTIC ET DE LA
SURVEILLANCE DES TRYPANOSOMIASES
ET AUTRES MALADIES A VECTEURS
BIOLOGIQUES DU BETAIL AFRICAIN
PAR L'USAGE DE METHODES
SERO-IMMUNOLOGIQUES"**

CONVENTION **AIEA/ISRA N°4975** PORTANT SUR
L'UTILISATION DE **LA** TECHNIQUE **ELISA** DE
DETECTION DES ANTIGENES DANS L'ETUDE
DE L'INCIDENCE DE LA TRYPANOSOMIASE
ANIMALE EN ZONE D'ELEVAGE
DU DIAKORE
(CROISEMENT ZEBU-NDAMA)

RAPPORT SUR L'EXECUTION DE LA PREMIERE **PHASE**
DECEMBRE 1988 - JUIN 1989

Par

A.DIAITE, M.SEYE, A.MANE et Mme **T.NDIAYE**

INTRODUCTION

La région Centre-Sud du Sénégal possède d'abondants pâturages où vivent des zébus sensibles à la trypanosomiase et des Ndamo trypanotolérants. Le produit du croisement de ces deux races, le Djakoré, possède également un certain degré de tolérance.

Dans cette région essentiellement agricole, le Djakoré est largement utilisé pour la traction animale, avec cependant les contraintes résultant de la présence des tsé-tsé.

Le manque de moyens appropriés de diagnostic a conduit à un usage abusif des trypanocides, avec, probablement, apparition de souches de trypanosomes chimie-résistantes.

.../...

En conséquence, il s'est avéré nécessaire de doter l'ISRA d'une technique performante et fiable, qui permette un diagnostic spécifique de la trypanosomiase bovine. C'est l'objet de la présente convention.

Une enquête préliminaire, effectuée en décembre 1988, avait permis de localiser les sites expérimentaux et de choisir les animaux cibles, en fonction de la présence des glossines. Les détails de cette enquête figurent dans le rapport ponctuel du premier trimestre. Le présent rapport comporte un bref rappel des données de base, puis les résultats des analyses protozoologiques, hématologiques, coprologiques et sérologiques.

Ces résultats sont ensuite discutés pour en tirer les premières conclusions.

I. MATERIEL ET METHODES

1.1 - Sites expérimentaux - Animaux cibles

Les villages de Karang (16°25 Ouest - 13°35 Nord) et de Keur Aliou GUEYE (16°25 Ouest - 13°45 Nord) ont été retenus.

Ces deux villages sont limitrophes de forêts classées infestées par **Glossina morsitans submorsitans**, avec une densité plus élevée à Karang.

La pluviométrie y est souvent abondante (800 à 1 000 mm) et la saison des pluies y dure généralement 4 mois (de juin à septembre).

Dans chacun de ces deux villages, 20 bovins zébu Ndama ont été choisis et numérotés à l'oreille.

Ces 40 animaux se répartissent comme suit :

- 5 mâles âgés de 1 à 3 ans,
- 35 femelles de 2 à 9 ans.

Par souci de simplification, nous avons dénommé "prélèvements de Sokone (SK)" les échantillons sériques recueillis dans ces deux villages, Sokone étant l'agglomération urbaine la plus proche.

*

.../...

Les investigations ont porté également sur des zébus vivant à Dahra (15°50 Ouest - 1 5°20 Nord), une zone indemne de glossines. Là aussi, 40 bovins appartenant à l'ISRA sont prélevés et servent de témoins négatifs pour les épreuves sérologiques.

1.2 - Prélèvements - Analyses - Traitements

Sur chacun des 40 bovins de la zone à glossines, les prélèvements et analyses ci-dessous ont été faits, à raison d'une mission par mois, sauf au mois d'avril où des contraintes internes ont empêché le déplacement.

