

Étude de l'action anthelminthique d'un dérivé halogéné de la Salicylanilide⁽¹⁾ vis-à-vis de *Fasciola gigantica*

par A. BOUCHET (*), P. DAYNES (*), M. BIRGI (**)

RESUME

Les auteurs ont étudié l'action d'un nouveau fasciolide : le Rafoxanide sur des zébus infestés expérimentalement par des métacercaires de *Fasciola gigantica*. L'essai a été réalisé sur 35 animaux. Les métacercaires utilisés provenaient de limnées infestées naturellement. Les contrôles d'infestation ont été réalisés par l'étude de l'éosinophilie, des protéinogrammes et de la fixation du complément. L'efficacité du traitement a été appréciée par la numération des parasites à l'autopsie. A la dose de 5 mg/kg, 97 p. 100 des parasites adultes sont tués, à 7,5 mg/kg l'activité du produit est de 100 p. 100. Pour les douves immatures âgées de 8 semaines, des doses supérieures sont nécessaires : le produit est actif à 92 p. 100 à la posologie de 15 mg/kg et à 98,5 p. 100 à la dose de 20 mg/kg. Après le traitement, les animaux récupèrent un état de santé très satisfaisant.

INTRODUCTION

C'est en 1966 qu'a été mise en évidence la fasciolose bovine à *Fasciola gigantica* à Madagascar. Les conditions climatiques locales favorisant le développement de l'hôte intermédiaire *Limnaea natalensis*, la fasciolose des bovins prend alors une extension de plus en plus importante et devient l'un des problèmes pathologiques majeurs de l'élevage malgache.

A la suite des résultats positifs obtenus avec divers autres fasciolicides, il nous a semblé intéressant de tester le 3,5-diiodo-3'-chloro-4'-(p-chlorophenoxy)-salicylanilide, ou Rafoxanide, vis-à-vis de *Fasciola gigantica*.

MATERIEL ET METHODE

L'étude de l'action fasciolicide du Rafoxanide a été réalisée sur des zébus infestés artificiellement par des métacercaires de *Fasciola gigantica*, le traitement a été réalisé à différentes posologies sur des animaux porteurs soit de douves adultes, soit de douves immatures.

A. Animaux d'expérience

Une soixantaine d'animaux de race zébu malgache, âgés de 2 à 3 ans, ont été achetés dans une région indemne de fasciolose. Trente-cinq animaux ont été retenus après les examens cliniques préliminaires, les pesées et les tuberculinations; ils ont été placés en stabulation libre, et mis à l'abri de toute ingestion accidentelle de métacercaires.

Les sujets ont été laissés un mois au repos avant le début de l'expérience. Pendant ce laps de temps, diverses opérations ont été pratiquées : douchages ixodiques; vaccinations

(1) Commercialisé sous le nom de Rafoxanide par Merck, Sharp et Dohme.

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire Central de l'Elevage, Tananarive. B.P. n° 862.

(**) I.E.M.V.T., Laboratoire de Farcha, Fort-Lamy. B.P. n° 433.

anti-charbon symptomatique et anti-charbon bactérien (principales maladies contagieuses sévissant à Madagascar); traitement contre les Nématodes et les Cestodes (mélange Niclosamide et Thiabendazole); détermination des constantes sanguines; examen clinique régulier.

Contrôle de l'absence de fasciolose

Par coproscopies : 3 examens par animal; examens sérologiques (précipitation en gélose - fixation du complément); formules leucocytaires et protéinogrammes et examen clinique.

Les animaux ont été répartis en six lots comme indiqué au tableau I :

TABLEAU N° I

L o t	Nombre d'animaux	Destination
A ₁	5	Animaux infestés et traités 16 semaines après l'infestation, à la dose de 5 mg/kg.
A ₂	5	Animaux infestés et traités 16 semaines après l'infestation, à la dose de 7,5 mg/kg.
A ₃	5	Animaux infestés et traités 8 semaines après l'infestation, à la dose de 15 mg/kg.
A ₄	5	Animaux infestés et traités 8 semaines après l'infestation, à la dose de 20 mg/kg.
B	10	Animaux témoins infestés non traités.
C	5	Animaux témoins non infestés.

B. Infestation expérimentale

Les métacercaires de *Fasciola gigantica* ont été récoltées à partir de limnées sauvages naturellement infestées; elles ont été dénombrées puis, après avoir subi une maturation d'une semaine à la température du laboratoire, elles ont été stockées au réfrigérateur pendant envi-

ron 2 mois en attendant le jour de l'infestation.

