



a 66101

INDEXED

VALEUR ET LIMITES DE L'ANTIGÈNE  
PLASMODIUM GALLINACEUM POUR LE SERODIAGNOSTIC DU PALUDISME HUMAIN  
PAR IMMUNOFLOUORESCENCE INDIRECTE<sup>1</sup>

par

P. Ambroise-Thomas,<sup>2</sup> C. C. Draper<sup>3</sup>  
T. Kien Truong,<sup>4</sup> et Mme A. Goullier<sup>2</sup>



Pour le sérodiagnostic des paludismes humains, les meilleurs résultats sont évidemment obtenus en employant des plasmodiums parasites de l'homme qui constituent des antigènes spécifiques.

L'obtention régulière de tels plasmodiums se heurte malheureusement à de nombreux problèmes pratiques. Différents chercheurs ont donc tenté d'utiliser des espèces plasmodiales qui peuvent être plus facilement entretenues au laboratoire.

Tous les essais réalisés avec les parasites des rongeurs (P. berghei notamment) se sont pratiquement soldés par des échecs.

En revanche, les opinions sont plus contradictoires en ce qui concerne P. gallinaceum. D'après certains auteurs en effet, ce parasite constituerait un antigène assez satisfaisant pour le diagnostic sérologique des paludismes humains. C'est ce qu'ont notamment signalé Lippincott (1945) par la technique de fixation du complément, Todorovic et coll. (1967) par des tests d'agglutination et surtout Kielmann et coll. (1968a et b; 1970a et b) en immunofluorescence indirecte. Au contraire, Ingram et coll. (1961) et Voller (1962) n'ont pas observé de réactions croisées entre ce plasmodium et les espèces parasites des primates.

Pour tenter de clarifier cette situation discordante, nous avons étudié en immunofluorescence indirecte 183 sérums en utilisant comme antigène P. gallinaceum et P. cynomolgi bastianellii. Quatre-vingt-dix de ces sérums ont en outre été étudiés face à l'antigène P. falciparum.

1. Matériels et méthodes

1.1 Antigènes

Pour la préparation de nos antigènes, nous avons utilisé :

<sup>1</sup> Travail effectué avec l'aide financière de l'Organisation mondiale de la Santé.

<sup>2</sup> Laboratoire de Parasitologie et Pathologie exotique, Faculté de Médecine de Grenoble, 38 - La Tronche, France.

<sup>3</sup> London School of Tropical Medicine, Keppel Street, London W.C.1, Angleterre.

<sup>4</sup> Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine de Lyon, 69 - Lyon, France.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

- Deux souches différentes de P. gallinaceum (STI Bâle et IP Paris) entretenues chez le poulet par injection de sang parasité. Au cours d'essais préliminaires, nous avons employé des sangs d'animaux infectés depuis 6 à 15 jours (parasitémie variant de 10 à 80 %). Pour tout le reste de l'étude, nous avons employé des sangs recueillis 8 à 9 jours après l'innoculation et contenant environ 20 % d'hématies parasitées.
- Une souche de P. cynomolgi bastianellii entretenue sur des Macaca mulatta (rhésus) splénectomisés et inoculés par injection de sang parasité. Prélèvement après 7 à 10 jours; parasitémie de 10 % environ.
- Enfin, une souche de P. falciparum entretenue sur des Aotus trivirgatus splénectomisés; parasitémie au moment du prélèvement : 10 % environ.

A l'aide de ces différents sangs parasités, nous avons préparé des lots d'antigènes constitués soit par des étalements minces, soit encore par des gouttes épaisses suivant la technique de Sulzer et Wilson (1967).

Jusqu'au moment de leur emploi, ces préparations antigéniques ont été conservées au congélateur à -70°C.

## 1.2 Antisérums

Neuf des 183 sérums étudiés ont été prélevés chez des animaux d'expérience. Il s'agit de sérums de chimpanzés impaludés avec des plasmodiums humains et d'un pool de sérums de souris blanches hyperimmunisées contre P. berghei yoelii.

Les 174 autres sérums étaient d'origine humaine.

Ils correspondaient :

- à des sujets sains n'ayant jamais effectué de séjours outre-mer et ne présentant aucun antécédent palustre (sujets contrôles),
- à des sujets suspects de paludisme ou d'antécédents palustres,
- enfin, à des malades présentant un paludisme confirmé.