- Sang périphérique en tubes capillaires (2 tubes par animal), centrifugation sur place et lecture du P.C.V. ;
- lecture de la parasitémie éventuelle de l'interphase ;
- confection de frottis ; coloration et lecture au laboratoire ;
- sang jugulaire en tubes vacutainer, centrifugation, récolte du sérum et adjonction de 0,01 p. 100 d'azide de sodium ; stockage à - 20°C jusqu'à l'emploi ;
- épreuve ELISA de détection d'antigènes circulants en suivant le protocole et à l'aide des réactifs FAO/AIEA/ILRAD.
Cette épreuve concerne également les sérums de la zone témoin, récoltés une seule fois, en juin ;
- prélèvement de selles fraîches (tous les 3 mois) et coprologie au laboratoire .
- traitement immédiat des bovins positifs à **Trypanosoma**, au Bérénil, 7 mg/kg, I.M. ;
- traitement anthelmintique des bovins positifs en coprologie ;
- bain anti-tiques des animaux cibles et non-cibles des 4 troupeaux par suite du diagnostic d'**Ehrlichia** bovis sur certains bovins ;
- traitement à la Terramycine Longue Action (T. L.A.) des bovins porteurs d'**Ehrlichia**.

II. RESULTATS PROTOZOOLOCIQUES, **HEMATOLOGIQUES** ET COPROLOCIQUES

2.1 - Trypanosomes

ESPCES	KARANG (forte densité de glossines)					KEUR ALIOU GUEYE (faible densité de glossines)				
	Fréquences parasitaires absolues sur 20 bovins					Fréquences parasitaires absolues sur 20 bovins				
	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Juin	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Juin
T. congolense	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4
T. brucei	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T. vivax	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T. theileri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Les trypanosomes sont rares de janvier à mars, période de saison sèche au Sénégal. S'en suit une hausse de la fréquence de T. **congolense** au mois de juin. C'est le début de la saison des pluies, avec son influence sur la densité des glossines. On note aussi l'absence virtuelle de T. vivax, T. brucei et T. theileri.

2. 2* - Hémoparasites autres que les trypanosomes

Ces parasites se sont montrés relativement rares en cette période de l'année. Theileria **mutans**, Anaplasma marginale, Setaria labiatopapillosa et, dans une moindre mesure, Ehrlichia bovis, ont été quelquefois rencontrés.

2.3 - Hématocrite

LOCALITE	Moyennes mensuelles % de l'hématocrite ± intervalle de confiance à 5 p.100				
	Janvier	Février	Mars	Avril	Juin
Karang	36,85 ± 2,08	36,75 ± 2,29	35,85 ± 2,38	35,20 ± 2,39	non relevé
Keur Aliou GUEYE	34,90 ± 4,18	37,95 ± 2,47	34,10 ± 2,02	33,10 ± 2,42	non relevé

Les moyennes que voilà sont, dans les deux groupes, légèrement fluctuant s'écartant ainsi plus ou moins de la norme raciale de $37,7 \pm 1,2$ p. 100 calculée par FRIOT et CALVET pour les métis zébu - taurins du Sénégal.

2.4 - Coprologie

Les examens coprologiques révèlent de très faibles infestations par des Strongles et des Coccidies.

III. EPREUVES ELISA

3.1 - Technique

Le protocole FAO/AIEA/ILRAD de détection d'antigènes circulants de *T. congolense*, *T. brucei* et *T. vivax* a été suivi. En voici les grandes lignes :

- Sensibilisation de la plaque avec l'anticorps monoclonal spécifique (**T.c.**, **T.b.**, **T.v.**), 100 µl par cupule sauf la rangée verticale 1 servant de "blank".
Scellage, homogénéisation par agitation douce puis incubation 1 nuit au moins à +4°C.
- Rejet de l'anticorps non adsorbé et rinçage rapide de la plaque avec du tampon PBS-tween 80, à 3 reprises. Séchage sur mouchoirs absorbants.
- Distribution de 100 µl de PBS-tween 80 dans chaque cupule sensibilisée, puis adjonction des sérums (témoins et de terrain) à raison de 2 cupules par sérum et à la concentration suivante :
 - . plaques **T.c.** et **T.v.** : 10 µl de sérum dans 100 µl de tampon
 - . plaque **T.b.** : 5 µl de sérum

Scellage, homogénéisation puis incubation 15 minutes à la température du laboratoire (environ 20°C).

- Vidange de la plaque, rinçage puis 2 trempages de 10 mn chacun dans PBS-tween. Séchage sur mouchoirs.

.../...

- Distribution du conjugué spécifique, 100 µl par cupule. Incubation 15 minutes à la température du laboratoire.
- Vidange de la plaque, rinçage puis 3 trempages de 10 mn chacun. Séchage.
- Distribution du révélateur (ABTS) dans toutes les cupules, 100 µl par cupule. Incubation 30 mn à la température du laboratoire et à l'obscurité.
- Lecture directe des résultats par "Multiskan ELISA Reader à 405 nm.

