

2V00 1519

ok

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

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

DIRECTION DES RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
(L.N.E.R.V.), DAKAR-HANN

-1512

**CONTRAT DE RECHERCHE AIEA/ISRA N° 7596/RB
PORTANT SUR LA DETECTION ET LA CARACTERISATION
DE SOUCHES DE TRYPANOSOMES SUPPOSEES
CHIMIORESISTANTES AU SENEGAL PAR L'UTILISATION DES
TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC B.C.T. ET ELISA-ANTIGENE**

-----0-----

***RAPPORT SUR L'AVANCEMENT DES TRAVAUX
AU 31 AOÛT 1994***

Par: A. DIAITÉ*, M. SEYE*, A. MANE* et T. NDIAYE*

RAPPORT N° 24 /PATHO ANIM
Septembre 1994

* : ISRA/DRPSA/LNERV, Laboratoire de Parasitologie, B.P. 2057, Dakar

CONTRAT DE RECHERCHE AIEA/ISRA N° 7596/RB PORTANT SUR
LA DETECTION ET LA CARACTERISATION DE SOUCHES
DE TRYPANOSOMES SUPPOSEES CHIMIORESISTANTES
AU SENEGAL PAR L'UTILISATION DES TECHNIQUES
DE DIAGNOSTIC B.C.T. ET ELISA-ANTIGENE

-----0-----

RAPPORT SI JR L'AVANCEMENT DES TRAVAUX AU 31 AOUT 1994

Par: A. DIAITE, M. SEYE, A. MANE, T. NDIAYE

INTRODUCTION

La région de Sokone (centre-sud du Sénégal:), est quasi-totalement infestée de glossines (*Glossina morsitans submorsitans* et *G. palpalis gambiensis*), principales vectrices des trypanosomoses. Le cheptel bovin y est estimé à environ 50 000 têtes, généralement des *Diakore* (croisement Zébu-Ndama). Les éleveurs font souvent appel aux agents vétérinaires locaux pour des traitements trypanocides. L'utilisation intensive et durable du Bérénil et du Samorin a fait craindre l'apparition de souches de trypanosomes résistant à l'un ou/et l'autre de ces médicaments. Des investigations menées dans la région en 1991-92, avaient abouti à une forte suspicion de l'existence de telles souches. La présente étude doit permettre de se prononcer avec précision. Les travaux ont démarré en avril 1994, avec l'appui matériel et financier de l'AIEA. Il s'agit d'effectuer un dépistage parasitologique et sérologique sur un grand nombre de bovins de la zone, d'isoler ensuite des souches de trypanosomes à partir des bovins trouvés positifs pour les inoculer à des chèvres. Ces chèvres sont ensuite traitées avec l'un ou l'autre des trois principaux trypanocides vétérinaires (Bérénil, Samorin ou Ethidiurn). La persistance post thérapeutique de l'infestation signifie une chimiorésistance à la dose employée pour le traitement.

1. MATERIEL ET METHODES

Au 31 août 1994, quatre visites ont été effectuées sur le terrain, au cours desquelles un total de 947 prélèvements ont été effectués. Les investigations se sont ensuite poursuivies au laboratoire. Ces travaux de terrain et de laboratoire ont comporté:

- des prospections entomologiques: déploiement de pièges de capture "Challier-Laveissière" pendant 24 à 72 heures dans les forêts classées limitrophes des villages où vivent les bovins cibles. Les glossines capturées dans chaque forêt prospectée ont été triées en fonction de l'espèce et du sexe puis comptées.

- un dépistage parasitologique des trypanosomes portant au départ sur 532 bovins numérotés à l'oreille: la technique B.C.T. (MURRAY, 1977) a été utilisée pour le diagnostic des trypanosomes sur le terrain, avec lecture de l'hématocrite suivie de l'examen de l'interphase entre latne et lamelle. La confection des frottis de sang a été irrégulière, en raison du retard de la réception du matériel.

- des récoltes de sérums sur ces animaux: prélèvement I.V. de 5 à 10 ml de sang jugulaire par animal, sur vacutainer sec; après 2 heures à la température ambiante et 24 heures à +4°C, centrifugation à 10 000 tours/mn pendant 15 minutes, récolte du sérum, adjonction de 0,01% de Sodium benzoate dans un volume de 10 µl; conservation à -20°C jusqu'à l'emploi;

Les visites 3 et 4, effectuées après le dépistage initial, n'ont intéressé que les bovins postifs et ceux à faible hématoците (211 bovins à la visite 3 et 204 à la visite 4).

