

a 62428



WHO/Ma1/353
2 août 1962

ORIGINAL : ANGLAIS

LA TECHNIQUE DES ANTICORPS FLUORESCENTS POUR LA MESURE
DES ANTICORPS SPECIFIQUES DES PARASITES DU
PALUDISME

par

A. Voller et R. S. Bray¹

London School of Hygiene and Tropical Medicine and
the Liberian Institute of the American Foundation for Tropical Medicine

La technique des anticorps fluorescents a été appliquée avec succès à la coloration des parasites du paludisme (Brooke et al., 1958; Ingram et al., 1961; Tobie & Coatney, 1961; Voller, 1962) et la méthode indirecte a permis de mesurer les anticorps circulants spécifiques des parasites du paludisme (Kuvn et al., 1962).

Dans des essais indépendants, décrits ci-après, on a réussi à adapter la méthode indirecte à la mesure de la distribution des teneurs en anticorps parmi une population semi-immune au Libéria.

Méthodes, matériel et résultats.

1. Fixation de l'étalement sanguin infesté par Laverania falcipara servant d'antigène.

La fixation par l'acétone pendant 5 minutes suivie d'un séchage rapide à moins de 40 % d'humidité relative ou d'un traitement de 5 minutes par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 % (1 ml d'HCl concentré dans 1000 ml d'eau), a donné une bonne conservation des parasites et des érythrocytes, a coloré le cytoplasme des parasites mais pas leurs noyaux, a donné des résultats faussement positifs avec des dilutions de sérum non immun allant jusqu'à 1/100 et de bons résultats avec des dilutions d'immun = sérum allant jusqu'à 1/6400.

¹ Travail exécuté avec l'appui financier de l'Organisation mondiale de la Santé.

La fixation par le méthanol a donné une bonne conservation mais l'étalement sanguin après coloration était mauvais et présentait un dépôt abondant entre les érythrocytes; seuls les noyaux des parasites étaient colorés.

Appliqué à des étalements non fixés, un traitement de 5 minutes par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 % (ou d'acide acétique à 0,2 %) dans l'eau pure ou dans l'eau physiologique a donné une assez mauvaise fixation et a désintégré partiellement tant les érythrocytes que les parasites. (Plus la conservation de l'étalement avait été prolongée au-delà de 24 h., moins la désintégration était importante). Ce traitement a donné une bonne coloration, n'a pas donné de résultats faussement positifs avec du sérum non immun et a donné de bons résultats avec des dilutions d'immun-sérum allant jusqu'à 1/6400.

2. L'étalement sanguin contenant les formes érythrocytaires de L. falcipara utilisées comme antigène donnait les meilleurs résultats quand on l'employait directement. On n'avait aucun intérêt à laver les érythrocytes, à éliminer les leucocytes et à remettre en suspension les érythrocytes dans du sérum non immun ou dans du sérum de chèvre avant de faire l'étalement. Les parasites pouvaient provenir de prélèvements faits sur des enfants de tous âges, présentant de préférence une parasitémie supérieure à 25 000/ml. Il était préférable de mettre l'étalement dans un dessiccateur pendant 24 h. avant de l'utiliser.

3. Le sérum antiglobuline humaine marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine avait été acheté à la Microbiological Associates Inc. Le premier lot était certainement médiocre, probablement parce qu'il avait mis quatre mois pour parvenir jusqu'à notre institut (par avion !). Un deuxième lot a constamment donné de bons résultats. On n'a constaté aucune différence entre l'anti-sérum de chèvre et l'anti-sérum de lapin. On peut chauffer l'anti-sérum (de même que le sérum à expertiser) à 56°C pendant 30 minutes sans nuire à son activité. On peut diluer le produit commercial à 1/20 sans nuire à son activité. On peut donc étendre 5 ml d'anti-sérum à 100 ml et, comme on utilise une goutte par étalement, on peut traiter près de 2000 plaques avec le contenu d'un seul flacon de 5 ml d'anti-sérum, qui coûte \$5,00.