Le pouvoir infestant des métacercaires récoltées et conservées au froid a été contrôlé sur 2 moutons, par la recherche de l'éosinophilie et le dénombrement des douves trouvées à l'autopsie six semaines après l'infestation. Les résultats sont rassemblés ci-après au tableau II.

TABLEAU N° II

Animaux	Nombre de métacercaires administrées	Pourcentage d'éosinophiles avant l'infestation	Pourcentage d'éosinophiles 6 semaines après l'infestation	Nombre de douves à l'autopsie 6 semaines après l'infestation
Mouton n°1	150	1,31	13	10
Mouton n°2	150	3,22	19,1	14

Compte tenu de ces résultats chaque zébu de l'essai a reçu 800 métacercaires.

C. Contrôle de l'infestation

1. Contrôles directs : ils ont été réalisés par l'autopsie des témoins (voir plus loin).

2. Contrôles indirects : ils ont été effectués par :
la recherche de l'éosinophilie; les protéinogrammes et la fixation du complément.

a) *Variations du pourcentage d'éosinophiles*
Il est représenté au tableau III.

TABLEAU N° III

	Avant infestation	j + 8 semaines	j + 15 semaines
E	5,78	12,40	16,38
T	5,03	9,00	6,88
F	0,87	4,71*	22,28**
S ² E	8,48	18,40	24,49
D.L.	37	38	25

F 0,05 pour 1 et 36 D.L. : 4,11

F 0,01 pour 1 et 36 D.L. : 7,35

F 0,05 pour 1 et 25 D.L. : 4,24

F 0,01 pour 1 et 25 D.L. : 7,77

j sera considéré dorénavant comme étant le jour de l'infestation.

E représente les animaux infestés,

T représente les témoins non infestés,

DL nombre de degrés de liberté,

* significatif au seuil P = 0,05,

** significatif au seuil P = 0,01.

Nous comparons les pourcentages d'éosinophiles chez les infestés et les témoins aux 3 dates retenues. Les infestés, équivalant aux témoins en début d'essai, présentent ensuite des pourcentages d'éosinophiles significativement supérieurs au seuil de 5 p. 100 à j + 8 semaines et au seuil de 1 p. 100 à j + 15 semaines. Les infestés voient leurs pourcentages d'éosinophiles s'accroître régulièrement avec des chiffres significativement supérieurs à j + 15 semaines (au seuil de 1 p. 100) à ceux obtenus à j + 8 semaines, eux-mêmes significativement supérieurs à ceux obtenus avant l'infestation.

b) Protéinogramme

L'analyse statistique fait apparaître chez les infestés une augmentation des globulines particulièrement nette pour les α globulines; pour les γ globulines, cette augmentation n'est visible qu'à j + 3 semaines en comparant les témoins aux infestés.

En ce qui concerne les albumines, on n'observe pas de diminution dans le temps chez les animaux infestés; par contre, le pourcentage d'albumine croît chez les témoins non infestés. L'excellente nourriture donnée aux animaux aurait permis aux témoins d'augmenter leur taux de sérum-albumine et en aurait ainsi masqué la diminution chez les infestés : néanmoins, la différence entre non-infestés et infestés est statistiquement significative.

c) Fixation du complément

La réaction a été effectuée avec des antigènes bruts et délipidés. Les résultats obtenus nous montrent que les anticorps apparaissent très tôt, dès la troisième semaine; leur titre

est ensuite assez variable, tout en restant assez élevé jusqu'à la 15^e semaine suivant l'infestation; malheureusement, l'existence de réactions faussement positives oblige à une certaine prudence dans leur interprétation.

d) Valeur de ces méthodes

Aucune de ces méthodes n'est réellement spécifique et n'a valeur de preuve formelle d'une infestation à *Fasciola gigantica*. C'est pourquoi nous avons recherché le maximum de contrôles constituant un faisceau d'arguments permettant de conclure à la réalité de l'infestation.

D. Traitement

Le traitement a été réalisé par voie buccale avec une suspension de Rafoxanide à 11,34 p. 100.

E. Autopsie des animaux

Tous les animaux de l'essai ont été abattus puis autopsiés. La date d'abattage diffère selon les lots (voir le tableau de constitution des lots).

Après examen macroscopique de chaque foie, le parenchyme hépatique est incisé puis coupé en fragments d'un huitième de cm³ environ; chaque morceau au fur et à mesure de la découpe est pressé manuellement pour en extraire les douves qui sont alors récupérées.

L'ensemble du foie ainsi traité est ensuite pilé au mortier, puis mélangé à de l'eau; le tout est agité violemment puis est enfin examiné sur fond noir en fines couches liquidiennes.

Les vésicules biliaires sont également examinées.

Les douves récoltées au cours de ces opérations sont placées dans de l'eau physiologique voisine de 37°, ce qui permet d'apprécier leur vitalité.