Les actions suivantes ont été réalisées en visites 2 et 3:

- traitement au Samorin, 0,5 mg/kg, I.M., (solution à 1%) des bovins B.C.T. positif à la visite qui suit celle du diagnostic. De plus, en raison du retard de livraison des réactifs de sérologie, les bovins à hématoците égal ou inférieur à 20% ont également subi le même traitement.

- subinoculation de chèvres: prélèvement à la seringue de 5 ml de sang de bovin parasité (B.C.T positif), injection immédiate, en I.V., à une chèvre.

- de retour au Laboratoire, subinoculation de 3 autres chèvres avec chaque souche de terrain puis suivi de la parasitémie jusqu'à ++ ou +++. Traitement à ce moment au Bérénil: solution à 7%, 7,0 mg/kg, I.M., au Samorin: solution à 1%, 0,5 mg/kg, I.M., ou à l'Ethidium: solution à 1%, 1,0 mg/kg, I.M. La chèvre inoculée sur le terrain sert en même temps de témoin non traité. Les examens parasitologiques se sont ensuite poursuivis régulièrement.

2. RESULTATS-DISCUSSION

2.1 - Entomologie

Le tableau suivant résume les captures de glossines.

FORET	C A P T U R E S				
	<i>G. palpalis</i>		<i>G. morsitans</i>		<i>Total glossines</i>
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	
Keur Andalla	35	54	44	105	238
Toubakouta	0	0	39	21	60
Karang	0	0	9	12	21
Niokholokho	0	2	0	0	2

Ce tableau montre d'importantes différences dans la densité des tsétsé selon les localités et selon l'espèce de glossine. Niokholokho: très faible densité de *G. palpalis* et absence de *G. morsitans*; Karang: densité moyenne pour *G. morsitans*, nulle pour *G. palpalis*; Toubakouta: absence de *G. palpalis* et densité moyenne de *G. morsitans*; enfin Keur Andalla: présence des deux espèces, avec de fortes densités. Ces différences sont

essentiellement dues au fait que les forêts concernées sont assez éloignées les unes des autres et offrent des biotopes différents pour les glossines. Nous avons également noté une baisse sensible de la densité des tsétsé à Karang et à Toubakouta par rapport aux prospections de 1991. Cela est sans doute lié aux fréquentes coupes de bois pour l'usage domestique, au défrichement pour l'agriculture, et aux feux de brousse. Enfin, les glossines femelles ont été capturées en plus grand nombre que les mâles, sauf dans la forêt de Toubakouta.

2.2 - Diagnostic parasitologique des trypanosomoses

Le dépistage initial effectué sur les 532 bovins et les examens des visites suivantes ont donné les résultats ci-dessous:

VISITE	Nombre de Bovins	Résultats du diagnostic paraaitologique des trypanosomoses bovins (technique B.C.T.)							Total Tryps.
		T.b.	T.c.	T.v.	T.b.T.c.	T.b.T.v.	T.c.T.v.	TbTcTv	
1 et 2	532	0	15	12	0	0	0	0	27
3	211	0	2	3	0	0	0	0	5
4	204	0	0	2	0	0	0	0	2

T.b. = *Trypanosoma brucei*; T.c. = *T. congolense*; T.v. = *T. vivax*
B.C.T. = Buffy coat technique.

Ces résultats parasitologiques montrent avant tout une remarquable constance de la prévalence des trypanosomoses chez les bovins de cette zone lorsqu'on utilise la technique de diagnostic B.C.T. En effet, ce taux de 5% (avant traitement) avait été trouvé au dépistage initial effectué lors des études de 1989-92. Mais avec les épreuves sérologiques par ELISA-antigène, les taux avaient atteint 25%. Par ailleurs, on note au début des investigations une fréquence plus élevée de *T. congolense* (55,6% des infestations) par rapport à *T. vivax* (44,4%). C'était le contraire en 1989-92. Ces chiffres sont cependant provisoires, et seront probablement modifiés par les résultats de sérologie.

Pour ce qui est de la chimiothérapie réalisée sur le terrain, on observe une baisse significative de la fréquence des trypanosomoses après les traitements au Samorin effectués en visites 2 et 3. Les souches de trypanosomes concernées semblent en majorité sensibles à ce trypanocide lorsqu'il est administré selon les normes. Cependant, deux parmi les cinq bovins ont montré une parasitémie post thérapeutique persistante et ont gardé leurs trypanosomes deux mois au moins après le traitement. Il s'agit de souches de *T. vivax*, que nous avons isolées et passé sur chèvres. Le comportement de ces deux souches en thérapeutique expérimentale est décrit plus loin (2.4).

