

Étude sur l'allergie, les anticorps précipitants et les anticorps fixant le complément au cours de l'infestation des bovins par *Fasciola gigantica*

par J. BLANCOU (*), A. BOUCHET (*) et P. DAYNES (*)

RESUME

Trois épreuves (intra-dermo réaction, fixation du complément, double diffusion en gélose) ont été réalisées chez 209 zébus infestés naturellement ou artificiellement par *Fasciola gigantica*.

L'intra-dermo réaction révèle 60 à 70 p. 100 des sujets infestés (mais avec 30 à 35 p. 100 de résultats par excès), la fixation du complément 23-48 p. 100 (8 p. 100 de résultats par excès) et la diffusion en gélose 16 à 36 p. 100 (sans résultat par excès).

INTRODUCTION

La fasciolose, très répandue dans le monde entier, semblait jusqu'à ces dernières années avoir épargné Madagascar.

En 1966, l'un de nous attirait l'attention sur un premier foyer de distomatose à *Fasciola gigantica*, décrivait l'hôte intermédiaire *Limnaea natalensis* et reproduisait expérimentalement le cycle biologique du parasite (7).

Depuis quatre ans, la maladie s'est considérablement étendue à travers la Grande Ile, amenant le Service d'Helminthologie du Laboratoire Central de l'Elevage à étudier tous les moyens de diagnostic et de prophylaxie qui lui soient applicables.

Il est apparu très utile d'explorer dans ce but des méthodes immunologiques destinées à contrôler les réactions du zébu malgache à cette nouvelle parasitose et à apprécier ses réactions au cours de traitements expérimentaux ou d'immunisation ultérieure, naturelle ou artificielle. Ces méthodes, largement appliquées dans l'infestation à *Fasciola hepatica* ont été très peu

étudiées dans le cas de *Fasciola gigantica*, méritant à ce titre d'être éprouvées avant la méthode plus récente de l'immunofluorescence indirecte.

Ce sont les résultats de nos essais qui font l'objet de la présente étude.

MATERIEL ET METHODES

I. ANIMAUX D'EXPERIENCE

Au total 209 zébus ont été testés. Il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir dans tous les cas des sujets sûrement indemnes d'autres helminthoses et en particulier de trématodoses (*Paramphistomidae*, *Gastrothylacidae*, *Eurythrema*) rencontrés souvent à Madagascar (8).

A. Infestation naturelle

Les animaux infestés naturellement, utilisés dans cet essai, provenaient du Moyen-Ouest de Madagascar; seuls ont été retenus ceux qui présentaient, parmi divers œufs d'autres parasites, ceux de *Fasciola gigantica*. Le bilan total de leur parasitisme n'a pu être établi, car seul

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire Central de l'Elevage, Tananarive.

l'examen coprologique était réalisable sur ces bovins appartenant à des particuliers.

B. Infestation expérimentale

Quarante sujets en provenance d'une région indemne de fasciolose, ont été infestés chacun avec 800 métacercaires. L'infestation a réussi dans tous les cas. A l'autopsie, ces animaux étaient porteurs de *Fasciola gigantica*, mais aussi de *Paramphistomum* sp. et de Sétaires, *Setaria labiatopapillosa*. Certains de ces animaux ont reçu un traitement par un douvicide nouveau, le Rafoxanide; les résultats de cet essai font l'objet d'une étude complète qui sera publiée ultérieurement.

C. Témoins

Soixante sérums témoins provenaient de bovins abattus à l'abattoir de Tananarive et reconnus indemnes de fasciolose. Le bilan exact de l'infestation par d'autres helminthes n'a pas été réalisable.

Douze sujets témoins ont été placés dans les mêmes conditions d'habitat et de nourriture que les quarante animaux infestés artificiellement. Ces animaux qui provenaient d'une région indemne de fasciolose, ont été contrôlés pendant un mois du point de vue coproscopique; à l'autopsie, ces animaux se sont révélés infestés par *Fasciola gigantica*, *Paramphistomum* sp. et *Setaria labiatopapillosa*.

