

Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des bovins naturellement infectés

M. Desquesnes^{1,2*} Z. Bengaly² M.L. Dia²

Mots-clés

Bovin – *Trypanosoma vivax* – Test Elisa – Epidémiologie – Burkina Faso.

Résumé

La connaissance de l'incidence et de la prévalence des infections est essentielle dans les études épidémiologiques des trypanosomoses chez le bétail. Ces études reposent sur des techniques de diagnostic directes et indirectes. Les examens parasitologiques ont une très faible sensibilité. La détection par PCR a une meilleure sensibilité, mais ne permet pas la détection de la plupart des infections chroniques. La détection des anticorps dirigés contre les trypanosomes par Elisa-indirect est l'outil le plus adapté pour évaluer l'importance des trypanosomoses dans les populations bovines. Toutefois, la détection des anticorps chez les bovins ne signifiant pas que les animaux sont activement infectés, la connaissance de la persistance des anticorps après traitement curatif ou élimination naturelle des parasites est essentielle pour l'interprétation des résultats. La persistance des anticorps anti-*Trypanosoma vivax* a été évaluée par Elisa-indirect chez 32 bovins métis (zébu x Baoulé) naturellement infectés par *Trypanosoma vivax*, après traitement à l'acéturate de diminazène (7 mg/kg par voie intramusculaire). Avec une séroprévalence initiale de 100 p. 100, la chute des anticorps a été sensible trois mois plus tard, pour atteindre une séroprévalence de 3 p. 100 cinq mois après le traitement. Les cas positifs persistants étaient dus à la persistance de l'infection ou la réinfection de deux animaux pendant le suivi (animaux éliminés de la cohorte) et un cas non expliqué. La séroprévalence a décru plus rapidement chez les jeunes. Il est suggéré que la séroprévalence en Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* quatre à cinq mois après un traitement curatif indique la prévalence des infections actives.

■ INTRODUCTION

La connaissance de l'incidence et de la prévalence des infections est essentielle dans les études épidémiologiques des trypanosomoses chez le bétail. Ces études reposent sur des techniques de diagnostic directes et indirectes. Les examens parasitologiques ont une très faible sensibilité. La détection par PCR a une meilleure sensibilité, mais les examens restent le plus souvent négatifs pendant les phases chroniques des infections (1). La détection des anticorps dirigés contre les trypanosomes est l'outil le plus adapté pour évaluer l'importance des trypanosomoses dans les populations bovines. La méthode Elisa-indirect est la plus fiable et

1. Cirad-emvt, TA30/B, campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

2. CirDES, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso
Fax : +226 97 23 20

*Auteur pour la correspondance
E-mail : m.desquesnes@fasonet.bf

la mieux adaptée aux études de grande envergure. Plusieurs méthodologies de standardisation ont été développées pour apporter à l'Elisa-indirect des paramètres de reproductibilité, de sensibilité et de spécificité satisfaisants (2, 6, 13). Toutefois, la détection des anticorps anti-trypanosomes chez un animal ne signifie pas que ce dernier est porteur de parasites, puisque les anticorps peuvent persister après un traitement curatif ou une guérison spontanée pendant une durée variable selon les auteurs, les techniques utilisées et certaines caractéristiques propres à l'hôte, en particulier l'âge des sujets (8). La connaissance de la durée de persistance des anticorps est donc d'un grand intérêt pour permettre l'interprétation des résultats d'enquêtes sérologiques (3). Afin de déterminer la durée de persistance des anticorps dirigés contre les antigènes solubles de *Trypanosoma vivax*, un lot de bovins métis de tous âges, naturellement infectés par *T. vivax* et positifs en Elisa-indirect *T. vivax* a été traité à l'acéturate de diminazène et suivi régulièrement jusqu'à ce que la majorité des animaux soit devenus négatifs.

■ MATERIEL ET METHODES

Les examens sérologiques ont été effectués dans trois systèmes Elisa-indirect à l'aide des antigènes solubles de *T. vivax* (Zaria 81/Y486/699) (9), *T. brucei* (MI-Tat1.2, lysat de trypanosomes aimablement fourni par J. Katende) (4) et *T. congolense* type savane (IL1392) (9), et d'un conjugué commercial dirigé contre les immunoglobulines G de bovins (A5295, Sigma®), selon un protocole précédemment décrit (7). Les résultats des Elisa sont exprimés en pourcentage de positivité (PP) par rapport à des échantillons de référence positifs et négatifs. Le seuil de positivité du test établi dans une étude antérieure est de 20 p. 100 (7).