Les parasites étant parfois sectionnés, on ne tient compte, pour la numération, que des fragments possédant la ventouse buccale.

ETUDE DU POUVOIR FASCIOLICIDE DU RAFOXANIDE

A. Macroscopies des foies

Tous les foies des animaux infestés autopsiés présentent une homogénéité certaine dans leur aspect macroscopique : extérieur souvent blanchâtre, traces cicatricielles fibreuses sur le parenchyme hépatique, angiocholite débutante; à la section, on reconnaît assez souvent un début de cirrhose.

B. Numération des parasites

Le nombre de *Fasciola* rencontrées lors des autopsies apparaît dans les tableaux n° IV, V, VI.

Action ovicide du produit

Les culots de centrifugation des liquides biliaires ont été examinés. 5 animaux sur 8 des lots A₁ et A₂ possédaient des œufs de *Fasciola* dans leur bile. La plupart des œufs étaient anormaux : opercule ouvert, coque vide ou éclatée.

Aspect des douves tuées après traitement

Les parasites sont étalés, immobiles, de couleur très variable : soit blancs, soit jaune-vert, parfois marron.

Leur structure interne n'est pas discernable. Certaines douves sont entières, d'autres fragmentées, assez souvent en voie de lyse; nous avons fréquemment trouvé, dans les canaux biliaires, des magmas jaune brunâtre sans aucune structure apparente qui semblent être des parasites en voie de décomposition.

TABLEAU N° IV

Témoins infestés non traités (lot B)

Nombre d'animaux	Date autopsie	Nombre total de douves	Moyenne du nombre de douves par animal
10	16 semaines après l'infestation	685	68,5

TABLEAU N° V

Animaux traités 8 semaines après l'infestation

Lot	Nombre d'animaux	Date autopsie	Posologie	Nombre total de douves vivantes trouvées à l'autopsie
A ₃	5	9 semaines après le traitement	15 mg/kg	27
A ₄	5	9 semaines après le traitement	20 mg/kg	5

TABLEAU N° VI

Animaux traités 16 semaines après l'infestation

Lot	Nombre d'animaux	Date autopsie	Posologie	Nombre total de douves mortes trouvées à l'autopsie	Nombre total de douves vivantes trouvées à l'autopsie
A ₁	5	5 jours après le traitement	5 mg/kg	270	9
A ₂	5	5 jours après le traitement	7,5 mg/kg	333	0

C. Interprétation des résultats - Discussion

1. TAUX D'EFFICACITE

a) Méthode de calcul

1^{er} cas : L'autopsie des animaux a été pratiquée quelques jours après le traitement : la plupart des douves tuées par le médicament sont encore présentes dans les canaux biliaires.

Soit :

N_1 = nombre total de douves tuées par le médicament pour un lot de 5 animaux;

N_2 = nombre total de douves encore vivantes pour le même lot.

Le taux d'efficacité du produit s'établira ainsi :

Pourcentage d'efficacité :

$$\frac{N_1 \times 100}{(N_1 + N_2)}$$

2^e cas : L'autopsie des animaux a été faite plusieurs semaines après le traitement : toutes

les douves tuées par le médicament ont été éliminées des canaux biliaires.

Soit :

N = le nombre total des douves retrouvées dans les foies des animaux témoins infestés non traités;

N' = celui des douves encore présentes dans les foies de 5 animaux d'un lot traité;

$N/5$ = n sera le nombre moyen de douves pour un animal non traité;

$N'/5$ = n' celui des douves ayant résisté au traitement chez un animal traité pour une dose thérapeutique donnée.

Le taux d'efficacité du produit s'établira ainsi :

Pourcentage d'efficacité :

$$\frac{(n - n') \times 100}{n}$$

b) Résultats

Les résultats apparaissent au tableau n° 7.

TABLEAU N°VII

L o t	Nombre d'animaux	Posologie	Age des douves au moment du traitement	Pourcentage d'efficacité du Rafoxanide
A ₁	5	5 mg/kg	16 semaines	96,8
A ₂	5	7,5 mg/kg	16 semaines	100
A ₃	5	15 mg/kg	8 semaines	92,1
A ₄	5	20 mg/kg	8 semaines	98,5

Activité sur des douves âgées de 12 semaines

Comme nous disposions après la fin de l'essai d'un reliquat de Rafoxanide, nous avons testé son activité à la dose de 7,5 mg sur deux animaux porteurs de douves âgées de 12 semaines. Il s'est révélé efficace à 94 p. 100.