Ces différents sérums ont tous été conservés au congélateur à -70°C. Ils avaient été au préalable répartis dans une série de petits tubes, de manière à ce que chacun des échantillons ne soit soumis qu'à une seule décongélation.

Pour les réactions avec les antigènes P. cynomolgi bastianellii et P. gallinaceum, chaque sérum a été étudié aux dilutions 1/20, 1/40, 1/80, etc. Par contre, les immunofluorescences avec l'antigène P. falciparum ont été effectuées aux dilutions 1/16, 1/32, 1/64, etc.

Tous ces tests ont été faits en double aveugle, soit à l'intérieur d'un laboratoire, soit même dans deux laboratoires différents (Londres, Grenoble ou Lyon).

## 1.3 Technique

Les réactions d'immunofluorescence ont été effectuées suivant les modalités précédemment décrites (Ambroise-Thomas, 1969). Si on excepte la contre-coloration par le bleu d'Evans - que nous n'avons pas utilisée - c'est d'ailleurs exactement la technique employée par Kielmann et coll.

## 2. Résultats et commentaires

### 2.1 Influence de la souche utilisée, de la date du prélèvement et de la parasitémie sur la valeur antigénique de P. gallinaceum

Trente sérums humains positifs ont été étudiés au cours de plusieurs séries de réactions d'immunofluorescence indirecte, avec différents lots d'antigène P. gallinaceum.

Pour la préparation de ces antigènes, nous avons fait successivement varier les facteurs suivants :

- souche de P. gallinaceum (STI Bâle ou IP Paris),
- la date de prélèvements des sangs parasités (entre le 6ème et le 15ème jour),
- enfin, la parasitémie (entre 10 et 80 %).

Dans tous les cas, les titres d'anticorps fluorescents sont demeurés sensiblement constants, les variations enregistrées n'excédant jamais un degré de la gamme de dilution.

Nos observations correspondent donc exactement à celles de Kielmann et coll. (1970a et b) et il ne semble pas que l'activité antigénique de P. gallinaceum soit le fait d'une souche particulière. L'ancienneté de l'infection et le niveau de la parasitémie au moment où sont effectués les prélèvements ne paraissent pas non plus modifier sensiblement la réactivité antigénique de P. gallinaceum, au moins dans la mesure où ces prélèvements sont réalisés pendant la phase aiguë de la maladie expérimentale.

### 2.2 Contrôles de spécificité

Nous avons étudié 40 sérums humains prélevés chez des sujets pour lesquels l'existence d'antécédents palustres pouvait être exclue. Face aux trois espèces plasmodiales servant d'antigènes (P. gallinaceum, P. cynomolgi bastianellii ou P. falciparum) la grande majorité de ces sérums a donné des résultats négatifs dès la première dilution. Dans deux cas, nous avons cependant observé de faibles fluorescences aux dilutions 1/16, 1/20 ou même 1/40 face aux antigènes P. falciparum ou P. cynomolgi bastianellii. L'un de ces sérums a également été trouvé faiblement positif à 1/20 avec l'antigène P. gallinaceum (tableau I).

Par ailleurs, un pool d'immunsérums de souris blanches anti-P. berghei yoelii a été incorporé dans ces séries de contrôles. Il a donné des réactions faiblement positives face aux antigènes P. gallinaceum et P. cynomolgi bastianellii.

Ce résultat nous a paru doublement surprenant puisqu'il n'existe pratiquement pas de communauté antigénique entre les plasmodiums des rongeurs et les parasites des primates ou ceux des oiseaux. En outre, au cours de nos séries de réactions effectuées en double aveugle, nous utilisons un conjugué fluorescent anti-immunoglobulines humaines qui, normalement, n'aurait pas dû révéler des anticorps de souris.

Les examens sur ce pool de sérums ont donc été répétés à plusieurs reprises, chaque fois avec le même résultat.