Afin d'éviter l'interférence des autres espèces de trypanosomes (*T. congolense*, *T. brucei*), l'étude a été menée dans un secteur de très faible pression glossinienne, dans lequel la majorité des infections du bétail sont dues à *T. vivax*. La région de Lahirasso, Burkina Faso, a été retenue à la suite d'enquêtes préliminaires portant sur la présence et l'abondance des vecteurs (glossines et tabanides), et sur l'identification des espèces de trypanosomes rencontrés chez le bétail (Rayaisé et coll., résultats non publiés). Deux troupeaux ont été suivis entre décembre 1999 et avril 2000 (saison sèche), dans lesquels les séroprévalences en Elisa-indirect *T. congolense* et Elisa-indirect *T. brucei* étaient inférieures à 7 p. 100.

Trente-cinq bovins métis (zébu, *Bos indicus* x Baoulés, *Bos taurus*) trouvés positifs en Elisa-indirect *T. vivax*, et négatifs en Elisa-indirect *T. brucei* et Elisa-indirect *T. congolense*, d'un âge compris entre six mois et 14 ans, ont été identifiés par une boucle auriculaire. Un traitement à l'acéturate de diminazène (Veriben®, Ceva), à la dose de 7 mg/kg en intramusculaire, a été appliqué à l'ensemble des animaux. Des prélèvements sanguins réguliers ont été réalisés à la jugulaire sur 32 de ces animaux, à l'aide de tubes sous vide héparinés, avec une fréquence mensuelle à compter du deuxième mois suivant le traitement. Les examens parasitologiques ont été réalisés sur ces échantillons par observation du *buffy coat* en microscopie à contraste de phase (x 400) (11) et les examens sérologiques en Elisa-indirect *T. vivax*, comme indiqué précédemment.

Les animaux trouvés porteurs de trypanosomes au cours du suivi ont été considérés comme présentant une résurgence d'infection ou ayant été réinfectés ; chez eux la persistance des anticorps ne pouvait être mesurée ; ils ont été éliminés de la cohorte pour l'établissement de la séroprévalence à chaque passage. L'évolution des PP en Elisa-indirect *T. vivax* a été décrite individuellement et calculée en moyenne pour chaque classe d'âge. Pour ce faire, les animaux ont été regroupés en quatre classes d'âge comme suit : (C1) de 6 mois à 2 ans, (C2) de 2 à 4 ans, (C3) de 4 à 8 ans et (C4) de 8 à 14 ans.

■ RESULTATS

L'enquête préliminaire, réalisée dans deux élevages où 66 et 86 bovins de tous âges ont été prélevés, a révélé des prévalences sérologiques de 24 et 31 p. 100 en Elisa-indirect *T. vivax*, 6 et 3,5 p. 100 en Elisa-indirect *T. brucei*, et 1,5 et 5 p. 100 en Elisa-indirect *T. congolense*. Sept animaux ont été trouvés porteurs de *T. vivax* ; aucune autre espèce de trypanosome n'a été détectée pendant toute la durée du suivi. Les PP de tous les animaux ont été supérieurs en Elisa *T. vivax* par rapport aux autres tests. Seuls les animaux dont les résultats sérologiques ont été positifs en Elisa-indirect *T. vivax* et négatifs dans les deux autres systèmes ont été retenus.

Les PP en Elisa-indirect *T. vivax* des 32 animaux présents lors des cinq prélèvements ont été compris entre 25 et 80 p. 100 au début du suivi. La chute des anticorps a été sensible à partir du troisième mois suivant le traitement. Deux animaux ont été trouvés porteurs de *T. vivax* quatre et cinq mois après le traitement, et ont été éliminés de la cohorte pour le calcul de la séroprévalence mensuelle. Chez les trente autres bovins, la prévalence des animaux positifs en Elisa-indirect *T. vivax* est passée de 100 à 3 p. 100, cinq mois après le traitement (figure 1). Un seul animal est resté positif au terme du suivi, avec un PP relativement élevé (63 p. 100) qui suggère qu'il était toujours, ou à nouveau, infecté.

Les 32 animaux de la cohorte comprenaient quatre classes d'âge ayant chacune un effectif de huit bovins. Dans l'ensemble, les PP ont diminué régulièrement pour passer en dessous du seuil de positivité entre trois et cinq mois après le traitement. Trois animaux ont fait exception, dont les deux trouvés porteurs de parasites qui ont présenté une chute régulière des PP jusqu'au quatrième mois, puis un regain brutal au cinquième mois pour retrouver des valeurs proches de celles observées au début du suivi.