2. DISCUSSION

On observe dans les lots A₁ et A₂ un nombre total de douves (vivantes et tuées) inférieur à la moyenne obtenue chez les témoins. Cela est certainement dû à la lyse ou à l'élimination d'un certain nombre de parasites tués. Nous avons, en effet, trouvé assez souvent des douves mortes dans la vésicule biliaire, donc en voie d'élimination.

Le taux d'infestation trouvé est très suffisant pour tester l'efficacité du produit. Il correspond, selon nos observations, au nombre moyen de douves trouvées sur les animaux parasités à Madagascar.

Les chiffres du paragraphe précédent sont éloquentes et dans tous les cas l'activité du Rafoxanide est très supérieure à 90 p. 100, ce qui classe le Rafoxanide parmi les meilleurs douvicides connus. Il permet en effet, d'intervenir efficacement contre la fasciolose aiguë due aux formes immatures âgées de 8 semaines et contre la fasciolose chronique due aux parasites adultes.

Le produit semble très bien toléré aux doses utilisées.

D. Conséquences du traitement sur la santé de l'animal

Après le traitement l'animal récupère un état clinique satisfaisant : dans les semaines qui suivent, le taux d'éosinophiles revient à la normale; le taux d'hémoglobine s'élève ainsi que le nombre de globules rouges; le poil est à nouveau lisse et brillant; les animaux reprennent du poids bien que l'on n'atteigne pas le seuil statistique de signification, le nombre d'animaux étant trop faible.

E. Activité du Rafoxanide vis-à-vis d'autres helminthes

1. Activité vis-à-vis

de *Setaria labiato papillosa*

Le Rafoxanide ne semble pas efficace. Plusieurs animaux traités ont été trouvés porteurs de filaires à l'autopsie, dans la même proportion que les témoins.

2. Activité vis-à-vis

des *Amphistomes de la panse*

90 p. 100 des animaux traités présentaient un nombre assez important d'Amphistomes vivants à l'autopsie. Aux doses utilisées, le

Rafoxanide ne semble pas actif vis-à-vis de ces parasites.

CONCLUSIONS

Le Rafoxanide se révèle être un excellent fasciolicide vis-à-vis de *Fasciola gigantica*.

En ce qui concerne les formes adultes, la dose de 5 mg/kg est active à 97 p. 100 et la dose de 7,5 mg/kg tue 100 p. 100 des parasites.

Pour les formes immatures (douvees âgées de 8 semaines) des doses plus élevées sont nécessaires :

— à 15 mg/kg, 92 p. 100 des douves sont tuées;

— à 20 mg/kg le produit est actif à 98,5 p. 100.

Le produit n'est pas toxique aux doses précitées et après le traitement les animaux récupèrent un état de santé très satisfaisant.

Le Rafoxanide présente donc les qualités requises pour être utilisé en milieu tropical vis-à-vis de *Fasciola gigantica*.

SUMMARY

Anthelmintic activity of an halogen derivative of Salicylanilide against *Fasciola gigantica*

The authors tested a new anthelmintic against *Fasciola* : Rafoxanide, on zebu experimentally infested with metacercariae of *Fasciola gigantica*.

The test was made on 35 animals. The metacercariae that were used came from naturally infested *Limnaea*.

The infestation was controled by studying eosinophilia, plasma protein electrophoresis and complement's fixation test.

The treatment's efficacy was appreciated by parasites counting at *post mortem* examination.

97 per cent of adult parasites were killed by doses of 5 mg/kg, doses of 7,5 mg/kg had a 100 per cent activity. Higher doses are needed for 8 weeks old immature flukes : the efficacy attains 92 per cent for doses of 15 mg/kg, and 98,5 per cent for doses of 20 mg/kg.

After treatment animals regain a very satisfying health.

RESUMEN

Estudio de la acción antihelmíntica de un derivado halógeno de la Salicylanilide para con *Fasciola gigantica*

Los autores estudiaron la acción del Rafoxanide sobre cebues experimentalmente infestados por metacercarias de *Fasciola gigantica*. Se realizó el ensayo con 35 animales. Las metacercarias utilizadas provenían de *Limnaea* naturalmente infestadas. Se comprobó la infestación mediante el estudio de la eosinofilia, de proteinogramas y de la fijación del complemento. La numeración de los parásitos a la autopsia demostró la eficacia

del tratamiento. Una dosis de 5 mg/kg mata 97 p. 100 de los parásitos adultos; en dosis de 7,5 mg/kg, es de 100 p. 100 la actividad del producto.

Los distomos inmaduros de 8 semanas de edad necesitan dosis superiores : 15 mg/kg actuan contra 92 p. 100 y 20 mg/kg contra 98,5 p. 100. Despues del tratamiento, los animales recuperan un estado de salud satisfactorio.