

Mal. class / Immunologie
Fluorescence antibody technique B.3



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

WHO/MAL/81.953

FRANCAIS SEULEMENT
(with English summary)

a 66428

INDEXED

L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LA SEROLOGIE DU PALUDISME¹

par

Pierre Ambroise-Thomas
Laboratoire de Parasitologie et Pathologie exotique
Faculté de Médecine, Université de Grenoble, France

Table des matières

	<u>Pages</u>
1. INTRODUCTION	2
2. ASPECTS METHODOLOGIQUES	2
2.1 Les antigènes	2
2.2 Conjugés fluorescents et réalisation du test	3
2.3 Lecture du test	3
3. INDICATIONS ET LIMITES DE L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LE PALUDISME	4
3.1 Conditions d'interprétation des résultats	4
3.2 Applications au sérodiagnostic	4
3.3 Applications à la prévention du paludisme post-transfusionnel et aux enquêtes séro-épidémiologiques	4
4. CONCLUSIONS	4
RESUME	5
SUMMARY	5
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	6



¹ Papier présenté à la Réunion de la Fondation Mérieux/Organisation mondiale de la Santé sur les Méthodes immunologiques s'appliquant au Paludisme, Lyon, France, 9-12 septembre 1981.

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.

1. INTRODUCTION

Dans le domaine de la sérologie du paludisme, il n'est pas possible de ne pas réserver une place spéciale à l'immunofluorescence. Cette technique est en effet, de très loin, la plus utilisée et la mieux connue dans ce domaine immunologique particulièrement complexe. L'expérience acquise par différentes équipes remonte maintenant à près de 20 ans. Nous nous efforçons d'en faire rapidement la synthèse en insistant aussi bien sur les qualités et les avantages de la méthode que sur ses inconvénients et en soulignant les améliorations techniques récemment apportées ou celles qui demeurent encore nécessaires.

2. ASPECTS METHODOLOGIQUES

2.1 Les antigènes

La recherche des anticorps fluorescents n'exige, pour la préparation des antigènes, qu'une infime quantité de parasites. Dans le cas du paludisme, c'est là un avantage fondamental qui explique pour une large part l'intérêt de l'immunofluorescence. Ces antigènes sont constitués par des gouttes épaisses de sang parasité. La préparation en est simple et n'entraîne aucune des difficultés que supposent l'extraction puis la purification des antigènes plasmodiaux solubles. En dehors d'un évident avantage de simplicité, ceci confère aux antigènes employés en immunofluorescence des qualités habituellement très reproductibles d'un lot à l'autre. En revanche, ce type d'antigène est évidemment "figé" et n'est pas susceptible d'être amélioré par diverses techniques de purification.

L'accord est maintenant fait sur les espèces plasmodiales utilisables pour le séro-diagnostic du paludisme humain. Les parasites des rongeurs ou des oiseaux ne constituent pas un matériel antigénique satisfaisant et seules doivent être employées les trois espèces plasmodiales parasites de l'homme : Plasmodium falciparum, P. vivax ou P. malariae (P. ovale est trop rare pour présenter un intérêt pratique), soit, à défaut, une espèce plasmodiale parasite des singes (P. cynomolgi bastianellii au lieu de P. vivax et P. brasilianum ou P. fieldi à la place de P. malariae, etc.).