II. TECHNIQUES D'ETUDE

Trois techniques ont été utilisées : *Précipitation en gélose* (méthode Oudin-Ouchterlony). *Fixation du complément* et *recherche de l'état d'hypersensibilité par injection intradermique*.

A. Matériel

a) *Sérums* : le sang des bovins est recueilli, par ponction veineuse de la jugulaire, en tube à essais. Le sérum, prélevé après la rétraction du caillot (à température ambiante) est conservé à moins 20° C jusqu'à son analyse.

b) *Antigène* : nous n'avons utilisé que des antigènes bruts ou délipidés, préparés selon des méthodes inspirées de celle décrite par R. DESCHIENS (9) et R. PAUTRIZEL (15).

1. Antigène destiné à la réaction de précipitation en gélose

Les douves sont récoltées vivantes dans les canaux biliaires aussitôt après l'abattage, lavées dans 5 bains successifs d'eau physiologique stérile à 4° C, triées, de façon à ne conserver que les spécimens en bon état, puis broyées aussitôt dans un appareil de type Turmix pré-refroidi au congélateur. Ce broyage est effectué en présence d'un égal volume d'eau physiologique froide. Lorsque le mélange est devenu homogène, il subit un cycle de 10 congélations (à moins 20° C) puis décongélations brutales (à 37° C) avant d'être réparti en ampoules de 2 ml qui seront conservées à moins 20° C ou lyophilisées.

2. Antigène destiné à la réaction de fixation du complément

Le broyat précédent est additionné d'eau physiologique de façon à obtenir une suspension finale contenant 1/10 de vers en poids sec. En pratique, les vers étant pesés humides après essorage, nous rajoutons 100 grammes de vers à 140 ml d'eau physiologique. Le broyat subit alors le cycle de congélation - décongélation et les débris solides sont éliminés par une centrifugation de 15 minutes à 2.000 tours par minute. Le surnageant est distribué en ampoules de 2 ml conservées à moins 20° C ou lyophilisées.

3. Antigène destiné à la réaction intra-dermique

Nous avons utilisé deux antigènes différents pour les injections intra-dermiques :

a) l'antigène de la fixation du complément décrit précédemment, après dilution à 10 p. 100.

b) un antigène délipidé préparé selon la méthode décrite par R. PAUTRIZEL (15); le cryolysat de Douves est traité par 5 fois son volume d'alcool absolu, puis d'éther, desséché sous vide et soumis à une extraction en eau distillée.

Nous avons dosé l'azote total de cet antigène et utilisé une dilution contenant 20 microgrammes d'azote par ml.

B. Exécution des réactions

a) Précipitation en gélose

La réaction est effectuée en boîte de Petri

où sont coulés 15 ml d'une gélose de composition suivante :

— Agar Noble (DIFCO)	6 g
— Merthiolate	0,1 g
— Tampon P.B.S.	700 ml

La réaction se produit, à température ordinaire, en 12 à 48 heures. Après ce délai, les boîtes sont placées à plus 4° C pour éviter les contaminations et la lecture définitive est effectuée après 6 jours.

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un ou plusieurs traits de précipitation, blancs, très nets, entre deux puits. On peut s'assurer de la spécificité du précipité antigène-anticorps par un lavage dans une solution de citrate trisodique ou un lavage prolongé en eau physiologique.

b) Fixation du complément

Nous utilisons la technique de Kolmer adaptée par R. DESCHIENS (9).

La réaction se lit après une heure à 37° C. Nous avons observé assez souvent des « phéno-

mènes de zone » et d'anticomplémentarité aux faibles dilutions des sérums, ce qui complique parfois la lecture.

c) Recherche de l'état d'hypersensibilité

L'état d'allergie a été recherché par la méthode des injections intra-dermiques d'antigène sur des bovins infestés artificiellement 15 semaines auparavant. Nous avons injecté simultanément à chaque bovin les deux antigènes précédemment décrits.

1. *L'antigène délipidé* est injecté dans le derme du pli sous-caudal, avec une seringue à tuberculination, sous le volume de 0,2 ml.