2.3 -Analyse statistique de l'hématocrite (PCV)

	VISITES 1 ET 2				VISITE 3				VISITE 4			
	Négatifs	T.c.+	T.v.+	Tryps+	Nég.	T.c.+	T.v.+	Tryps+	Nég.	T.c.+	T.v.+	Tryps+
Nbre Bovins	505	15	12	27	206	2	3	5	202	0	2	2
PCV %	31,5	23,3	25,5	24,3	27,8	20-28	20-23 et 28	23,2	27,8		20 - 31	20 - 31
E.T.	6,5	4,9	6,6	5,8	4,8	.	.	3,0	5,0	.	.	.

E.T. = Ecart type.

L'examen de ce tableau montre que les bovins porteurs de trypanosomes pathogènes (*Trypanosoma congolense* et *T. vivax*) offrent des moyennes de l'hématocrite sensiblement inférieures à celles des animaux trouvés négatifs en microscopie. En outre, les animaux qui hébergent *T. congolense* semblent plus anémiés que ceux positifs à *T. vivax*. Ce sont là des réalités classiques chez les bovins. On note également des différences entre l'hématocrite moyen des visites 1 et 2 d'une part et celui des visites suivantes d'autre part, même lorsqu'il s'agit des bovins négatifs. L'explication est qu'après le dépistage effectué lors des deux premières visites, seuls les animaux trouvés porteurs de trypanosomes et ceux à faible hématocrite ont été prélevés par la suite. Les épreuves de sérologie permettront sans doute de mieux sérier ces animaux en prenant en compte les bovins séropositifs.

2.4 - Thérapeutique expérimentale

Un total de 20 chèvres ont été inoculées avec 5 souches de trypanosomes prélevées sur des bovins à parasitémie persistante, soit 2 souches de *Trypanosoma congolense* et 3 souches de *T. vivax*, 4 chèvres par souche. Ces chèvres ont ensuite été réparties en lots de traitement trypanocide comme indiqué plus haut. Les examens (BCT) ont eu lieu tous les deux jours, sauf les week-end.

Les 2 souches de *T. congolense* passées sur chèvres se sont montrées sensibles à la dose standard des trois trypanocides. Les parasites ont disparu du sang dans les 48 heures après le traitement, et les examens parasitologiques (B.C.T.) effectués tous les deux jours sont restés négatifs pendant deux mois au moins, ou jusqu'à la mort de l'animal (le plus souvent par suite de parasitisme gastro-intestinal: Coccidiose confirmée).

Quant aux souches de *T. vivax*, deux d'entre elles ont montré une sensibilité normale aux trois trypanocides. Pour la troisième souche (SOKONE 002/LNERV/1994), les résultats sont les suivants:

- chèvre N° 714 traitée su **Bérénil**: parasitémie persistante, plus de 60 jours après traitement avec cependant une période aparasitémique de 18 jours;

- chèvre N° 716 traitée à l'**Ethidium**: examens négatifs du Sème au 21 jours après traitement, puis retour et persistance de la parasitémie jusqu'au 37ème jour qui suit le traitement. Ensuite mort de l'animal.

- chèvre N° 715 traitée au **Samorin**: elle est devenue négative 2 jours après le traitement et est restée aparasitémique jusqu'à sa mort survenue 21 jours après traitement, suite à une entérite coccidienne.

Signalons enfin que dans tous les cas, les chèvres témoins non traitées sont restées parasitémiques jusqu'à la mort due à la trypanosomose ou, quelquefois, à la coccidiose.

Les tableaux des pages 6 et 7 donnent les résultats de thérapeutique obtenus sur chèvres avec les souches 001 et 002 de *Trypanosoma vivax*.

En conclusion **provisoire**, on peut affirmer l'existence effective de souches chimiorésistantes de *Trypanosoma vivax* dans la région de Sokone. Cela confirme les soupçons nés des recherches préliminaires menées dans cette région en 1992. Pour ce qui est du médicament sanatif, il ressort des résultats actuels qu'aucune souche testée au laboratoire n'a montré de résistance à la dose usuelle de Samorin. Une utilisation adéquate de ce trypanocide chez les bovins de cette région donnerait sans doute satisfaction aux éleveurs et aux vétérinaires locaux.