Comme source de matériel parasitaire, il est habituellement difficile d'utiliser du sang de malades spontanément infestés. Outre leur caractère aléatoire, ces prélèvements ont en effet l'inconvénient de contenir parfois des anticorps spécifiques (risques de blocage in vitro ou in vivo). Surtout ils ne présentent habituellement qu'une très faible parasitémie (P. malariae et P. vivax) ou, dans le cas de P. falciparum, ne renferment pas de schizontes qui sont indiscutablement les stades les plus antigéniques. Compte tenu de ces difficultés, on a donc recouru dans un premier temps à l'impaludation expérimentale de singes appartenant à différentes espèces et en particulier d'Aotus trivirgatus (douroucoulis). Ces animaux sont malheureusement devenus extrêmement rares et pratiquement inabornables pour les laboratoires de recherches tout comme, à un degré moindre cependant, des singes appartenant à des espèces plus communes et qui sont utilisables pour des impaludations par P. cynomolgi (Macaca mulatta). Malgré toutes les difficultés pratiques qu'elles représentent, les infestations expérimentales de différents singes sont encore indispensables pour l'obtention des antigènes P. vivax et P. malariae. Pour P. falciparum, la situation est très différente depuis la mise au point par Trager et Jensen en 1976 des cultures in vitro de ce parasite. On dispose ainsi pour ce Plasmodium d'un moyen relativement facile pour obtenir des quantités assez importantes de sang parasité. Surtout, ce sang est débarrassé de tout leucocyte ce qui facilite la lecture des résultats, et il est aisé de disposer d'hématies uniquement parasitées par des schizontes dans la mesure où on a procédé à une synchronisation préalable des cultures.

La multiplication in vitro de P. falciparum a considérablement modifié la situation en matière de sérologie du paludisme. Il est en effet maintenant possible de préparer d'assez grandes quantités d'antigènes pour les mettre à la disposition de différents laboratoires décentralisés. Une meilleure standardisation de ces réactifs devient donc réalisable, mais il est indispensable de mettre en oeuvre des méthodes aussi simples et aussi commodes que possible pour assurer une conservation de longue durée des antigènes, et faciliter leur transport. Enfin,

l'obtention d'antigènes P. vivax et P. malariae continue à être extrêmement difficile et/ou aléatoire, ce qui complique la sérologie du paludisme face aux trois antigènes homologues, tant que n'auront pu être réalisées des cultures in vitro pour ces différentes espèces plasmodiales.

2.2 Conjugués fluorescents et réalisation du test

Les conjugués anti-IgG ou anti-IgM humaines, marqués par la fluorescéine, sont maintenant bien standardisés et largement disponibles dans le commerce. De même, les conditions techniques de réalisation du test sont pratiquement harmonisées entre les différents laboratoires et seules ne subsistent que de légères variations techniques relevant plus des habitudes de chaque expérimentateur que d'un mode opératoire réellement particulier.

La standardisation du test d'immunofluorescence devient donc parfaitement concevable. Elle est d'autant plus souhaitable que, avec les actuelles possibilités de distribution des antigènes P. falciparum à de nombreux centres, l'emploi de ce test va sans doute pouvoir s'étendre aussi bien dans le cadre d'enquêtes séro-épidémiologiques (évaluation avant le début de campagnes de lutte, contrôle des résultats de ces campagnes, dépistage des cas importés dans les zones nouvellement éradiquées) que pour le contrôle des donneurs de sang et la prévention des paludismes post-transfusionnels.

Sans constituer une véritable standardisation - avec tout ce que cela représente de contraignant et parfois de difficilement réalisable -, une solution pragmatique pourrait être, comme nous l'avions proposé en 1974, l'utilisation de sérums de référence. Ceci correspond à ce qui a déjà été fait dans le domaine d'autres maladies parasitaires (toxoplasmose) à l'initiative d'ailleurs de l'OMS. La constitution d'une réserve de sérums humains de référence, très fortement positifs et respectivement homologues de chacun des quatre Plasmodiums de l'homme, permettrait en effet de contrôler la sensibilité et la spécificité de la réaction dans chaque laboratoire. En outre, ces sérums étalons permettraient d'exprimer les résultats à l'aide d'un système commun (unités internationales par exemple) et donc de rendre ces résultats mieux comparables entre eux.