2. *L'antigène non délipidé*, qui est l'antigène de la fixation du complément (fraîchement préparé), est injecté dans le derme du plat de l'encolure, sans rasage préalable, sous le volume de 0,2 ml, avec une seconde seringue à tuberculination.

La réaction est appréciée par le diamètre de la zone réactionnelle (œdème) noté de la 15^e à la 90^e minute après l'injection.

RESULTATS

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de tableaux :

I. ANIMAUX NATURELLEMENT INFESTES

TABLEAU N° I

Animaux naturellement infestés

		R é s u l t a t s				
Précipitation en gélose	Bovins sûrement infestés (éliminant des oeufs de <i>Fasciola gigantica</i>)	20 précipitations spécifiques sur 79 sérums examinés				
	Bovins témoins non infestés	Aucune précipitation spécifique sur 60 sérums analysés.				
Fixation du complément	Bovins sûrement infestés (éliminant des oeufs de <i>Fasciola gigantica</i>)	D i l u t i o n d u s é r u m				
		Pur	1/2	1/4	1/8	1/16
		$\frac{7}{65}$	$\frac{3}{65}$	$\frac{9}{65}$	$\frac{8}{65}$	$\frac{5}{65}$
	Bovins témoins non infestés	D i l u t i o n d u s é r u m				
		Pur	1/2	1/4	1/8	1/16
		$\frac{18}{44}$	$\frac{2}{44}$	$\frac{0}{44}$	$\frac{2}{44}$	$\frac{0}{44}$

II. ANIMAUX INFESTES ARTIFICIELLEMENT

A. Précipitation en gélose

Aucun sérum d'animal infesté n'a présenté d'anticorps précipitant entre le 1^{er} et le 150^e jour suivant l'infestation (analyse mensuelle).

B. Fixation du complément

Cette méthode a été utilisée sur trois lots de bovins : infestés, infestés puis traités, non infestés. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU N°II

1-Lot de 28 animaux infestés non traités					
Titre de la fixation du complément	Nombre de sujets présentant ce titre				
	Avant infestation	3 semaines après	7 semaines après	11 semaines après	15 semaines après
Absence de fixation	16 sur 27	1 sur 27	2 sur 27	1 sur 24	Aucun
Fixation par sérum pur	9 sur 27	6 sur 27	Aucun	2 sur 24	4 sur 28
Fixation par sérum dilué à 1/2	2 sur 27	2 sur 27	1 sur 27	1 sur 24	3 sur 28
Fixation par sérum dilué à 1/4	Aucun	5 sur 27	5 sur 27	4 sur 24	1 sur 28
Fixation par sérum dilué à 1/8	Aucun	13 sur 27	4 sur 27	4 sur 24	7 sur 28
Fixation par sérum dilué à 1/16	Aucun	Aucun	15 sur 27	12 sur 24	13 sur 28
2-Lot de 10 animaux infestés et traités huit semaines plus tard (Sérums étudiés aux mêmes dates)					
Absence de fixation	5 sur 10	Aucun	1 sur 10	Aucun	Aucun
Fixation par sérum pur	4 sur 10	Aucun	Aucun	1 sur 7	Aucun
Fixation par sérum dilué à 1/2	1 sur 10	Aucun	1 sur 10	Aucun	1 sur 10
Fixation par sérum dilué à 1/4	Aucun	2 sur 10	1 sur 10	1 sur 7	1 sur 10
Fixation par sérum dilué à 1/8	Aucun	8 sur 10	4 sur 10	1 sur 7	2 sur 10
Fixation par sérum dilué à 1/16	Aucun	Aucun	3 sur 10	4 sur 7	6 sur 10
3-Lot de 12 animaux non infestés : sérums étudiés aux mêmes dates					
Absence de fixation	3 sur 7	2 sur 7	Aucun	2 sur 10	1 sur 12
Fixation par sérum pur	3 sur 7	3 sur 7	3 sur 10	2 sur 10	5 sur 12
Fixation par sérum dilué à 1/2	Aucun	1 sur 7	3 sur 10	2 sur 10	2 sur 12
Fixation par sérum dilué à 1/4	Aucun	Aucun	Aucun	1 sur 10	1 sur 12
Fixation par sérum dilué à 1/8	1 sur 7	1 sur 7	Aucun	Aucun	1 sur 12
Fixation par sérum dilué à 1/16	Aucun	Aucun	4 sur 10	3 sur 10	2 sur 12