4. La mesure des anticorps a été exécutée comme suit : traitement d'un étalement de parasites pendant 5 minutes par une solution de HCl à 0,1 %; lavage pendant 10 minutes dans une solution saline tamponnée au phosphate (STP) de pH 7,2; recouvrement

pendant 30 minutes par une goutte standard de sérum ou de dilution sérique à expertiser; lavage pendant 15 minutes dans la STP; recouvrement pendant 30 minutes par l'anti-sérum marqué; lavage pendant 15 minutes dans la STP; montage dans la STP et examen au microscope en lumière UV. Cet examen était pratiqué à l'aide d'un microscope binoculaire Zeiss et d'une lampe à vapeur mercure Osram SBO 200. Les filtres d'excitation étaient montés dans le logement de la lampe et les écrans filtrants entre l'objectif et l'oculaire.

5. Le code utilisé pour la coloration des parasites était le suivant : coloration brillante (++) ; coloration nette (+) ; coloration faible ne permettant normalement que de voir les plus gros parasites (+). Le double signe † représentait la réaction limite. Le test a été appliqué à divers groupes d'âges d'une population locale vivant dans des conditions d'endémicité paludéenne. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux 1, 2, 3 et 5.

6. On a constaté que les étalements desséchés non fixés pouvaient être abandonnés à la température du laboratoire dans un dessiccateur pendant une période allant jusqu'à 12 jours avant leur utilisation. Au bout de 14 jours on constatait une altération.

7. Le traitement a été exécuté à 4°C, 20°C et 37,5°C sans modification sensible des résultats.

8. Le test a été appliqué à du lait provenant de mères immunes; on n'y trouvait généralement pas d'anticorps (très peu d'anticorps dans de rares cas). Le test a été effectué sur le lait avant et après délipidation.

9. On a essayé de diminuer la durée de l'épreuve en réduisant à 10 minutes tous les temps de recouvrement et de lavage et en utilisant un agitateur à secousses automatique. Les résultats n'ont pas été modifiés mais on a observé une certaine tendance de l'étalement à la lixiviation. Cette accélération du procédé ne présentait pas un intérêt véritable puisqu'on ne gagnait que 40 minutes sur un traitement de 2 h.30.

10. L'anti-sérum marqué, absorbé sur de la poudre de foie, dilué à 1/20 et stocké à -20°C se conservait pendant 4 à 6 semaines sans altération. Au-delà de cette période on obtenait quelques résultats faussement positifs probablement dus à l'apparition de fluorescéine libre.

11. Le test a été effectué sur du sérum provenant de Libériens adultes vivant à Kpain, au centre de la zone d'un projet pilote d'éradication du paludisme traitée par des pulvérisations de DDT. Ces pulvérisations avaient lieu depuis 3 ans et semblaient avoir fait disparaître A. gambiae et A. funestus. On a observé des titres allant jusqu'à 1/1600 et peu de diminution des anticorps circulants (voir tableau 3).

12. Aucune preuve de la présence d'anticorps bloquants spécifiques des parasites du paludisme n'a été relevée.

13. Tous les parasites circulants dans le sang, y compris les gamétocytes et toutes les parties du parasite à l'exception du piment, avaient été colorés.

14. Alors que les érythrocytes infestés par des parasites âgés se coloraient faiblement et devaient par conséquent être faiblement antigéniques, les érythrocytes infestés par des parasites jeunes se coloraient à peine. Peut-être cette constatation appuie-t-elle l'hypothèse selon laquelle l'érythrocyte parasité n'est pas fortement antigénique tant que le parasite est relativement jeune. Ainsi l'immunité contre le paludisme (et l'absorption par les phagocytes) ne sont peut-être déclenchées que par les parasites les plus âgés infestant les érythrocytes et, plus particulièrement, par les mérozoïtes et les autres produits du processus final de schizogonie. Par ailleurs, les lésions des érythrocytes se colorent fortement dans tous les cas et paraissent fortement antigéniques.

15. On a prélevé sur 4 cm² de papier filtre des gouttes de sang obtenues par piqûre digitale et on a conservé ces prélèvements dans un dessiccateur. Au bout d'une période allant jusqu'à deux semaines on les a introduits dans des tubes de matière plastique Tygon fermés à une extrémité. Après y avoir versé 0,3 ml de STP, on a roulé les tubes, en les pressant périodiquement, pendant 30 minutes. On a ensuite extrait le liquide et on l'a utilisé comme sérum à expertiser. La concentration sérique finale était d'environ 1/10. Les résultats obtenus sont indiqués au tableau 4.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brooke, M. M., Melvin, M. & Healy, G. R. (1958) Proc. 6th Int. Congr. Trop. Med. Mal. Lisbon (sous presse)
- Ingram, R. L., Otken, L. B. & Jumper, J. R. (1961) Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 106, 52
- Tobie, J. E. & Coatney, G. R. (1961) Exp. Parasit., 11, 128
- Voller, A. (1962) WHO/Mal/334, 27 avril 1962
- Kuvin, S. F., Tobie, J. E., Evans, C. B., Coatney, G. R. & Contacos, P. T. (1962) Science, 135, 1130