L'ensemble de ces observations rejoint tout à fait ce que nous avons obtenu dans d'autres études et il faut certainement être très prudents sur la valeur des réactions d'immunofluorescence faiblement positives. Si les dilutions de 1/16 ou de 1/20 sont en effet généralement retenues comme seuil de spécificité du test, cette valeur liminaire n'est pas absolue et elle reste exposée à des risques de réactions croisées. Le titre d'anticorps correspondant ne saurait donc entraîner une certitude diagnostique et on ne peut lui accorder tout au plus qu'un intérêt d'orientation.

### 2.3 Sérums de chimpanzés impaludés expérimentalement

Le tableau II rapporte les résultats obtenus à partir des sérums de trois chimpanzés qui, après splénectomie, ont été impaludés avec P. malariae et avec P. vivax (singe N° 315), P. vivax puis P. falciparum (singe N° 521), ou bien seulement avec P. vivax (singe N° 543).

Pour ces neuf sérums, nous avons observé des titres d'anticorps fluorescents sensiblement équivalents avec les antigènes P. falciparum et P. cynomolgi bastianellii. En revanche, l'antigène P. gallinaceum s'est révélé beaucoup moins actif en ne donnant qu'un seul résultat faiblement positif (1/20).

### 2.4 Sérums humains prélevés chez les malades suspects d'antécédents palustres

#### 2.4.1 Comparaison des antigènes P. gallinaceum et P. cynomolgi bastianellii

Cent vingt sérums de sujets ayant séjourné outre-mer et présentant des antécédents palustres certains ou très probables, ont été étudiés face aux antigènes P. cynomolgi bastianellii et P. gallinaceum (tableau III).

Sept de ces sérums ont été trouvés positifs aux deux premières dilutions (1/20 ou 1/40) avec l'antigène P. gallinaceum alors qu'ils donnaient des tests négatifs avec l'antigène P. cynomolgi bastianellii.

Inversement, 49 sérums étaient négatifs avec l'antigène P. gallinaceum tandis qu'ils étaient positifs ou même fortement positifs avec l'antigène P. cynomolgi bastianellii.

Si l'on considère les résultats d'ensemble, ce dernier antigène a fourni 80,2 % de réactions positives et un titre moyen d'anticorps fluorescents (MGIT) de 22,4. Avec l'antigène P. gallinaceum ces chiffres étaient respectivement de 44,2 % et de 5,4.

#### 2.4.2 Comparaison des antigènes P. falciparum, P. cynomolgi bastianellii et P. gallinaceum

Ces résultats concernent 30 des sérums précédents qui ont été également étudiés face à l'antigène P. falciparum (tableau IV).

En ce qui concerne aussi bien le pourcentage des résultats positifs que les titres moyens d'anticorps fluorescents, les deux plasmodiums des primates ont, là encore, donné des résultats sensiblement équivalents et qui sont très supérieurs à ceux que nous avons observés avec l'antigène P. gallinaceum.

### 2.5 Paludismes humains confirmés. Comparaison des antigènes P. falciparum, P. cynomolgi bastianellii et P. gallinaceum

Nous avons pu étudier 14 sérums humains prélevés, avant ou après traitement par la chloroquine, chez des sujets atteints de paludisme à P. ovale, P. vivax, P. falciparum ou P. malariae (tableau V).

Les tests pratiqués avec les antigènes P. falciparum et P. cynomolgi bastianellii ont tous été positifs, le plus souvent à des titres très nettement significatifs. Les antigènes hétérologues ont bien évidemment donné des résultats moins élevés que l'antigène spécifique (P. falciparum pour les sérums N° 9 et 13, P. malariae pour le sérum N° 14), ou qu'un antigène très proche de l'antigène spécifique (P. cynomolgi bastianellii pour les sérums anti-P. vivax Nos 2, 6, 7 et 8).

Contrairement à Kielmann et coll. (1970b), nous n'avons pas observé de résultats plus élevés avec l'antigène P. gallinaceum qu'avec les plasmodiums des primates. L'antigène

P. gallinaceum nous a cependant donné six réactions nettement positives et même, dans trois cas, des titres identiques ou très comparables à ceux qui ont été observés avec P. cynomolgi bastianellii (sérums Nos 3, 4 et 5 ).

Cependant, un des sérums étudiés a été trouvé négatif avec ce même antigène, sept autres sérums n'étant que faiblement positifs (1/20 ou 1/40) ce qui correspond sensiblement à la limite de la spécificité du test.