C. Intra-dermo réaction

La réaction a été recherchée sur les trois lots précédents, le point d'injection de l'antigène étant observé toutes les 20 minutes, de la 15^e à la 90^e minute. Le diamètre de la zone d'infiltration réactionnelle a été mesuré au pied

à coulisse : il variait de 1 à 25 mm. Le plus grand nombre de réactions a été observé entre la 40^e et la 70^e minute. Si l'on ne prend en considération que les réactions d'un diamètre supérieur à 5 mm, le résultat global des intra-dermo réactions peut être résumé dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU N° III

Nombre de réactions d'un diamètre supérieur à 5 mm en fonction du moment de la lecture et de l'antigène injecté.

Lot de bovins	Réaction lue entre la 40 ^e ème et la 50 ^e ème minute		Réaction lue entre la 60 ^e ème et la 70 ^e ème minute	
	Antigène non délipidé (encolure)	Antigène délipidé (pli sous-caudal)	Antigène non délipidé (encolure)	Antigène délipidé (pli sous-caudal)
Témoins	2 sur 12	4 sur 12	2 sur 12	2 sur 12
Infestés non traités	9 sur 19	13 sur 19	11 sur 19	12 sur 19
Infestés traités	9 sur 10	8 sur 10	8 sur 10	7 sur 10

DISCUSSION

Nous examinerons successivement la valeur des trois méthodes étudiées dans le cas d'infestation, naturelle ou artificielle, par *Fasciola gigantica* et avec les méthodes et le matériel antigénique décrits précédemment.

1. Méthode de précipitation en gélose

En cas d'infestation artificielle : la méthode n'a pu détecter d'anticorps, même 15 semaines après l'infestation. Ceci s'explique par le taux élevé d'anticorps nécessaire à l'apparition de la réaction et diffère donc de ce qu'ont observé A. CAPRON (6) et J.J. SINCLAIR (17) chez le lapin ou M. BABENSKAS (1) chez les bovins infestés par *Fasciola hepatica*.

En cas d'infestation naturelle : la méthode a détecté 20 sujets sur 79 bovins infestés soit 16 à 36 p. 100 des cas (intervalle de confiance apprécié au risque 5 p. 100) sans jamais donner de résultats par excès. Ceci est en accord avec les résultats de FRICK (11) mais inférieur au taux rapporté par M.A. BABYANSKAS (2) dans l'infestation par *Fasciola hepatica*.

En conclusion : la facilité d'exécution de la réaction et la certitude du diagnostic, en cas de réponse positive, en font, dans certains cas, une méthode de valeur.

2. Méthode de fixation du complément

En cas d'infestation artificielle : les anticorps apparaissent très tôt. Leur titre est ensuite assez variable, comme le note A. CAPRON (6) chez le lapin, tout en restant assez élevé au moins jusqu'à la 15^e semaine suivant l'infestation.

Malheureusement, la méthode perd de sa valeur du fait de l'existence de réactions faussement positives, déjà observées par J. BENEX (3) et P.B. MATHUR (13) chez le mouton infesté par *Fasciola hepatica*.

En cas d'infestation naturelle : le taux d'anticorps est très variable selon les individus, sans doute du fait de la différence d'ancienneté et d'intensité des infestations.

En conclusion : Avec la méthode et les antigènes que nous avons utilisés, si nous admettons comme significatifs les taux supérieurs à la dilution 1/2, il serait possible de détecter 23 à 48 p. 100 des animaux infestés naturellement. Mais cette méthode donne 8 p. 100 de résultats par excès ce qui lui enlève beaucoup de sa valeur. Par ailleurs l'exécution de la réaction reste délicate et longue.