Les travaux se poursuivront après les analyses sérologiques, qui permettront d'effectuer d'autres inoculations de chèvres à partir des bovins séropositifs et de reprendre les essais thérapeutiques au laboratoire. En attendant, les bovins cibles seront traités au Samorin en octobre 1994, et l'effet de ce traitement sera ensuite contrôlé au cours d'une dernière visite prévue en novembre-décembre.

PÉRIODE	<i>Résultats (BCT) et observations (OBS) des études thérapeutiques sur chèvres inoculées avec Trypanosoma vivax souche SOKONE 001/LNERV/1994</i>							
	Chèvre N°964 témoin non traité		Chèvre N° 704 traitée au Bérénil, 7,0 mg/kg		Chèvre N° 705 traitée au Samorin, 0,5 mg/kg		Chèvre N° 706 traitée à l'Ethidium, 1,0 mg/kg	
	BCT	OBS	BCT	OBS	BCT	OBS	BCT	OBS
Inoculation = J.0	—	Injection 5 ml sang T.V.	—	Injection 5 ml sang T.V.	—	Injection 5 ml sang T.V.	—	Injection 5 ml sang T.V.
J.0 + 3	—		—		—		—	
+ 5	T.v.+		T.v. +		T.v +		T.v. +	
+ 7	++		++	Bérénil J.0	++	Samorin J.0	+++	Ethidium J.0
+ 8	++		+		+		++	
+ 9	+++		—		—		—	
+ 12	+++		—		—		—	
+ 14	Morte		—		—		—	
+ 16			—		—		—	
+ 19			—		—		—	
+ 21			—		—		—	
+ 23			—		—		—	
+ 26			—		—		—	
+ 28			—		—		—	
+ 30			—		—		—	
+ 33			—		—		—	
+ 35			—		—		—	
+ 37			—		—		—	
+ 40			Morte (Bérénil J.0 + 33)		—		—	
+ 42					—		—	
+ 44					—		—	
+ 49					Morte (Samorin J.0 + 42)		—	
+ 51							Morte (Ethidium J.0 + 44)	

PERIODE EN JOURS)	Résultats (BC1) et observations (OBS) des études thérapeutiques sur chèvres inoculées avec <i>Trypanosoma vivax</i> souche SOKONE 002/LNERV/1994							
	Chèvre N°962 témoin non traité		Chèvre N° 714 traitée au Bérénil, 7,0 mg/kg		Chèvre N° 715 traitée au Samorin, 0,5 mg/kg		Chèvre N° 716 traitée à l'Ethidium, 1,0 mg/kg	
	BCT	OBS	BCT	OBS	BCT	OBS	BCT	OBS
Inoculation = J.0	—	Injection 5 ml sang T.v	—	Injection 5 ml sang T.v.	—	Injection 5 ml sang T.v.	—	Injection 5 ml sang T.v.
J.0 + 2	T.v.+		—		—		—	
+ 5	++		T.v.		++		++	
+ 7	++		+++	Bérénil J. 0	++	Samorin J. 0	++++	Ethidium J. 0
+ 8	++		+		+		++	
+ 9	+++		—		—		+	
+ 12	+++		—		—		—	
+ 14	+		—		—		—	
+ 16	+		—		—		—	
+ 19	+		—		—		—	
+ 21	+		—		—		—	
+ 23	+		—		—		++	
+ 26	Morte		—		—		+	
+ 28			++		Morte (Samorin J.0 + 21)		+	
+ 30			+				+	
+ 33			+++				+	
+ 35			++				+	
+ 37			++				+	
+ 40			++				+	
+ 42			+				+	
+ 44			+				+	
+ 49			!				Morte (Ethidium J.0 + 42)	
+ 51			++					
+ 54			+					
+ 56			+					
+ 58			+					
+ 61			++					
+ 63			+					
+ 65			++					
+ 68			++					
+ 70			+					
+ 71			Morte (Bérénil J.0 + 64)					

REFERENCES

- MURRAY, M., MURRAY, P.K., MCINTYRE, W.I.M. : An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **71 (1977): 325**
- NANTULYA, V.M., LINDQVIST, K.J.: Antigen-detection enzyme immunoassays for the detection of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle.
Trop. Med. Parasit., **40 (1989): 267-272.**
- DIAITE, A., SEYE, M., VASSILIADES, G., A. MANE, T. NDIAYE: Application of the Antigen-detection technique for the detection of apparent drug resistant trypanosome strains in Senegal.
IAEA-TECDOC-707 (June 1993): 43-50