La figure V donné le schéma d'utilisation des plaques.

3.2 - Résultats

Les différents tableaux et figures ci-après donnent l'ensemble des résultats sérologiques, et aussi certains résultats obtenus à l'examen des lames (interphase sur le terrain, frottis au laboratoire).

Un examen utile de ces figures et tableaux suppose la définition préalable d'un seuil de séro-positivité fiable. Le protocole initial fixait ce seuil au double de la densité optique (d.o.) moyenne du témoin négatif. A la pratique, cette procédure s'est avérée aléatoire. Les d. o. des sérums de la zone témoin (à priori négatifs) offrent en effet de très larges dispersions : 0,002 à 0,037 pour **T.c.** ; 0,003 à 0,051 pour **T.b.** ; 0,010 à > 0,100 pour **T.v.** Or, chacun de ces sérums aurait pu en principe servir de témoin négatif, avec alors un seuil de positivité dépendant du seul hasard du choix. C'est pourquoi, au vu des résultats des premiers essais et en accord avec l'ILRAD, le seuil de 0,050 a été retenu.

Sur cette base et concernant les 196 échantillons sériques analysés dans la zone à glossines (SK), nous obtenons :

- Pour **T. congolense** : 2 parasitémies sur 7 confirmées en sérologie, 43 faux séro-positifs (microscopie négative, sérologie positive) et 5 faux séro-négatifs (microscopie positive, sérologie négative). Donc au total 48 sérums

.../...

positifs à **T.c.**, parmi lesquels 12 réagissent également avec l'anticorps **T.b.**, 10 avec **T.v.** et 2 avec les trois anticorps. Ce qui ramène à 21 les cas de séro-positivité monospécifique à **T.c.**

- **T. brucei** n'a pas été visualisé ni sur le terrain, ni sur les lames colorées. Alors que la sérologie en révèle 17 cas, dont 12 réagissent aussi avec **T.c.** Déduction faite des 2 sérums réagissant avec les 3 espèces, on obtient 3 réactions monospécifiques avec **T.b.**
- Pour **T. vivax**, on note 32 séro-positifs, alors que l'examen des lames a été invariablement négatif. 10 sérums parmi ces 32 font aussi des réactions croisées avec l'anticorps **T.c.** Il n'y a pas eu de positivité croisée **T.v. - T.b.** Au total donc 20 sérums positifs monospécifiques à **T.v.**

Pour la zone témoin, sur 40 échantillons on obtient : **T.c.** : 0 ; **T.b.** : 1, soit 2,5 p.100 ; **T.v.** : 5 soit 12,5 p. 100. Il n'y a pas eu de réactions croisées avec ces sérums.

IV. DISCUSSION

L'interprétation de ces résultats doit se faire avec prudence en raison des considérations suivantes :

- a) Par suite de retard dans l'exécution de la convention (initiation du responsable à la technique ELISA et ensuite envoi des réactifs depuis l'ILRAD de Nairobi), le protocole n'a pas été appliqué exactement comme prévu, à savoir traiter les animaux séro-positifs et apprécier l'incidence de ce traitement sur la chute probable de la d.o.
En d'autres termes, la banque de sérum a été constituée avant le début des épreuves sérologiques.
- b) Il n'y a pas une totale concordance entre les résultats des examens parasitologiques et ceux des analyses sérologiques. Deux seulement parmi les 7 cas parasitologiquement positifs à **T.c.** ont été confirmés en sérologie ; de nombreux cas négatifs par les lames sont set-o-positifs. Quelle explication valable donner à cette discordance ?

A notre sens, cela s'expliquerait par le phénomène de variation antigénique propre aux trypanosomes, qui entraîne une fluctuation de la parasitemie chez les animaux qui ont un tant soit peu de résistance.

1. Parasitologie positive, sérologie négative : fausses réactions négatives

Ce phénomène peut apparaître lorsqu'il n'y a pas d'antigènes circulants libres, par suite d'une saturation in vivo des sites antigéniques par les anticorps produits par l'organisme. La réaction ELISA supposant une réaction antigène-anticorps in vitro, celle-ci est compromise lorsque les anticorps monoclonaux n'ont plus de site libre pour se fixer.

2. Parasitologie négative, sérologie positive : fausses réactions positives

On pourrait imaginer ce phénomène se produire dans les cas de faibles parasitemie avec production de quantités encore faibles d'anticorps. La parasitemie peut alors être illisible alors que les antigènes circulants seront décelables. Ces cas seraient donc plus nombreux car pouvant se produire au début de l'infection initiale ainsi qu'au début de chaque nouvelle vague parasitémique issue d'un variant antigénique différent.

V. CONCLUSION

A la lumière de toutes ces observations et compte tenu des diverses possibilités évoquées ci-dessus, la méthode ELISA de détection d'antigènes **Trypanosoma** apparaît comme étant complémentaire de la technique parasitologique d'examen direct du sang. La méthode peut contribuer à donner une idée plus juste des infections, dans une aire donnée, par des trypanosomes pathogènes.

RESUME

Les méthodes de diagnostic sérologique de la trypanosomiase animale jusqu'à présent utilisées ne permettaient pas de rapporter avec précision un état immunitaire contemporain de l'infection.

Avec l'élaboration des anticorps monoclonaux et la détection des antigènes circulants, la sérologie et l'état d'infection peuvent être désormais corrélés.

Ce travail a été effectué à Sokone sur deux troupeaux de 40 têtes chacun. Les méthodes parasitologiques et sérologiques sont comparées.

MOTS-CLES

Diagnostic, trypanosomiase, anticorps monoclonaux, antigènes circulants.

SUMMARY

The serology diagnosis methods in animal trypanosomiasis hitherto utilised did not permit to correlate precisely the immune status with the infection. With monoclonal antibodies for trapping circulating antibodies it is now possible to correlate serology and current infection. This work has been carried out in Sokone within two herds of 40 animals each. Results of parasitological and serological methods are compared.

KEY WORDS

Diagnosis, trypanosomiasis, monoclonal antibodies, circulating antigens.

Tableau 1 : Résultats de microscopie et de sérologie

N°	SK- JANVIER			SK-FEVRIER			SK-MARS			SK-AVRIL			SK-JUIN		
	T.b.	T.v.	T.c.	T.b.	T.v.	T.c.	T.b.	T.v.	T.c.	T.b.	T.v.	T.c.	T.b.	T.v.	T.c.
81			M*												
82'															
83						S							S		S
84		S	S			S									
85															
86															
87		S	S		S	S		S			S			S	
88					S	S									
89															
90															
91									S						
92		S					S	S	S					S	
93															
94															
95			S		S	S		S	S		S			S	
96						S					S				M*
97	S		S												
98															
99															
100														S	
101												M*			
102												S			
103	S	S	S			S			S	S		S			S
104			S		S	S			S	S		S			
105				S		S									
106															M*
107					S					S					
108	S		S			S	S		S	S		S			
109								S	S	S					
110		S			S			S			S			S	S
111										S					M*
112	S		S			S				S		S			

Tableau 1 : (Suite)

113			S							S		S		S	M*
114											S				S
115								S							M*
116											S				S
117											S				
118						S					S	S			S
119			S			S				S		S			
120						S									

M = Trypanosomes décelés au microscope

S = Séro-positif

* = Traitement trypanocide

Tableau 2 : Comparaison microscopique - sérologie

TECHNIQUE	Taux mensuels % de positivité					
		Janvier	Février	Mars	Avril	Juin
Examens microscopiques	T.b	0	0	0	0	0
	T.v	0	0	0	0	0
	T.c	2,5	0	0	2,5	13,5
Sérologie	T.b	10	2,5	5,1	22,5	2,7
	T.v	12,5	17,5	15,3	20,0	16,2
	T.c	22,5	32,5	17,9	20,0	18,9

Tableau 3 : Fausses réactions sérologiques

PERIODE	Faux skro-positifs						Faux h-o-négatifs					
	T.b.		T.v.		T.c.		T.b.		T.v.		T.c.	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
Janvier (n = 40)	4	10,0	5	12,5	10	25,0	0	-	0	-	1	2,5
Février (n = 40)	1	2,2	7	17,5	13	32,5	0	-	0	-	0	-
Mars (n = 39)	2	5,1	6	15,3	7	17,9	0	-	0	-	0	-
Avril (n = 40)	9	22,5	8	20,0	7	17,5	0	-	0	-	0	-
Juin (n = 37)	1	2,7	6	16,2	6	16,2	0	-	0	-	4	10,8
TOTAL SUR 196 ANALYSES	17	8,671	32	16,32	43	21,93	0	0,0	0	0,0	5	2,55

Tableau 4 : Réactions monospécifiques et réactions croisées

PERIODE	Nombre d'échantillons positifs avec l'un ou/et l'autre anticorps						
	T.b. seul	T.v. seul	T.c. seul	T.b et T.v	T.b et T.c	T.v et T.c	T.b, T.v, T.c
Janvier	0	2	4	0	3	2	1
Février	0	3	8	0	1	4	0
Mars	0	3	3	0	1	2	1
Avril	3	7	1	0	6	1	0
Juin	0	5	5	0	1	1	0
Totaux	3	20	21	0	12	10	2
% de 196 analyses	1,53	10,20	10,71		6,12	5,10	1,02

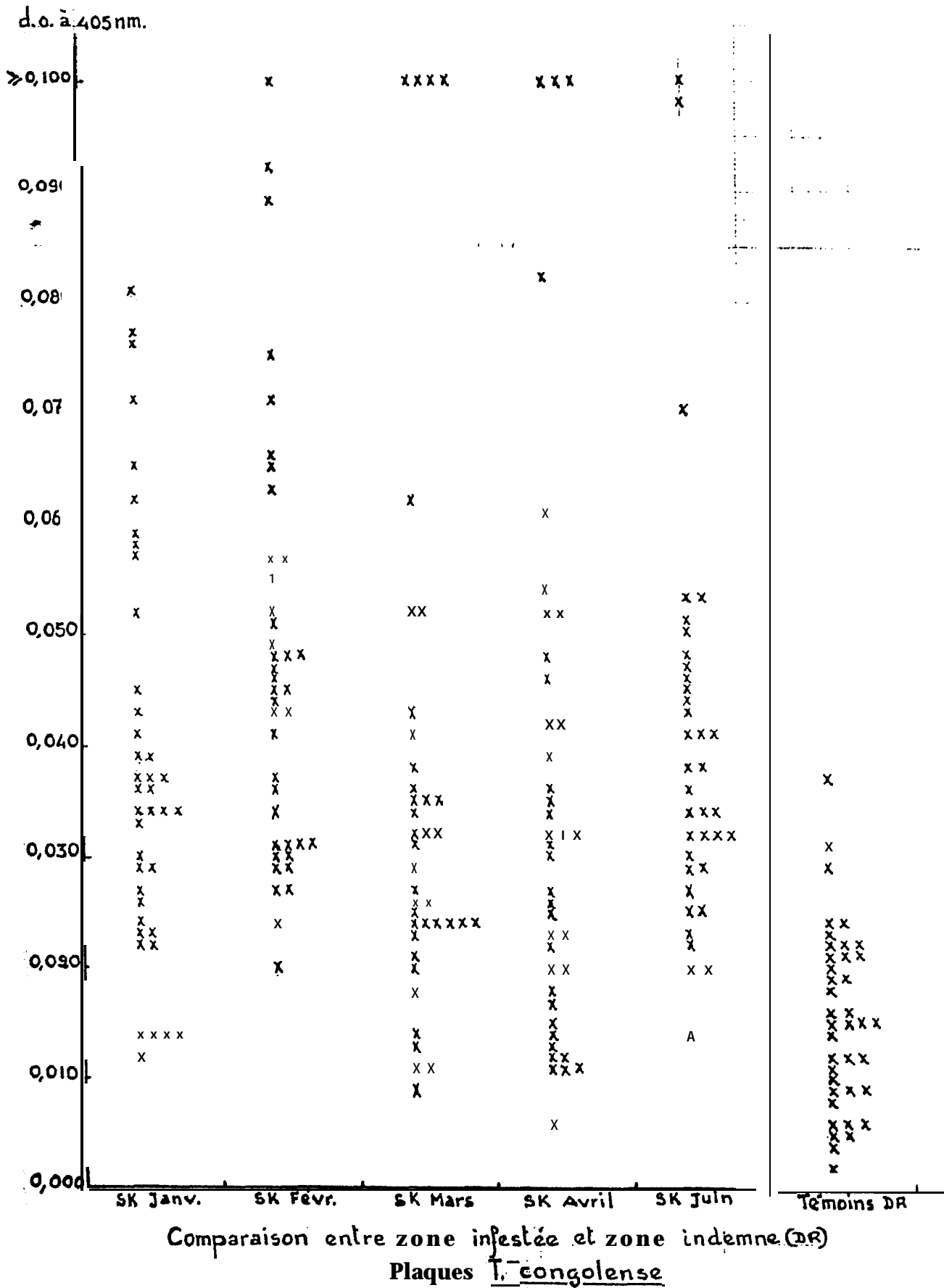


Figure 6

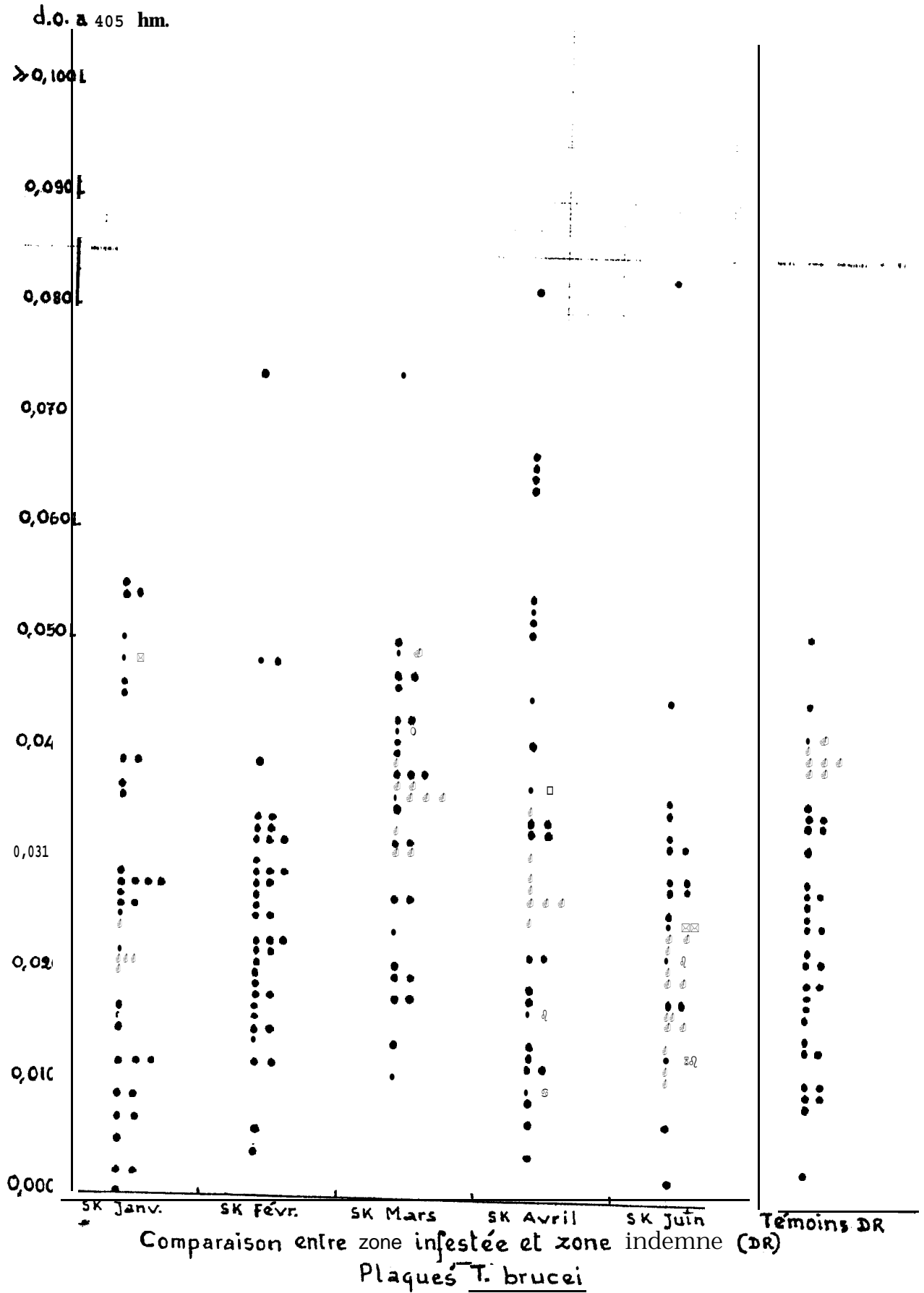
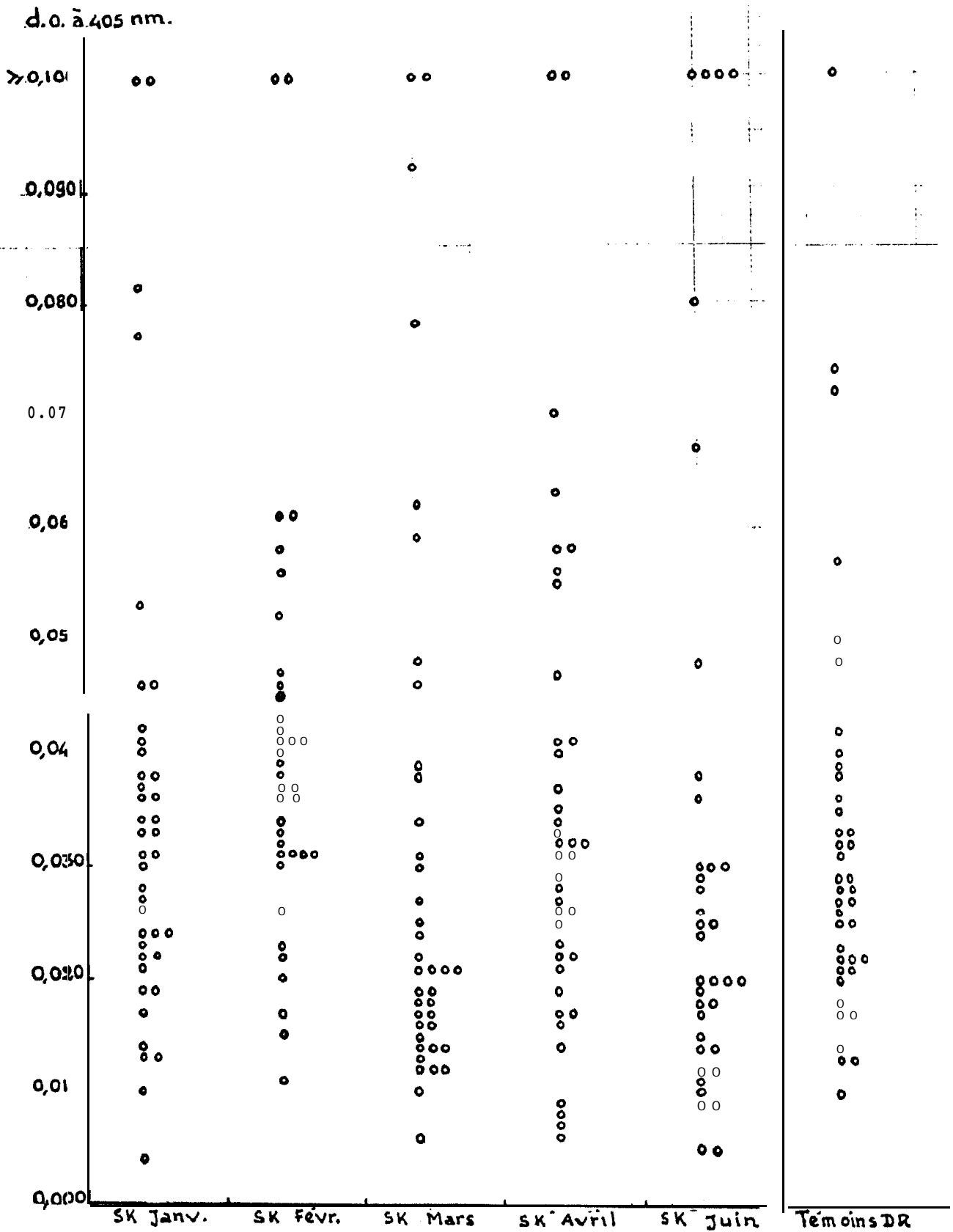


Figure II



Comparaison entre zone infestée et zone indemne (DR)

Plaques T. vivax

Figure III

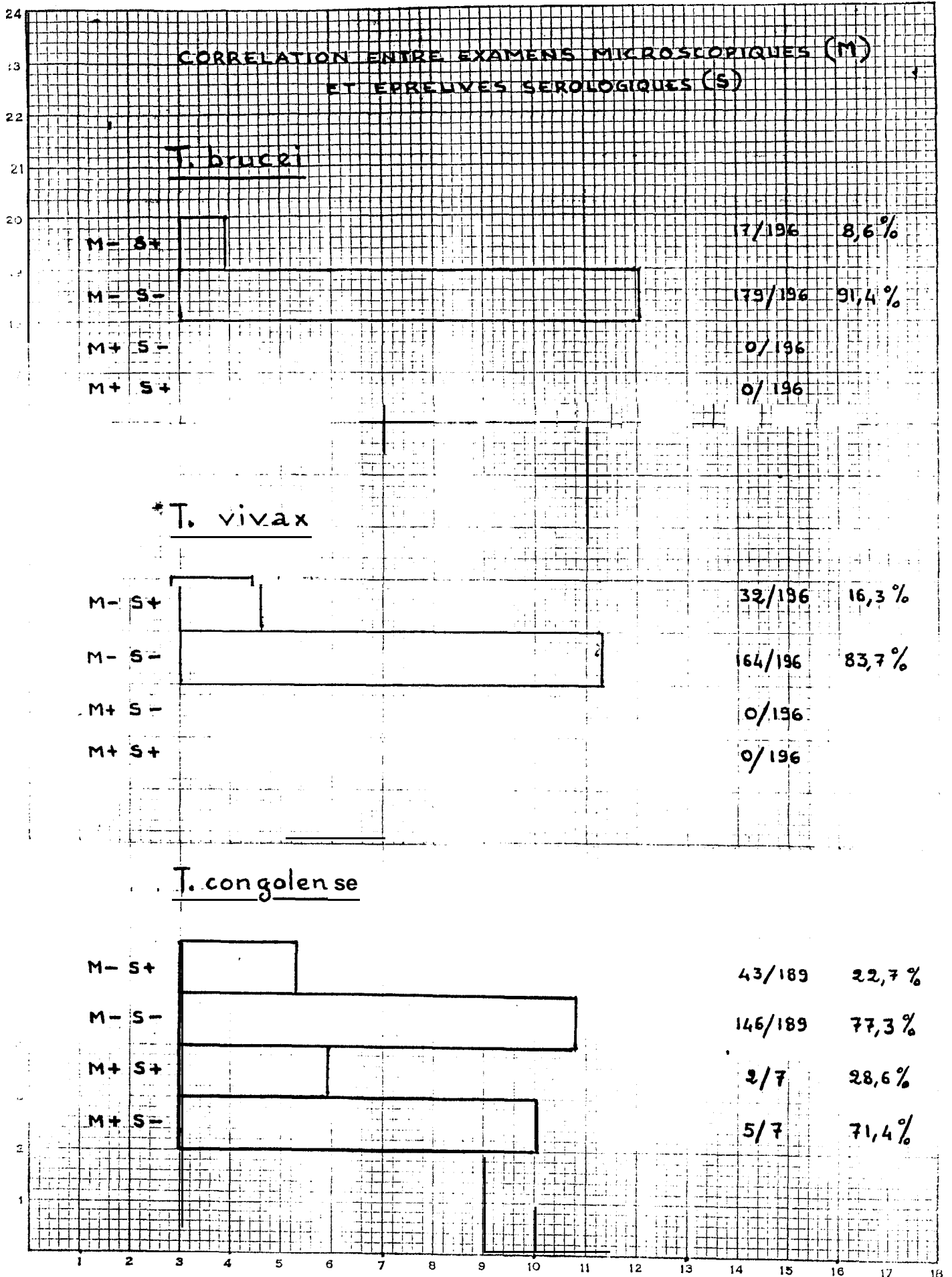


Figure IV :

Figure V
Schéma d'utilisation de la plaque ELISA

DATE : _____

PLATE : T.c

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	⊕Tc	83	87	91	95	99	103	107	111	115	119
B												
C		⊖Tc	84	88	92	96	100	104	108	112	116	120
D												
E		SK 81	85	89	93	97	101	105	109	113	117	
F												
G		SK 82	86	90	94	98	102	106	110	114	118	
H												

NOTES : Sérums SK - Janvier 89 - Dilution : 10/5 ml . 1 à 20°C

Ac : T.c. : 1/100 : 1 nuit à + 4°C

Conj. : T.c. : 1/100 : 15 mn à 20°C

Révi. : ABTS : 30 mn à 20°C

Lecture : 405 nm