TABLEAU 1. DILUTIONS SÉRIQUES CORRESPONDANT A LA REACTION LIMITE
AVEC UN ANTIGÈNE (L. FALCIPARA) SUR PLAQUE, FIXE A L'ACETONE,
ET UN LOT MÉDIOCRE DE SÉRUM DE LAPIN ET DE CHEVRE ANTIGLOBULINE HUMAINE
MARQUE A L'ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCÉINE

| Origine du sérum | Inverse de la dilution sérique | Inverse de la dilution sérique, corrigé* |
|--|--|--|
| Européens non immuns | 25, 100, 100, 50, 50, 100, 100, 100 | 1 |
| Libériens (immuns) : sang du cordon | 200, 1600, 3200, 800, 800, 400 | 2, 16, 32, 8, 8, 8 |
| Libériens de 6 à 12 mois | 200, 200 | 4, 4 |
| Libériens de 12 à 30 mois | 400, 1600 | 8 |
| Libériens de 30 à 48 mois | 200, 1600 | 2 |
| Libériens de 4 à 10 ans | 1600, 800 | |
| Libériens adultes | 1600, 1600, 3200, 1600, 1600, 800, 1600, 800, 3200, 6400, 6400, 3200, 3200 | 64, 16, 32, 16, 32, 16, 32, 8, 32, 32, 32 |
| Libériens adultes soumis depuis trois ans à un traitement chimioprophylactique | 1600, 800, 100 | 64, 8, 1 |

* Correction amenant à 1 l'inverse de la dilution du sérum témoin non immun quand un lot de lames à colorer comprenait un témoin.

TABLEAU 2. DILUTIONS SÉRIQUES CORRESPONDANT A LA REACTION LIMITE
AVEC UN ANTIGÈNE (L. FALCIPARA) SUR PLAQUE, TRAITÉ A L'ACIDE CHLORHYDRIQUE,
ET UN LOT MÉDIOCRE DE SÉRUM DE LAPIN OU DE CHEVRE ANTIGLOBULINE HUMAINE
MARQUE A L'ISIOTHIOCYANATE DE FLUORESCEINE

| Origine du sérum | Inverse de la dilution sérique |
|--|---|
| Européens non immuns | 1, 1, 1, 1, 1, 1,1, 1 |
| Libériens (immuns) : sang du cordon | 50, 50, 100 |
| Libériens de 6 à 12 mois | 25, 1 |
| Libériens de 12 à 30 mois | 10, 1 |
| Libériens de 30 à 48 mois | 50 |
| Libériens de 4 à 10 ans | 100, 50, 25 |
| Libériens adultes | 200, 100, 25, 50, 25, 50, 50, 50, 100, 100 |
| Libériens adultes soumis depuis trois ans à un traitement chimio- prophylactique | 25, 100 |

TABLEAU 3. DILUTIONS SÉRIQUES CORRESPONDANT A LA REACTION LIMITE AVEC UN ANTIGÈNE (L. FALCIPARA) SUR PLAQUE, TRAITÉ A L'ACIDE CHLORHYDRIQUE, ET UN LOT MÉDIOCRE DE SÉRUM DE LAPIN ANTIGLOBULINE HUMAINE MARQUÉ A L'ISIOTHIOCYANATE DE FLUORESCEINE