3. Méthode de l'intra-dermo-réaction

En cas d'infestation artificielle : Si l'on

admet comme positives les réactions égales ou supérieures à 5 mm, il serait possible de détecter par l'intra-dermo-réaction de 60 à 70 p. 100 des animaux infestés, l'intra-dermo-réaction au pli sous caudal avec l'antigène délipidé paraissant plus sensible. Après traitement des animaux infestés, la proportion de réactions positives atteint 80 à 90 p. 100, et c'est alors l'intra-dermo-réaction à l'encolure avec l'antigène non délipidé qui semble la plus sensible. L'hypersensibilité augmenterait notablement après traitement, vraisemblablement du fait de la lyse des parasites. On note cependant des réactions positives en excès pouvant aller jusqu'à 30 à 35 p. 100 des cas.

Les proportions de réactions positives apparaissent plus élevées si l'on combine les résultats obtenus avec les deux méthodes et les deux antigènes utilisés, ou si l'on combine les résultats obtenus aux deux périodes considérées. On atteint le pourcentage maximal en combinant les quatre paramètres, mais les résultats par excès suivent la même progression.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus en cas d'infestation par *Fasciola hepatica* où la proportion de résultats positifs, en cas d'infestation confirmée, est très différente selon les auteurs; elle varie de 50 à 100 p. 100 selon M. BABENSKAS (1), P. CABRAL GONCALVES (5), V. FAVATTI (10) W. FRICK (11), T.M. TOPACIO (19), J. VAREJCKO (20). Elle est de 100 p. 100 en

cas d'infestation par *Fasciola gigantica* selon B. PATNAIK (14).

CONCLUSION

Les méthodes de la fixation du complément et de l'intra-dermo-réaction peuvent compléter utilement le diagnostic d'infestation par *Fasciola gigantica* lorsque l'examen coproscopique est encore négatif, c'est-à-dire en début d'infestation.

Lors d'infestations anciennes, la méthode de précipitation en gélose peut confirmer les résultats coproscopiques ou permettre d'assurer des enquêtes sur le parasitisme à partir de collection de sérums.

En ce qui concerne les deux premières méthodes, on notera que les réactions faussement positives sont fréquentes alors que la coproscopie, qui donne des résultats plus tardifs, fournit souvent des résultats faussement négatifs.

Ceci est un phénomène fréquent en immunologie, particulièrement net dans l'étude des parasites constitués par une « mosaïque d'antigène » qui entraîne des réactions de groupe. A Madagascar, l'infestation concomitante par les helminthes du groupe des Trématodes suffirait à expliquer les fausses réactions observées : les relations immunitaires probables entre ces diverses trématodoses nécessiteraient, à elles seules, une étude spéciale complète.

SUMMARY

Study of intra-dermal, complement fixation and precipitin tests in cattle infected with *Fasciola gigantica*

Three tests (intra-dermal, complement fixation, double diffusion in agar) were performed in 209 cattle naturally or experimentally infected with *Fasciola gigantica*.

Intra-dermal test detected 60-70 p. 100 of infected animals (but 30-35 p. 100 false positive results) complement fixation 23-48 p. 100 (8 p. 100 false positive) and precipitin test 16-36 p. 100 (no false positive results).

RESUMEN

Estudio sobre la alergia, los anticuerpos precipitantes y los anticuerpos fijando el complemento durante la infestación de los bovinos por *Fasciola gigantica*

Se realizaron tres pruebas (intradermoreacción, fijación del complemento, doble difusión en gelosa) en 209 cebues naturalmente o artificialmente infestados por *Fasciola gigantica*.

La intradermoreacción revela 60 a 70 p. 100 de los animales infestados (pero con 30 a 35 p. 100 de resultados por exceso), la fijación del complemento 23 a 48 p. 100 (8 p. 100 de resultados por exceso) y la difusión en gelosa 16 a 36 p. 100 (sin resultado por exceso).