L'évolution des PP moyens par classe d'âge dans la cohorte des 30 animaux trouvés non infectés est présentée à la figure 2 ; tous les écarts-types sont compris entre 7 et 11 p. 100. La figure montre une diminution des PP en Elisa-indirect *T. vivax* sensiblement plus rapide dans les classes d'âge 1 et 2. Tous les animaux de moins de deux ans ont été séronégatifs au quatrième mois. La classe 3, dans laquelle la séroprévalence est restée la plus élevée, a été celle contenant l'animal resté positif sans que des parasites aient été observés. Parmi les animaux de moins de quatre ans, 92 p. 100 ont été séronégatifs au quatrième mois contre 78 p. 100 parmi ceux de plus de quatre ans. Le PP moyen de toutes les classes d'âges a été inférieur au seuil de positivité du test dès le quatrième mois (figure 2).

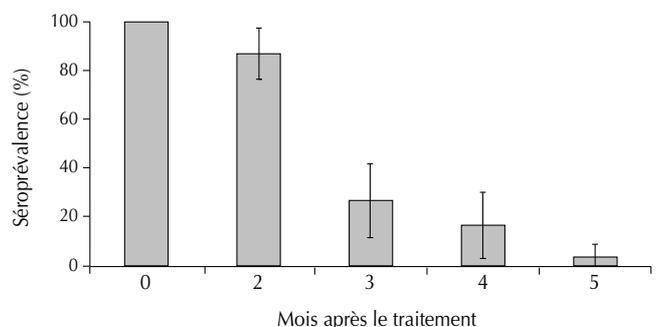


Figure 1 : évolution de la séroprévalence des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* chez 30 bovins initialement positifs, après un traitement à l'acéturate de diminazène. Les traits verticaux représentent les écarts-types des valeurs.

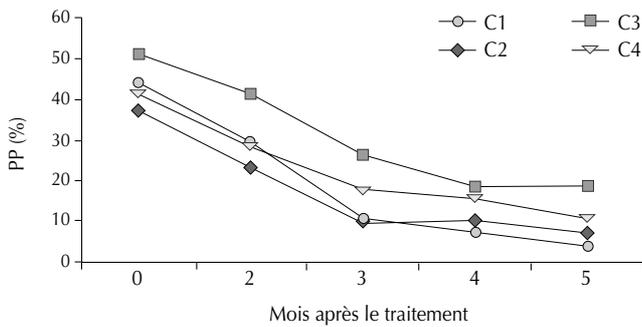


Figure 2 : évolution chez 30 bovins des pourcentages de positivité (PP) moyens par classe d'âge en Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement à l'acéturate de diminazène. C1 = de 6 mois à 2 ans ; C2 = de 2 à 4 ans ; C3 = de 4 à 8 ans ; C4 = de 8 à 14 ans.

DISCUSSION

Les examens parasitologiques réalisés dans les deux troupeaux (portant sur 152 animaux) n'ont révélé que la présence de l'espèce *T. vivax* pendant toute la durée du suivi, confirmant l'absence d'interférence des autres *Trypanosoma* sp. dans le protocole. La cohorte, initialement constituée de 32 animaux, a dû être réduite à 30 à la suite de la détection de *T. vivax* chez deux individus. L'absence de détection du parasite chez le troisième individu pourtant resté positif en Elisa a été probablement due à la sensibilité insuffisante de l'examen parasitologique, car l'évolution du PP chez cet animal a été très proche de celle présentée chez les deux animaux précédents. En particulier, le regain de PP au cinquième mois a semblé indiquer une relance immune due au portage du parasite. A cette exception près, tous les animaux ont donc été séronégatifs cinq mois après le traitement.

L'élimination des anticorps a été plus précoce chez les jeunes animaux, conformément à d'autres études, certains auteurs préconisant l'utilisation d'un seuil de positivité évoluant en fonction de l'âge (8) ; toutefois les gains de spécificité sont toujours préjudiciables à la sensibilité du test. Il n'a pas été observé de persistance particulièrement longue chez les animaux âgés ; c'est la classe d'âge intermédiaire (C3, de quatre à huit ans) qui a présenté la plus forte persistance. Il est possible que la persistance passe par un maximum chez les adultes pour diminuer ensuite chez les animaux plus âgés. Selon que l'on considère ou non le cas particulier de l'animal présentant constamment des PP élevés, respectivement 83 à 86 p. 100 des animaux de la cohorte ont éliminé les anticorps détectables par Elisa-indirect au quatrième mois et 97 à 100 p. 100 les ont éliminés au cinquième mois.