### 3. Conclusion et résumé

L'étude de 180 sérums prélevés chez des malades atteints de paludisme, chez d'anciens paludéens, chez des sujets témoins ou encore chez des animaux d'expérience permet de confirmer en partie les conclusions de Kielmann et coll. Il est en effet indiscutable qu'en immunofluorescence indirecte, l'antigène P. gallinaceum peut permettre la détection d'anticorps anti-P. vivax, P. falciparum, P. malariae ou P. ovale. Etant donné la facilité avec laquelle P. gallinaceum peut être entretenu au laboratoire, il est évidemment très tentant de l'utiliser comme réactif pour le sérodiagnostic des paludismes humains.

Cette utilisation nous paraît cependant hasardeuse et justifie la plus extrême prudence.

En effet, seules les réactions fortement positives ont une valeur diagnostique indiscutable. Ce type de réactions est assez rare avec l'antigène P. gallinaceum. Au contraire, on observe généralement de faibles titres d'anticorps fluorescents qui, étant donné la possibilité de réactions croisées, ne permettent pas d'affirmer la réalité de l'infection palustre. Inversement, la faible sensibilité de cet antigène n'autorise pas à écarter l'éventualité d'un paludisme devant un résultat négatif.

Malgré les difficultés que peuvent représenter leurs préparations, les seuls antigènes de groupes se prêtant au sérodiagnostic des paludismes humains sont donc constitués par des parasites des singes. En matière de paludisme humain, la certitude diagnostique ne peut en réalité résulter que de tests effectués avec chacune des quatre espèces plasmodiales parasites de l'homme. L'obtention de ces réactifs antigéniques se heurte encore à de nombreuses difficultés. On peut espérer que ces problèmes techniques seront simplifiés par l'emploi de mélanges d'antigènes spécifiques comme l'ont récemment proposé Sulzer et coll. (1971) et peut-être par la possibilité de conserver ces antigènes sous forme lyophilisée (P. Ambroise-Thomas et coll., 1971).

### SUMMARY

A total of 180 sera from human patients and from chimpanzees recovered from infections with Plasmodium falciparum, P. vivax, P. ovale or P. malariae were tested by the indirect immunofluorescence technique against antigens prepared from P. gallinaceum, P. cynomolgi bastianellii and P. falciparum. Although some reactions were observed with the P. gallinaceum antigen both the number of positive results and the titres were far inferior to those obtained with the primate plasmodia. P. cynomolgi bastianellii was almost as sensitive as P. falciparum particularly for detecting infections with P. vivax, although for maximum sensitivity the homologous parasite must be used. The use of P. gallinaceum is therefore not recommended.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions bien vivement :