| Origine du sérum | Inverse de la dilution sérique |
|--|--|
| Européens non immuns | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 |
| Européens : sang du cordon | 2, 0 |
| Libériens (immuns) : sang du cordon | 100, 100, 100, 400, 800, 400, 800, 6400, 800, 400, 1600 |
| Libériens de 0 à 2 semaines | 5, 25, 25, 400, 1600, 400 50, 1600, 1600, 400, 800 |
| Libériens de 2 semaines à 6 mois | 2, 2, 2, 5, 25, 25, 50, 400, 50, 400, 25, 5, 25, 50, 50, 100, 100, 10, 10, 10, 1600, 50 |
| Libériens de 6 à 12 mois | 0, 25, 2, 5, 25, 100, 100, 50, 100 |
| Libériens de 12 à 30 mois | 5, 10, 25, 25, 10, 25, 200, 200, 10, 25, 5 |
| Libériens de 30 à 48 mois | 50, 100, 50, 100, 50, 50, 25, 200, 400, 400 |
| Libériens de 4 à 10 ans | 100, 200, 200, 400, 25, 200, 800, 200 |
| Libériens adultes de moins de 40 ans | 50, 800, 400, 800, 400, 400, 1600, 100, 3200 |
| Libériens de plus de 40 ans | 3200, 1600, 3200 |
| Libériens adultes après une atteinte de paludisme clinique | 3200, 3200, 800, 200, 1600, 3200, 6400 |
| Libériens adultes d'une zone protégée depuis trois ans par des pulvérisations de DDT | 400, 100, 200, 200, 200, 1600, 200, 50, 200 |
| Libériens adultes du Nigéria et du Cameroun | 100, 100, 200, 1600 |
| Lait provenant de mères libériennes | 0, 0, 5, 0, 2, 5 |

Les résultats sont disposés par ordre chronologique et la tendance à une augmentation du titre est probablement due à la progression vers la saison humide, époque où la transmission du paludisme augmente considérablement et où le paludisme clinique augmente également.

TABLEAU 4. REACTION DE COLORATION AVEC DU SANG RECUEILLI SUR PAPIER FILTRE, PUIS ÉLUÉ, ET UN ANTIGÈNE (L. FALCIPARA) SUR PLAQUE, COMME DANS LE TABLEAU 3

| Origine du sang | Nombre | Résultats |
|---|--------|------------------------------------|
| Européens non immuns | 10 | \pm , 1 ; -, 9 |
| Libériens adultes | 50 | ++, 48 ; +, 2 |
| Libériens de 4 à 10 ans | 25 | ++, 22 ; +, 3 |
| Libériens de 24 à 48 mois | 10 | ++, 9 ; +, 1 |
| Libériens de 12 à 24 mois | 10 | ++, 8 ; +, 2 |
| Libériens de 1 à 12 mois | 10 | ++, 5 ; +, 4; \pm , 1 -, 1 |
| Libériens de moins de 3 ans, d'une zone protégée depuis 3 ans par des pulvérisations de DDT | 10 | +, 1 ; \pm , 2 ; -, 7 |
| Libériens de moins de 3 ans, d'une zone non protégée | 6 | ++, 2 ; +, 4 |

Note : Antigène sur plaque - seconde couche sérique à L. falcipara - sérum de lapin antiglobuline humaine marqué à l'isiothiocyanate de fluorescéine.

Réaction de coloration : brillante (++); nettement visible (+); ne révélant pas tous les parasites visibles (\pm); inexistante (-).

TABLEAU 5. DILUTIONS SÉRIQUES CORRESPONDANT A LA
REACTION LIMITE AVEC LE TITRE MOYEN DE L. FALCIPARA,
COMBINANT LES DONNÉES DES TABLEAUX 2 ET 3

| Origine du sérum | Inverse moyen de la dilution sérique |
|--|--------------------------------------|
| Libériens : sang du cordon | 864 |
| Libériens de 0 à 2 semaines | 628 |
| Libériens de 2 semaines à 6 mois | 131 |
| Libériens de 6 à 12 mois | 39 |
| Libériens de 12 à 30 mois | 42 |
| Libériens de 30 à 48 mois | 134 |
| Libériens de 4 à 10 ans | 209 |
| Libériens adultes de moins de 40 ans | 467 |
| Libériens de plus de 40 ans | 2 333 |
| Libériens adultes après une atteinte de paludisme clinique | 2 657 |
| Libériens adultes d'une zone protégée depuis 3 ans par des pulvérisations de DDT | 350 |

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.

La parution d'un article dans cette série ne constitue donc pas une publication officielle et un tel article peut donc, avec l'accord de l'auteur et de l'OMS, être publié dans un périodique de l'OMS ou ailleurs.

Les articles signés n'engagent que leurs auteurs. 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.