Les résultats obtenus dans cette étude sont très proches de ceux publiés par Desquesnes (6) en Elisa indirect *T. vivax* chez des bovins de Guyane française. Ils sont également très proches de ceux de Bocquentin et coll. (3) en Elisa-indirect *T. congolense* qui ont observé l'élimination des anticorps chez les bovins quatre mois après un traitement curatif ; les protocoles Elisa utilisés dans l'ensemble de ces travaux sont très voisins. La persistance observée est en revanche éloignée de celle décrite par Van den Bossche et coll. en Elisa *T. congolense* (12) qui atteint 13 mois ; toutefois, dans leur étude les échantillons sont préparés à partir de sang total récolté sur papier filtre et non à partir de sérum ou de plasma. Il est possible que le mode de préparation des échantillons, ainsi que les protocoles Elisa différents soient à l'origine de ces variations, mais le nombre (sept), le type d'animaux (Mashona), les conditions d'élevage (alimentation, maladies intercurrentes...) pourraient également en être responsables.

La connaissance de la persistance des anticorps détectés par l'Elisa-indirect *T. vivax* chez les bovins permet d'améliorer l'interprétation des tests sérologiques. En effet, des tests pratiqués plus de quatre mois après un traitement permettent d'estimer la prévalence des animaux étant restés infectés ou ayant été réinfectés depuis ce traitement. Appliquée dans ces conditions, la détection des anticorps dirigés contre les trypanosomes permet des études épidémiologiques plus précises. Néanmoins, le taux de persistance du portage de parasites à la suite du traitement (échec de traitement), le taux de réinfection et le taux d'élimination naturelle de parasites ne peuvent être dissociés. Seule l'incidence apparente peut être appréciée par cette technique.

Les résultats apportés par la présente étude pour l'Elisa-*T. vivax* ainsi que ceux obtenus par Bocquentin et coll. (3) en Elisa *T. congolense* permettent de proposer d'effectuer un prélèvement tous les quatre à cinq mois, assorti d'un traitement à dose curative à l'aide de l'acéturate de diminazène (7 mg/kg) pour réaliser l'étude de l'incidence saisonnière des principales trypanosomoses bovines. Un tel protocole mené sur une année permet de connaître la prévalence des infections à deux ou trois saisons différentes. Ces prévalences saisonnières sont une approche de l'incidence des infections. La séroprévalence obtenue cinq mois après un traitement curatif indique le taux d'animaux étant restés (échec de traitement) ou étant entrés en contact (réinfection) avec le parasite depuis la date de traitement ; elle est une approche optimale du nombre d'animaux activement infectés au moment du prélèvement.

Remerciements

Nous remercions vivement le directeur du Cirades pour son soutien permanent, les techniciens du Cirades pour leur constance sur le terrain, ainsi que les éleveurs de Lahirasso pour nous avoir permis un accès régulier à leurs animaux.

BIBLIOGRAPHIE

- BENGALY Z., KASBARI M., DESQUESNES M., SIDIBE I., 2001. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet. Parasitol.*, **96**: 101-113.
- BOCQUENTIN R., DUVALLET G., 1990. Amélioration de la reproductibilité du test Elisa adapté à la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* chez les bovins. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **43** : 179-186.
- BOCQUENTIN R., VERY P., DUVALLET G., 1990. Cinétique des anticorps après traitement trypanocide chez les bovins infectés expérimentalement ou naturellement. Intérêt épidémiologique. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **43** : 479-483.
- CROSS G.A.M., 1977. Antigenic variation in trypanosomes. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **26**: 240-244.
- DESQUESNES M., 1997. Les trypanosomoses du bétail en Amérique latine, étude spéciale dans le Plateau des Guyanes. Thèse Doct. Parasitologie, université de Lille II, France, 409 p.
- DESQUESNES M., 1997. Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques : méthode, intérêts et limites. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **16** : 809-823.
- DESQUESNES M., BENGALY Z., MILLOGO L., MEME Y., SAKANDE H., 2001. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-Elisa for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **95**: 141-155.
- GREINER M., SHIVARAMA B.T.P., KAKAIRE D., SHARES G., BOHNING D., ZESSIN K., MEHLITZ D., 1997. Impact of biological factors on the interpretation of bovine trypanosomosis serology. *Prev. vet. Med.*, **30**: 61-73.