- le Professeur Benazet des Laboratoires Rhône-Poulenc de Vitry-sur-Seine, qui a bien voulu nous fournir une souche de P. cynomolgi bastianellii et la souche I.P. Paris de P. gallinaceum,
- le Docteur Alister Voller de Londres, à l'amitié duquel nous devons les antigènes P. falciparum et P. malariae utilisés pour les tests réalisés en France,
- les Docteurs A. Kielmann et G. Sarasin de Bâle, qui nous ont fait l'amitié de nous donner leur souche de P. gallinaceum et de nous indiquer régulièrement les progrès de leurs propres travaux.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambroise-Thomas, P. (1969) Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Thèse Doct. ès-sciences, 645 pages, Lyon, France
- Ambroise-Thomas, P., Kien Truong, T., Saliou, P. & Mojon, M. (1969) L'immunofluorescence indirecte dans le sérodiagnostic du paludisme. Modalités techniques et principaux résultats, Rev. Inst. Pasteur Lyon, 2, 275
- Ambroise-Thomas, P., Duprat, J., Goullier, A. & Kien Truong, T. (1971) Lyophilisation d'antigènes figurés destinés aux tests d'immunofluorescence du paludisme. Résultats préliminaires. Document ronéographié OMS, WHO/MAL/71.752
- Ingram, R. L., Otken, L. B. & Jamper, J. R. (1961) Staining of malaria parasites by the fluorescent antibody technique, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 106, 52
- Kielmann, A. & Weiss, N. (1968a) Fluorescent antibody technique in malaria, Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 62, 458
- Kielmann, A. & Weiss, N. (1968b) Plasmodium gallinaceum antigen in immuno-fluorescence antibody studies, Acta tropica, 25, 185
- Kielmann, A., Weiss, N. & Sarasin, G. (1970a) Plasmodium gallinaceum as antigen in the diagnosis of human malaria, Bull. Wld Hlth Org., 43, 612
- Kielmann, A., Sarasin, G., Bernhard, A. & Weiss, N. (1970b) Further investigations on Plasmodium gallinaceum as an antigen in the diagnosis of human malaria, Bull. Wld Hlth Org., 43, 617
- Lippincott, S. W. et al. (1945) Complement fixation in human malaria using an antigen prepared from the chicken parasite P. gallinaceum, J. clin. Invest., 24, 362
- Sulzer, A. J. & Wilson, M. (1967) The use of thick-smear antigen slides in the malaria fluorescent antibody test, J. Parasit., 53, 1110
- Sulzer, A. J., Turner, A. & Wilson, M. (1971) A preliminary report on the preparation and trial of multi-species antigen on human malarias for use in the indirect fluorescent antibody test. Document ronéographié OMS, WHO/MAL/71.749
- Todorovic, R., Ferris, D. & Ristic, M. (1967) Immunogenic properties of serum antigens from chickens acutely infected with P. gallinaceum, Ann. trop. Med. Parasit., 61, 117
- Voller, A. (1962) Fluorescent antibody studies on malaria parasites, Bull. Wld Hlth Org., 27, 283

TABLEAU I. SERUMS TEMOINS

Antigènes	Nature des sérums	Inverses des titres d'anticorps fluorescents					Total.
		0	16	20	32	40	
<u>P. falciparum</u>	H*	38	2	NP***	0	NP	40
	S**	1	0	NP	0	NP	1
<u>P. cynomolgi bastianellii</u>	H	38	NP	2	NP	0	40
	S	0	NP	0	NP	1	1
<u>P. gallinaceum</u>	H	39	NP	1	NP	0	40
	S	0	NP	1	NP	0	1

\* H : Sérums humains témoins négatifs.  
 \*\* S : Pool d'hyperimmuns sérums de souris anti-P. berghei yoelii.  
 \*\*\* NP : Test non pratiqué.

TABLEAU II. SERUMS DE CHIMPANZES IMPALUDES EXPERIMENTALEMENT

No des singes	Type et ancienneté de l'infection			Traitement	Antigènes utilisés et inverses des titres d'anticorps fluorescents		
	<u>P.falci- parum</u>	<u>P.vivax</u>	<u>P.malariae</u>		<u>P.falci- parum</u>	<u>P.cynomolgi bastianellii</u>	<u>P.galli- naceum</u>
315	NP*	12 mois	48 mois	0	64	80	20
521	3 mois	24 mois	NP*	0	64	40	0
	4 mois 1/2	25 mois 1/2	NP*	0	64	40	0
	6 mois	27 mois	NP*	0	16	20	0
	8 mois	29 mois	NP*	0	16	40	0
543	NP*	4 mois	NP*	0	0	20	0
	NP*	7 mois	NP*	0	16	20	0
	NP*	9 mois	NP*	0	0	0	0

\*NP : Non pratiqué.

TABLEAU III. SERUMS HUMAINS DE SUJETS SUSPECTS DE PALUDISME OU D'ANTECEDENTS PALUSTRES  
COMPARAISON DES ANTIGENES P. CYNOMOLGI BASTIANELLII ET P. GALLINACEUM

	Antigène <u>P. gallinaceum</u>								Total
	Inverses des titres d'anticorps fluorescents								
	0	20	40	80	160	320	640		
Antigène <u>P. cynomolgi</u> <u>bastianellii</u>	0	18	6	1	0	0	0	0	25 (20,8 %)
	20	29	4	1	0	0	0	0	34
	40	14	6	5	1	0	0	0	26
	80	4	5	2	2	1	0	0	14
	160	2	1	3	5	2	0	0	13
	320	0	0	0	1	2	1	0	4
	640	0	0	0	1	2	0	1	4
	Total	67 (55,8%)	22	12	10	7	1	1	1
95 sérums positifs (80,2 %) MGIT* : 22,4									
53 sérums positifs (44,2 %) MGIT* : 5,4									
*MGIT : Moyenne géométrique de l'inverse des titres d'anticorps fluorescents.									