2.3 Lecture du test

Un des reproches souvent formulé à l'encontre de l'immunofluorescence est le caractère subjectif de la lecture de ses résultats. En fait, cette subjectivité intervient surtout pour l'interprétation des réactions très faiblement positives et ne peut éventuellement que modifier d'un degré de la gamme de dilution la détermination d'un titre final. Malgré cela, il est indiscutable que la lecture d'un test d'immunofluorescence du paludisme exige une certaine habitude de la part de l'expérimentateur. Une solution éventuelle peut être apportée par des dispositifs de lecture automatique (microfluorimétrie quantitative). Des résultats préliminaires ont été publiés par Manawadu et Voller en 1978. Actuellement, différents dispositifs sont commercialisés par les firmes de microscopes. Théoriquement, ce procédé est très séduisant car il permet d'exactement mesurer la fluorescence au niveau de parasites isolés ou d'un ensemble de parasites. On obtient ainsi des résultats parfaitement objectifs et des données réellement quantitatives à partir d'une seule dilution des sérums ce qui constitue une importante économie de temps et de réactifs par rapport à l'actuel système de détermination du titre final qui exige l'étude de plusieurs dilutions sériques. En fait, le matériel de microfluorimétrie actuellement disponible présente plusieurs inconvénients et particulièrement son coût et sa complexité qui entraînent une certaine fragilité et en excluent l'emploi en dehors de centres très spécialisés. Surtout, la mesure de la fluorescence continue à être une opération relativement longue qui se prête assez mal à de grandes séries d'examen. En outre, cette mesure est compliquée par la diminution très rapide de la fluorescence des parasites lorsqu'ils sont exposés à un faisceau de lumière ultraviolette ("fading"). Dans ces conditions, le repérage des éléments parasitaires et la mesure de leur fluorescence doivent être théoriquement effectués dans des délais très brefs et toujours identiques ce qui, pratiquement, est très difficilement réalisable.

Ce n'est que si ces actuelles difficultés techniques étaient résolues que la microfluorimétrie quantitative pourrait permettre une certaine standardisation de l'immunofluorescence avec une expression parfaitement quantitative des résultats et une évolution vers une automatisation, au moins partielle, du test.

3. INDICATIONS ET LIMITES DE L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LE PALUDISME

3.1 Conditions d'interprétation des résultats

L'interprétation des résultats est évidemment basée sur les conclusions de données expérimentales obtenues notamment à partir de paludismes de malariathérapie. Dans les conditions techniques habituelles, le test d'immunofluorescence du paludisme est spécifique à partir de la dilution de 1/20^e ou de 1/40^e. Il devient positif sept à 10 jours après l'infestation et, à la période aiguë, les titres d'anticorps atteignent 1/640 à 1/10 240, les résultats les plus élevés étant observés chez les sujets ayant eu de nombreuses réinfestations. En l'absence de recontamination, les anticorps fluorescents diminuent progressivement mais ils peuvent encore être décelables plusieurs années après la dernière contamination. Après traitement, la sérologie diminue assez rapidement pendant les trois premiers mois mais la négativation totale n'est qu'inconstamment obtenue. Elle demande toujours des délais assez longs (6 mois à 2 ans) et de larges variations individuelles peuvent être observées. Chez des sujets ayant vécu en zone d'endémie palustre et régulièrement soumis à une chimioprophylaxie, la sérologie peut être positive même en l'absence de tout antécédent palustre connu. Ce résultat est en accord avec les effets des schizontocides qui n'empêchent ni la formation des stades exo-érythrocytaires ni surtout celle des trophozoïtes jeunes qui peuvent induire la production d'anticorps.

3.2 Application au sérodiagnostic

En zone d'endémie palustre, l'immunofluorescence est pratiquement sans intérêt en pratique diagnostique individuelle car elle est habituellement toujours positive tandis que les examens parasitologiques permettent bien plus simplement un diagnostic indiscutable. En outre, l'existence de nombreuses maladies transmissibles rend aléatoire la détermination d'un seuil de spécificité pour le test d'immunofluorescence (réactions croisées). Dans les zones non endémiques, le sérodiagnostic n'est concevable que dans les cas où la parasitémie est très faible ou indécélable (rechutes palustres, diagnostic a posteriori d'un paludisme traité récemment, avant toute confirmation parasitologique). L'interprétation des résultats est cependant souvent difficile car tout le passé palustre de chaque sujet est susceptible de modifier la réponse sérologique. En pratique, le principal intérêt de l'immunofluorescence est donc, lorsque le test est négatif, de permettre un diagnostic d'exclusion.

3.3 Applications à la prévention du paludisme post-transfusionnel et aux enquêtes séro-épidémiologiques

Avec l'intensification des voyages internationaux, le risque de paludisme post-transfusionnel ne cesse d'augmenter. Aucune des méthodes prophylactiques jusqu'ici envisagées n'est pleinement satisfaisante. De nombreuses études, réalisées notamment en France, ont, au contraire, montré l'intérêt d'un sérodépistage des "donneurs suspects". Sans doute s'agit-il là, dans les pays situés en dehors des zones d'endémie palustre, de la plus importante application pratique de l'immunofluorescence.

Pour les enquêtes séro-épidémiologiques, le test d'immunofluorescence est surtout précieux pour contrôler l'efficacité de campagnes d'éradication lorsque l'incidence est tombée à un niveau si faible que les examens parasitologiques deviennent inadéquats. Pour que les résultats soient interprétables, encore faut-il que la sérologie soit pratiquée sur des échantillons de population représentatifs des différents contextes épidémiologiques et que, pour limiter les conséquences des réactions croisées non spécifiques, la surveillance sérologique soit répétée de façon longitudinale et non pas réalisée ponctuellement.

4. CONCLUSION

Au total, la réaction d'immunofluorescence est indiscutablement la plus éprouvée des méthodes sérologiques applicables au paludisme. Elle a bénéficié récemment de certaines améliorations techniques. D'autres perfectionnements sont souhaitables et probablement réalisables. En fait, cette technique doit bien entendu être surtout considérée comme un moyen, un outil

utilisable pour différentes applications pratiques. Tant que ne sont pas mieux connus les antigènes plasmodiaux solubles et plus complètement explorées les possibilités des tests sérologiques nouveaux (immuno-enzymologie, radio-immunologie), c'est sans doute le test d'immunofluorescence qui continuera, pour le paludisme, à constituer la réaction de référence.

RESUME

La réaction d'immunofluorescence est la plus utilisée et la mieux connue des techniques sérologiques applicables au paludisme. Sur le plan méthodologique, cette réaction offre l'avantage de faire intervenir des antigènes facilement préparés (étalements d'hématies parasitées) qui n'exigent ni extraction, ni purification préalable. Surtout, ces antigènes ont dans l'ensemble des qualités remarquablement constantes ce qui assure à la réaction une très bonne reproductibilité. A l'inverse, les qualités de ce type d'antigène sont évidemment figées et il est impossible de leur appliquer des méthodes de purification modernes qui permettraient d'améliorer la sensibilité et d'en éliminer les fractions non ou peu spécifiques. Pour donner des résultats précis, la réaction doit être impérativement réalisée avec des antigènes homologues (Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae). Dans le premier cas, les cultures in vitro fournissent un antigène abondant, parfaitement contrôlable et qui, si on a réalisé une synchronisation préalable, contient quasi exclusivement des schizontes âgés (formes plasmodiales les plus antigéniques in vitro). En revanche, l'obtention des antigènes P. vivax et P. malariae continue à être très difficile malgré les faibles quantités nécessaires. La lecture du test est, dans une certaine mesure exposée à des risques d'interprétation subjective. A l'avenir, il est possible que des appareillages plus précis permettent d'effectuer ces lectures de façon automatique et parfaitement objective.

Les résultats de très nombreuses études concernant un total de plusieurs dizaines de milliers de sérums ont précisé les délais et les conditions dans lesquelles la réaction d'immunofluorescence devient positive après l'infection palustre, l'évolution des anticorps anti-Plasmodium dans les diverses classes d'immunoglobulines, la persistance de ces anticorps chez les individus traités ou non, en fonction des médicaments utilisés, et, bien sûr, de l'espèce plasmodiale, enfin, les conditions d'apparition et de persistance des anticorps chez des sujets sous chimioprophylaxie et vivant en zone d'endémie palustre.

Sur la base de ces résultats expérimentaux, l'immunofluorescence a été largement employée aussi bien pour les enquêtes séro-épidémiologiques que pour le dépistage de porteurs latents de Plasmodium et la prévention des paludismes post-transfusionnels. Cette dernière application est probablement l'une des meilleures indications actuelles du test.

SUMMARY

IMMUNOFLUORESCENCE IN THE SEROLOGY OF MALARIA

Among the serological techniques employed in malaria, the immunofluorescence test is the most commonly used and the best known. From the point of view of methodology, this test offers the advantage of being carried out with easily prepared antigens (blood films of parasitized erythrocytes) which need not be extracted or purified beforehand. Above all, these antigens generally have remarkably stable characteristics, thereby ensuring a very good reproducibility of the test. On the other hand, however, the properties of this type of antigen are, of course, fixed and it is impossible to apply modern purification methods in order to increase the sensitivity by eliminating from the antigen fractions that are non- or weakly-specific. If precise results are to be obtained, it is imperative that the test be carried out with homologous antigens (Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae). In the case of P. falciparum, in vitro cultures provide an antigen which is abundant, easy to control and which, if synchronized beforehand, will contain almost exclusively mature schizonts (the most antigenic of the plasmodial forms in vitro). On the other hand,

P. vivax and P. malariae antigens continue to be very difficult to obtain and this despite the small quantities required. Reading of the test reactions is, to a certain extent, exposed to the risks of subjective interpretation. In the future, it is possible that the development of more precise apparatus will enable an automated and completely objective reading of test reactions.

The results of very numerous studies made on a total of several tens of thousands of sera have established the following: the lapse of time and the conditions in which the immunofluorescence reaction becomes positive after infection with malaria; the evolution of the antiplasmodial antibodies in the various classes of immunoglobulins; the persistence of these antibodies in individuals, who are either treated or not, according to the drugs used and, of course, to the Plasmodium species; and, finally, the conditions required for the appearance and persistence of antibodies in subjects undergoing chemoprophylaxis and living in a malaria endemic zone.

On the basis of these experimental results, the immunofluorescence test has been widely used in seroepidemiological surveys as well as in the detection of symptomless Plasmodium parasite carriers and in the prevention of blood transfusion-induced malaria. At present, this last application is probably the best indication for the test.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambroise-Thomas, P. (1974) La réaction d'immunofluorescence dans l'étude séro-immunologique du paludisme. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 50: 267-276
- Ambroise-Thomas, P. (1976) Prévention du paludisme post-transfusionnel par séro-dépistage des porteurs latents de Plasmodium parmi les donneurs de sang. Revue française de transfusion et immuno-hématologie, 19: 331-336
- Ambroise-Thomas, P. (1981) Diagnostic immunologique du paludisme en pratique individuelle et de masse. Médecine et maladies infectieuses, 11: 328-337
- Ambroise-Thomas, P., Wernsdorfer, W., Grab, B., Bertagna, P. & Cullen, J. (1976) Etude séro-épidémiologique longitudinale sur le paludisme en Tunisie. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 54: 355-367
- Manawadu, B. R. & Voller, A. (1978) Standardization of the indirect fluorescent antibody test for malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 72: 456-462
- Trager, W. & Jensen, J. B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. Science, 193: 673-675

= = =