9. GUIDOT G., ROELANTS G.E., 1982. Sensibilité de taurins Baoulé et de zébus à *Trypanosoma (Duttonella) vivax* et *T. (Nannomonas) congolense*. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **35** : 233-244.
10. HOPKINS J.S., CHITAMBO H., MACHILA N., LUCKINS A.G., RAE P.F., VAN DE BOSSCHE P., EISLER M., 1998. Adaptation and validation of antibody-Elisa using dried blood spots on filter paper for epidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomiasis in cattle. *Prev. vet. Med.*, **37**: 91-99.
11. MURRAY M., MURRAY P.K., MCINTYRE W.I.M., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **71**: 325-326.

12. VAN DEN BOSSCHE P., CHIGOMA D., SHUMBA W., 2000. The decline of anti-trypanosomal antibody levels in cattle after treatment with trypanocidal drugs and in the absence of tsetse challenge. *Acta trop.*, **77**: 263-270.
13. WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN R., LELENTA M., JEGGO M.H., 1993. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **12**: 435-450.

Reçu le 12.02.2002, accepté le 04.06.2004

Summary

Desquesnes M., Bengaly Z., Dia M.L. Assessment of Persistence of Antibodies Detected by Indirect-Elisa *Trypanosoma vivax* after Trypanocidal Treatment in Cattle Naturally Infected

Determination of infection incidence and prevalence is essential in the epidemiological study of cattle trypanosomiasis. These studies are based on direct and indirect diagnostic techniques. Parasitological techniques are of low sensitivity. PCR detection has a better sensitivity, which is not, however, sufficient to detect most chronic infections. Detection by indirect-ELISA of antibodies directed against trypanosomes is the best-adapted tool to assess the magnitude of trypanosome infections in cattle populations. However, the detection of antibodies in cattle does not mean the animals are actively infected; determining antibody persistence after curative treatment or natural self cure are essential in analyzing the results. In the present paper, persistence of anti-trypanosome antibodies was evaluated by indirect-ELISA in 32 crossbred cattle (zebu x Baoule) naturally infected by *Trypanosoma vivax*, after treatment with diminazene aceturate (7 mg/kg i.m.). The initial seroprevalence was 100%; the decline in antibodies started three months later to reach a seroprevalence of 3% five months after treatment. Persistent positive cases were due to the persistence of the infection or to natural reinfection in two animals during the study (they were excluded from the cohort), and to one case unaccounted for. Seroprevalence decreased faster in the young. It is suggested that the seroprevalence by indirect-ELISA against *T. vivax* four or five months after a curative treatment indicates the prevalence of active infections.

Key words: Cattle – *Trypanosoma vivax* – ELISA – Epidemiology – Burkina Faso.

Resumen

Desquesnes M., Bengaly Z., Dia M.L. Evaluación de la persistencia de anticuerpos detectados mediante ELISA indirecto *Trypanosoma vivax* tras tratamiento tripanocida en bovinos infectados naturalmente

El conocimiento de la incidencia y la prevalencia de las infecciones es esencial en los estudios epidemiológicos de las tripanosomiasis en el ganado. Estos estudios se basan en técnicas de diagnóstico directas e indirectas. Los análisis parasitológicos tienen una sensibilidad muy baja. La detección por PCR tiene mejor sensibilidad, pero no permite la detección de la mayoría de las infecciones crónicas. La detección de los anticuerpos dirigidos contra los tripanosomas mediante ELISA indirecto es la herramienta más adaptada para evaluar la importancia de los tripanosomas en las poblaciones bovinas. No obstante, y como la detección de los anticuerpos en los bovinos no significa que los animales estén activamente infectados, el conocimiento de la persistencia de los anticuerpos tras tratamiento curativo o eliminación natural de los parásitos es esencial para la interpretación de los resultados. Se evaluó, mediante ELISA indirecto, la persistencia de los anticuerpos anti-*trypanosoma vivax* en 32 bovinos cruzados (cebu x Baoulé) infectados naturalmente por *Trypanosoma vivax*, tras tratamiento con aceturato de diminazeno (7 mg/kg por vía intramuscular). Con una seroprevalencia inicial de 100%, la caída de los anticuerpos fue sensible tres meses más tarde, obteniendo una seroprevalencia del 3% cinco meses después del tratamiento. Los casos positivos persistentes se debían a la persistencia de la infección o la reinfección de dos animales durante el seguimiento (animales eliminados de la cohorte) y a un caso no explicado. La seroprevalencia disminuyó más rápidamente en los jóvenes. Se sugiere que la seroprevalencia en ELISA indirecto *Trypanosoma vivax* cuatro a cinco meses después de un tratamiento curativo revela una prevalencia de infecciones activas.

Palabras clave: Ganado bovino – *Trypanosoma vivax* – ELISA – Epidemiología – Burkina Faso.