TABEAU IV. SERUMS HUMAINS DE SUJETS SUSPECTS DE PALUDISME OU D'ANTECEDENTS PALUSTRES  
COMPARAISON DES ANTIGENES P. FALCIPARUM, P. CYNOMOLGI BASTIANELLII ET P. GALLINACEUM

Antigènes	Inverses des titres d'anticorps fluorescents														Total	Positifs	MGIT*		
	0	16	20	32	40	64	80	128	160	256	320	512	640	1024				2048	4096
<u>P. falciparum</u>	13 (43,3 %)	7	NP**	0	NP**	6	NP**	0	NP**	2	NP**	0	NP**	1	0	1	30	17 (56,6 %)	10,5
<u>P. cynomolgi bastianellii</u>	9 (30 %)	NP**	8	NP**	9	NP**	2	NP**	2	NP**	0	NP**	0	NP**	NP**	NP**	30	21 (70 %)	12,6
<u>P. gallinaceum</u>	23 (76,6 %)	NP**	2	NP**	4	NP**	0	NP**	1	NP**	0	NP**	0	NP**	NP**	NP**	30	7 (23,3 %)	2,4

\*MGIT : Moyenne géométrique de l'inverse des titres d'anticorps fluorescents.

\*\*NP : Test non pratiqué.

TABLEAU V. PALUDISMES HUMAINS CERTAINS  
COMPARAISONS DES ANTIGENES P. FALCIPARUM, P. CYNOMOLGI BASTIANELLII  
ET P. GALLINACEUM

N° des sé- rums	Type d'infection	Nature de l'antigène et inverses des titres d'anticorps fluorescents		
		<u>P. falciparum</u>	<u>P. cynomolgi bastianellii</u>	<u>P. gallinaceum</u>
1	<u>P. ovale</u> (en cours d'accès)	32	80	20
2	<u>P. vivax</u> (primo-invasion)	NP	320	0
3	<u>P. vivax</u> (rechute)	NP	2560	2560
4	<u>P. vivax</u> (rechute)	NP	1280	640
5	<u>P. vivax</u> (rechute)	NP	640	640
6	<u>P. vivax</u> (rechute)	256	640	160
7	<u>P. vivax</u> (1 semaine après traitement chloroquine)	256	1280	320
8	<u>P. vivax</u> (anciennement traité par la chloroquine)	64	80	20
9	<u>P. falciparum</u> (pool de sérums positifs)	4096	320	160
10	<u>P. falciparum</u> (en cours d'accès)	1024	160	40
11	<u>P. falciparum</u> (1 semaine après traitement par la chloroquine)	1024	40	20
12	<u>P. falciparum</u> post-transfusionnel (1 an après traitement par la chloroquine)	1024	20	20
13	<u>P. falciparum</u> (6 mois après trai- tement par la chloroquine)	256	40	40
14	<u>P. malariae</u> (rechute)*	64	320	20

\* Sérum positif à 1/2560 face à l'antigène P. malariae.

Le but des documents de la série WHO/Mal est le suivant :

- a) mettre le personnel de l'OMS, les instituts nationaux, les chercheurs et les travailleurs de la santé publique au courant de l'évolution des recherches sur le paludisme et des progrès de l'éradication du paludisme au moyen d'exposés succincts relatifs à quelques problèmes en cause;
- b) distribuer, aux catégories de lecteurs indiquées ci-dessus, les rapports d'opérations et autres communications qui présentent un intérêt particulier, mais qui ne sont pas normalement imprimés dans les publications de l'OMS;
- c) communiquer aux intéressés différents articles qui sont destinés à la publication mais qui, en raison de leur actualité, méritent d'être rapidement connus.

On notera que les résumés de travaux non publiés représentent souvent des rapports préliminaires d'investigations; les conclusions de ces travaux peuvent donc être sujettes à des révisions ultérieures.

La mention des manufactures et des produits commerciaux n'implique pas que ces maisons ou leurs produits soient recommandés ou approuvés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres,