

Z V00006 33

L'immunodiagnostic de la fasciolose à *Fasciola gigantica* par la technique ELISA au Sénégal. Observations préliminaires chez deux agneaux

O.T. Diaw¹, M.M. Seye¹, M. Seye¹, Y. Sarr¹, G. Vassiliadès¹

L99

MATÉRIEL ET MÉTHODES

DIAW (O.T.), SEYE (M.M.), SEYE (M.), SARR (Y.), VASSILIADÈS (G.). L'immunodiagnostic de la fasciolose à *Fasciola gigantica* par la technique ELISA au Sénégal. Observations préliminaires chez deux agneaux. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1994, 47 (3) : 291-294

L'objet de ce travail est de tester l'utilisation de la technique ELISA au Sénégal pour le diagnostic de la fasciolose à *Fasciola gigantica* chez le mouton en utilisant comme antigène les produits métaboliques d'excrétion-sécrétion du parasite. Alors que les analyses coprologiques classiques sont négatives jusqu'à la 14^e semaine, l'analyse immunologique par le test ELISA permet de trouver les premiers anticorps anti-*Fasciola gigantica* dès la 4^e semaine après l'infection.

Mots clés : Ovin • Agneau • Fasciolose • *Fasciola gigantica* • Immunodiagnostic • Diagnostic • Technique immunologique Fèces Sang • Test ELISA • Sénégal.

INTRODUCTION

Au Sénégal, la fasciolose à *Fasciola gigantica* prend de plus en plus d'importance depuis la construction du barrage de Diama et les nombreux aménagements hydroagricoles (6). Le diagnostic *ante mortem* de cette affection pour la mise en place de mesures de lutte efficaces et surtout de contrôle continu, pose des difficultés. En effet, la coprologie reste insuffisante car les premiers œufs ne sont détectés qu'à partir du 3^e mois de l'infestation (2). Une technique plus sensible permettant un diagnostic précoce de la maladie s'avère donc nécessaire. Il existe déjà un test sérologique par la méthode ELISA qui permet de mettre en évidence, chez les animaux, l'apparition des premiers anticorps anti-fascioliens (1, 3, 4, 5, 9, 12, 14, 15, 21, 22). Récemment, ce test a été amélioré en utilisant comme antigène les produits d'excrétion-sécrétion des parasites (*Fasciola*) (2, 3, 16, 17, 19). L'ensemble des données de la fasciolose concerne *Fasciola hepatica*, seules quelques études ont été réalisées avec *Fasciola gigantica* (10, 11).

L'objectif de ce présent travail est de tester la validité de la technique ELISA en utilisant un antigène de *Fasciola gigantica* d'excrétion-sécrétion et d'envisager son utilisation sur le terrain comme moyen de diagnostic individuel. Pour ce faire, l'infestation expérimentale de 2 ovins, suivis au laboratoire du début jusqu'à la mort naturelle survenue aux 10^e et 14^e semaines respectivement, a été réalisée.

1. Service de Parasitologie, LNERV/ISRA, B.P 2057, Dakar, Sénégal.

Reçu le 15.4.1993, accepté le 11.10.1994.

Animaux d'expérience

Deux agneaux mâles âgés de 3 mois de race Peul-Peul, nés à Dakar dans un élevage de case (zone indemne de trématodoses), ont été utilisés. Par ailleurs, l'analyse coprologique par sédimentation (7) effectuée au préalable a confirmé l'absence de trématodes.

Infestation

Ces agneaux ont été infestés par voie orale à partir de métacercaires de *Fasciola gigantica*. Ces dernières sont issues de limnées d'élevage infestées expérimentalement en laboratoire et suivies jusqu'à la sortie des cercaires, puis elles sont conservées à +4° jusqu'à leur utilisation. Les deux agneaux (n°1 et n°2) ont reçu chacun, en une seule prise, 300 métacercaires âgées de 3 mois et 15 jours.

Prélèvements de fèces et de sang pour analyses

Pendant le suivi des animaux, des prélèvements de fèces, suivis d'analyses coprologiques (7), ont été effectués avant infestation d'abord, puis au rythme d'un prélèvement par semaine à partir de la 3^e semaine. Des prélèvements individuels de sang en vue de la récolte de sérums destinés aux tests sérologiques ont été également faits avant infestation (JO-1), le jour de l'infestation (JO) et ensuite une fois par semaine jusqu'à la mort naturelle des animaux (étapes : JO+1, JO+2, JO+3, etc.). Les analyses sérologiques ont été réalisées avec la technique de dosage des anticorps utilisant un antigène métabolique excrétion-sécrétion de *Fasciola gigantica*. Les prélèvements de fèces et de sang à J-1 et JO constituent les témoins de référence avant infestation.

Préparation de l'antigène et épreuve ELISA

Des douves adultes ont été placées dans une boîte de Pétri et laissées pendant 3 h dans de l'eau distillée. Le produit des excréctions-sécrétions a été récolté, tamisé et centrifugé. Le surnageant a été recueilli puis mis en aliquotes après avoir déterminé le taux de protéines (méthode électrophotométrique par référence à la table

nomographique de E. ADAMS). Deux dilutions de sérum ont été testées pour les épreuves sérologiques : l'une au 1/100 et l'autre au 1/200 avec une concentration unique de conjugué à la peroxydase diluée au 1/5 000. L'antigène fixé sur les plaques (Dynatech M.129A) était utilisé à la concentration de 10 µg/ml diluée dans le tampon. 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 sa mort pour le positif.

RÉSULTATS

Agneau n°1

L'animal est mort à la 14e semaine après infestation (100 jours). A l'autopsie, on notait un début de calcification des canaux hépatiques et la présence d'ascite dans la cavité générale. Des douves adultes (39) ont été récoltées au niveau du foie, et des oeufs ont été décelés dans le parenchyme hépatique par examen microscopique.

Coprologie

Toutes les analyses coprologiques sont restées négatives jusqu'à la mort de l'agneau.

Sérologie (figure 1)

Dilution au 1/100

L'apparition des anticorps est intervenue dès la 3e semaine ayant suivi l'infestation. Cependant, la courbe des densités optiques a connu une ascension dès la première semaine. Le premier pic a été atteint à la 11e semaine mais la valeur de la densité optique la plus élevée a été enregistrée à la veille de la mort de l'animal, soit J+99.

Dilution au 1/200

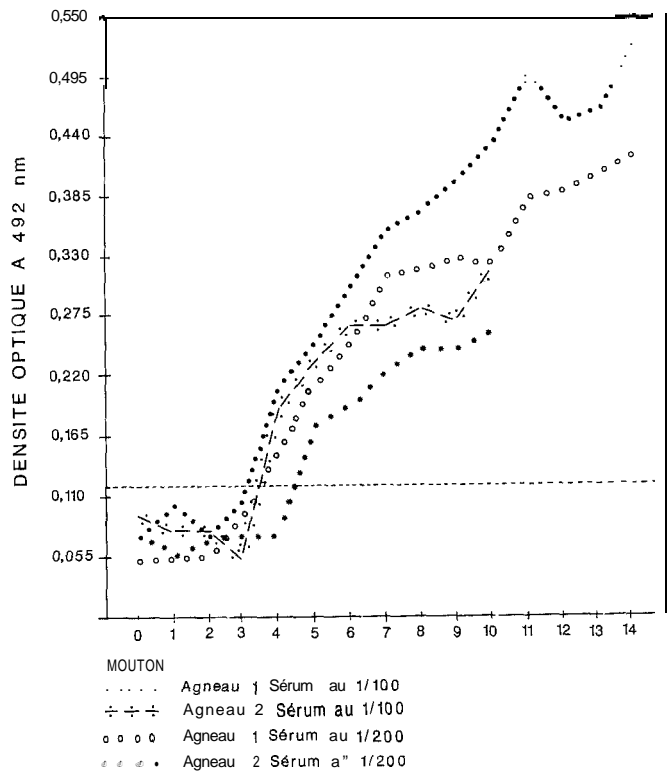
La même ascension de la courbe des densités optiques est apparue, mais les valeurs enregistrées sont plus faibles pour les mêmes sérums dilués au 1/100. Le premier pic est observé à la veille de la mort de l'animal.

Agneau n° 2

L'agneau n°2 n'a survécu que pendant 74 jours. A l'autopsie, 56 douves immatures ont été récoltées au niveau du foie mais aucun œuf n'a été observé à l'examen microscopique du parenchyme hépatique. L'agneau n'a sans doute pas supporté l'infestation (migration massive des jeunes douves, foie fortement endommagé).

Coprologie

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



SEMAINES APRES INFESTATION

Figure 1 : Résultats sérologiques avant et après infestation.

Sérologie (figure 1)

Dilution au 1/100

Les premiers anticorps apparaissent à la 4e semaine et le premier pic est atteint à la 6e semaine, soit deux semaines après. Comme précédemment, le maximum de la valeur des densités optiques s'observe à la 10e semaine après infestation et cette valeur se rapproche de celle du sérum de l'agneau n°1 à la même période mais avec 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 8e 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.

DISCUSSION

Dans cette étude comportant une infestation expérimentale avec *F. gigantica*, le test ELISA avec un antigène excréteur-sécréteur permet de déceler précocement, dès

la 3e semaine, la présence des anticorps anti-*F. gigantica*. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par BOULARD (2, 3) chez des bovins avec l'antigène excrétion-sécrétion de *Fasciola hepatica* et ceux de PFISTER (18) sur lapins et bovins ; mais ici, on constate de légères différences en ce qui concerne la réceptivité et la réaction sérologique. En effet, chez le premier sujet, les anticorps anti-*Fasciola* sont plus précoces (3e semaine) que chez le second (4e semaine). Cependant, SANTIAGO DE WEIL et HILLYER (20) ont observé ces mêmes différences qu'ils attribuent à un simple phénomène de comportement individuel.

L'utilisation de ce test en milieu naturel, où les animaux sont polyparasités, pose cependant le problème des communautés antigéniques et des réactions croisées avec les autres parasites. Les recherches d'éventuelles communautés antigéniques entre *Fasciola* et d'autres parasites du bétail sont abondamment documentées (3, 13, 18). Dans cette étude, on a testé la technique ELISA avec l'antigène excrétion-sécrétion de *F. gigantica* en faisant un premier essai sur 4 sérums de référence dont l'un est négatif (agneau indemne de trématodes) et les 3 autres positifs, respectivement à *F. gigantica*, *Schistosoma bovis* et *Paramphistomum* sp. Seul le sérum homologue a réagi avec une densité optique égale à 4 fois celle des autres (la densité optique du négatif est sensiblement la même que celle des autres sérums hétérologues).

Cependant au Nigeria, Fagbemi *et al* (8) ont montré la communauté antigénique entre *F. gigantica*, *Dicrocoelium hospes* et *S. bovis* mais ceci à partir d'antigènes bruts et semi-purifiés de vers entiers. Ces résultats sont d'une grande importance quant à l'utilisation du test ELISA en zone tropicale et posent le problème de la spécificité de l'antigène.

Cette méthode ELISA, utilisée dans un autre essai en milieu naturel (troupeau de 33 moutons), a permis de retrouver les mêmes animaux infestés (6) par *F. gigantica* diagnostiqués auparavant avec la méthode coproscopique.

Les observations préliminaires faites ici sur 2 agneaux avec un antigène excrétion-sécrétion sont intéressantes mais les recherches doivent se poursuivre, avec un plus grand nombre d'animaux, pour mieux approfondir ce problème de réactions croisées avec les autres parasites et déterminer les limites d'utilisation pratique de ce test.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que le diagnostic ELISA utilisant un antigène métabolique excrétion-sécrétion permet de déceler précocement la présence des anticorps anti *Fasciola gigantica* chez le mouton alors que le diagnostic par les techniques de coprologie est impossible jusqu'au 3e mois. Cette technique est applicable aux études épidémiologiques de la fasciolose à *Fasciola gigantica* et constitue un outil d'une grande importance dans l'organisation et la mise en place de moyens de contrôle et de lutte contre cette affection au Sénégal.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le comité de lecture et de rédaction de la Revue d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, ainsi que le Dr C. BOULARD (INRA, Tours) pour les remarques, suggestions et corrections qu'ils ont bien voulu apporter à ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMBROISE-THOMAS (P.), DESGEORGES (P.T.), BOUTTAZ (M.). Le diagnostic immunoenzymologique (ELISA) de la fasciolose humaine et bovine. Détection d'anticorps et/ou d'antigènes circulants. *Annls Soc. belge Méd. trop.*, 1980, **60** : 47-60.
2. BOULARD (C.), BOUVRY (M.), ARGENTE (G.). Comparaison de la détection des foyers de fasciolose par test ELISA sur lactosérum et sérum et par coproscopie. *Annls Rech. vét.*, 1985, **16** (4) : 363-368.
3. BOULARD (C.), REGNAULT (A.). L'immunodiagnostic de la fasciolose bovine par la technique ELISA. *Bull. G.T.V.*, 1989, 1-B-337 : 59-68.
4. BURDEN (D.J.), HAMMET (N.C.). Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for antibody to *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet. Rec.*, 1978: 103-158.
5. BURDEN (D.J.), HAMMET (N.C.). The ELISA test for detection of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasitology*, 1979, 79: 3.
6. DIAW (O.T.), VASSILIADES (G.), SEYE (M.), SARR (Y.). Prolifération des mollusques et incidences sur les trématodes dans la région du delta et du lac de Guiers après la construction du barrage de Diama sur le fleuve Sénégal. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, **43** (4) : 499-502.
7. EUZEBY (J.). Diagnostic expérimental des helminthoses animales. Travaux pratiques d'helminthologie vétérinaire. Paris, Vigot frères, 1958.
8. FAGBEMI (B.O.), OBARISIAGBON (I.O.). Common antigen of *Fasciola gigantica*, *Dicrocoelium hospes* and *Schistosoma bovis* and their relevance to serology. *Ver. Q.* 1991, **13** (2): 81-87.
9. FARRELL (C.J.), SHEN (D.T.), WESCOTT (R.B.), LANG (B.Z.). An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 1981, **42** (2): 237-240.
10. GORAISH (I.A.), ABDELSALAM (E.B.), TARTOUR (G.), ABBAS (B.), ARADAIB (I.E.). The effect of levamisole (L. tetramisole) treatment on the susceptibility to *Fasciola gigantica* infection in goats. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, **41** (3): 283-287.
11. GORAISH (I.A.), ABDELSALAM (E.B.), TARTOUR (G.). Susceptibility to homologous reinfection with *Fasciola gigantica* in goats. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1991, **44** (1) : 69-73.
12. HILLYER (G.V.), SANTIAGO DE WEIL (N.). Use of immunologic technics to detect chemotherapeutic success in infections with *Fasciola hepatica* II. The enzym linked immunosorbent assay in infected rats and rabbits. *J. Parasit.*, 1979, **65**: 680-684.
13. HILLYER (G.V.), SANTIAGO DE WEIL (N.). Serodiagnosis of experimental fasciolosis by immunoprecipitation tests. *Int. J. Parasit.*, 1981, **11**: 71-78.
14. ITAGAKI (T.), OHTA (N.), HOSAKA (Y.), ISO (H.), KONISHI (M.), CHINONE (S.), ITAGAKI (H.). Diagnosis of *Fasciola* sp. infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay. *Jap. J. vet. Sci.*, 1989, (51): 757-764.

15. JEMLI (M.H.), DORCHIES (P.), MAGNAVAL (J.F.). Application de la technique ELISA au diagnostic immunologique de la fasciolose ovine : comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la double diffusion en gélose. *Revue Méd. vét.*, 1987, **138** : 355-359.
16. LEHNER (R.P.), SEWELL (M.M.H.). A study of antigens produced by adults *Fasciola hepatica* maintained *in vitro*. *Parasite Immunol.*, 1980, **2**: 99-109.
17. LEVINE (D.M.), HILLYER (G.V.), FLORES (S.I.). Comparison of counter-electrophoresis, the enzyme-linked immunosorbent assay, and kato fecal examination for the diagnosis of fascioliasis in infected mice and rabbits. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1980, **29**: 602-608.
18. PFISTER (K.), DAVEAU (C.), AMBROISE-THOMAS (P.). Partial purification of somatic and excretory-secretory products of adult *Fasciolu hepatica* and their application for serodiagnosis of experimental and natural fascioliasis using an ELISA. *Res. vet. Sci.*, 1984, **37**: 39-43.
- DIAW (O.T.), SEYE (M.M.), SEYE (M.), SARR (Y.), VASSILIADÈS (G.). Immunodiagnosis of fasciolosis (*Fasciola gigantica*) with ELISA test in Senegal. Preliminary observations in two lambs. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1994, **47** (3): 29 1-294**
- The purpose of this work was to investigate the use of the ELISA test for the diagnosis of fasciolosis (*Fasciola gigantica*) in sheep, in Senegal, using *Fasciola gigantica* metabolic excretion-secretion products as antigens. Coprological analysis results were negative until the fourteenth week following infection; using the ELISA test, the first anti-*Fasciola gigantica* antibodies can be detected as early as the fourth week following infection.
- Key words** : Sheep • Lamb • Fasciolosis • *Fasciola gigantica* • Immunodiagnosis • Diagnosis • Immunological technique • Faeces • Blood • ELISA test • Senegal.
19. RAJASEKARIAH (G.R.), MITCHELL (G.F.), CHAPMAN (C.B.), MONTAGUE (P.E.). *Fasciola hepatica*: attempts to induce protection against induction in rats and mice by injection of excretory/secretory products of immature worms. *Parasitology*, 1979, **79**: 183-187.
20. SANTIAGO DE WEIL (N.), HILLYER (G.V.). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciolu hepatica*. *J. Parasit.*, 1988, **74** (5): 8 1 0-8 18.
21. WESCOTT (R.B.), FARREL (C.J.), SHEN (D.I.). Diagnosis of naturally-occurring *Fasciola hepatica* infection in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. vet. Res.*, 1983, **45**: 178-179.
22. ZIMMERMAN (G.L.), JEN (L.W.), CERRO (J.E.), FARNSWORTH (K.L.), WESCOTT (R.B.). Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. vet. Res.*, 1982, **43** (12): 2097-2100.
- DIAW (O.T.), SEYE (M.M.), SEYE (M.), SARR (Y.), VASSILIADÈS (G.). Immunodiagnostico de la fasciolosis por *Fasciolu gigantica* mediante la técnica de ELISA en Senegal. Observación preliminar en dos corderos. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1994, **47** (3) : 291-294**
- El objetivo de este estudio es el de probar la utilización de la técnica de ELISA en Senegal, para el diagnóstico de la fasciolosis por *Fasciola gigantica* en el cordero, utilizando como antígenos los productos del metabolismo de excreción y secreción del parásito. Mientras que los análisis coprológicos clásicos fueron negativos hasta la semana 14, el análisis inmunológico mediante el ELISA permitió la demostración de los primeros anticuerpos anti-*Fasciola gigantica* a partir de la cuarta semana post-infestación.
- Palabras clave** : Ovino • Cordero • Fasciolosis *Fasciola gigantica* • Immunodiagnostico • Diagnostico • Técnica inmunológica • Heces • Sangre Test • ELISA • Senegal.