BIBLIOGRAPHIE

1. RABENSKAS (M.), « Immunological diagnosis of bovine fascioliasis », *Proc. 18th World Vet. Congr.* Paris, 1967, **1**: 131-34.
2. BABYANSKAS (M. A.), « Immunobiological reactions for diagnosis of fascioliasis in farm animals », *Proc. Conf. All-Union Soc. Helminth-Moscow*, déc. 1962, Part II: 15-16.
3. BENEX (J.), LAMY (L.), GLEDEL (J.), « Etude de la réaction de fixation du complément à l'antigène distomien chez le mouton », *Bull. Soc. Path. exot.*, 1959, **52** (1): 83-87.
4. BIGUET (J.), CAPRON (A.), TRAN VAN KY (P.), « Les antigènes de *Fasciola hepatica*, étude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres helminthes », *Ann. Parasit. hum. comp.* 1962, **37** (3): 221.
5. CABRAL GONCALVES (P.), LOPES SALES (R.), « Practical value of the skin test for *Fasciola* in cattle », *Rev. Fac. agron. vet.*, Porto Alegre 1964: 41-50.
6. CAPRON (A.) et collab., « Apport de la distomatose expérimentale à la connaissance de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica*. Aspects immunologiques », *Rev. Immunol.*, Paris, 1965, **29**: 25-42.
7. DAYNES (P.), « Note préliminaire sur la présence de *Fasciola gigantica* à Madagascar », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1967, **20** (4): 557-62.
8. DAYNES (P.), « Note sur les helminthoses des animaux domestiques reconnues à Madagascar », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1964, **17** (3): 477-90.
9. DESCHIENS (R.), BENEX (J.), LAMBAULT (E.), « Les conditions pratiques d'utilisation des antigènes parasitaires stabilisés dans le diagnostic immunologique des helminthiases », *Ann. Inst. Pasteur* 1961, **101** (6): 951-64.
10. FAVATI (V.), DELLA CROCE (G.), « Diagnosis of liver fluke infestation in cattle. Value of faecal examination plus allergic test », *Annal. Fac. Med. vet.*, Pisa, 1964, **17**: 75-86.
11. FRICK (W.), « Immunobiological detection of fascioliasis in cattle », *Arch. exp. Vet. Med.* 1968, **22**: 1011-13.
12. KOCH (H. W.), « Untersuchungen über die Brauchbarkeit von haemagglutination flocculation, Mikro-Agar-Präzipitation und des Immunofluoreszenz zum frühzeitigen Nachweis der Fasciologie des Rindes », *Inaug. Diss. Vet. Med. Fak. Freie Univ.*, Berlin, 1969, p. 28 (GE).
13. MATHUR (P. B.), « Versuche zur Feststellung der Brauchbarkeit der KBR für die *Fasciola hepatica*-diagnose », *Inaug. Diss. Freie Univ. Berlin*, 1966, p. 29.
14. PATNAIK (B.), DAS (K. M.), « Diagnosis of fascioliasis in cattle by intra-dermal allergic test », *Cornell. Vet.* 1961, **51**: 113-23.
15. PAUTRIZEL (R.) et collab., « Utilisation d'un antigène distomien délipidé dans le diagnostic allergique de la distomatose à *Fasciola hepatica* », *Rev. Immunol.*, Paris, 1962, **26**: 167-74.
16. SEWELL (M. M. H.), « The immunology of fascioliasis - II. Qualitative studies on the precipitin reaction », *Immunology*, 1964, **7**: 671-80.
17. SINCLAIR (I. J.), KENDALL (S. B.), « Precipitating antibodies to infection with *Fasciola hepatica* in rabbits », *Res. vet. Sci.* 1969, **10**: 483-85.
18. TAILLIEZ (R.), « Isolement et étude d'un antigène spécifique de la grande douve du foie *Fasciola hepatica* L. », *Biologie méd.* 1970, **59** (3): 183-287.
19. TOPACIO (T. M.), MARTIN (E. C.), « The diagnostic of fascioliasis in carabaos by the use of the intra-dermal allergic test », *Philipp. J. vet. Med.* 1963, **2**: 153-59.
20. VAREJCKO (J.), « An allergic, intradermal and intrapalpebral test for diagnosis of fascioliasis in cattle », *Sb. vys. Šk. zeměd Brne*, 1965, Ser B 13.