



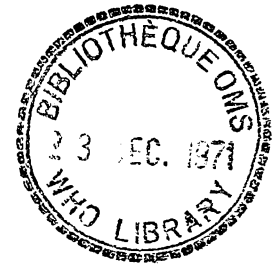
a 66087

LYOPHILISATION D'ANTIGENES FIGURES
DESTINES AUX TESTS D'IMMUNOFLUORESCENCE DU PALUDISME

Résultats préliminaires¹

par

P. Ambroise-Thomas,² J. Duprat,³ Mme A. Goullier,² et T. Kien Truong⁴



Dans ses applications au sérodiagnostic du paludisme, la réaction d'immunofluorescence indirecte offre comme principal avantage pratique de n'exiger qu'une très minime quantité de sang parasité pour la préparation des antigènes figurés. Avec ce matériel, on réalise des étalements minces ou bien encore des gouttes épaisses suivant la technique de Sulzer & Wilson (1967). Après séchage, ces préparations peuvent être conservées pendant plusieurs mois à -70°C. Ce mode de stockage est extrêmement commode tant que les antigènes ne quittent pas le laboratoire. Au contraire, il entraîne de nombreuses difficultés pour l'expédition ou pour le transport des préparations antigéniques. Nous avons donc essayé de lui substituer une conservation après lyophilisation des sangs parasités.

1. Matériels et méthodes

Dans tous les cas, nous avons travaillé à partir de sangs de singes Macaca mulatta, splénectomisés ou non, et inoculés par injections intraveineuses de sang hépariné contenant au total environ 20 millions de Plasmodium cynomolgi bastianellii.

Le sang de ces animaux a été prélevé quand la parasitémie atteignait 8 à 10 %.

Pour toute l'expérience, nous avons utilisé comme préparations témoins des étalements minces ou des gouttes épaisses, séchés et conservés à -70°C ou dans l'azote liquide.

Nos essais ont été réalisés suivant deux modalités de lyophilisation : sur lames ou en flacons.

1.1 Lyophilisation sur lames

Cette technique a été utilisée au cours de cinq expériences différentes.

¹ Travail effectué avec l'aide financière de l'Organisation mondiale de la Santé.

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

³ Centre d'études cryogéniques de l'air liquide, 38 - Sassenage, France.

⁴ Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, 69 - Lyon, France

Pour ces essais, nous avons employé des lames de microscopes en verre ordinaire sur lesquelles ont été effectués soit des étalements minces de sang parasité, soit encore des gouttes épaisses suivant la technique de Sulzer & Wilson.

Ces lames ont été placées dans des bouches de verre pouvant être bouchés hermétiquement. L'ensemble a été porté dans la cuve d'un appareil à lyophiliser¹ où la température avait été abaissée à environ -40°C à l'aide de glace carbonique. La précongélation a donc été effectuée directement dans l'enceinte à vide. On a ainsi évité d'avoir à transférer des lames d'un congélateur dans la cuve, ce qui, étant donné la très faible épaisseur des préparations, aurait entraîné une décongélation inévitable et rendu impossible la lyophilisation proprement dite. La précongélation a été considérée comme totale après 30 minutes.

La lyophilisation a été faite dans les conditions suivantes : température du condenseur -45°C , vide de $30\ \mu$ de mercure, soit 3,09 unités Pascal. La dessiccation a duré environ cinq heures, après quoi le vide a été cassé avec de l'azote. Dans chaque bocal on a alors placé un sachet de produit déshydratant² permettant de vérifier l'absence ultérieure de réhydratation, puis les flacons ont été bouchés aussi rapidement que possible. Ils ont été conservés pour moitié à $+4^{\circ}\text{C}$ et pour l'autre moitié à la température ordinaire.

1.2 Lyophilisation en flacons

Ce type de lyophilisation a pu être réalisé pour quatre lots différents de sangs parasités qui ont été prélevés par ponction veineuse à l'aide d'une seringue contenant une trace d'héparine. Ils ont été mélangés à une quantité égale d'une solution à 2 % de formol (formol de commerce) dans du sérum physiologique stérile. Le mélange a été maintenu une demi-heure à la température ordinaire. Les sangs ont été alors lavés à trois reprises dans du tampon phosphate pH 7,2, en utilisant chaque fois au moins dix volumes de tampon pour un volume de sang.

A l'issue de la dernière centrifugation (5000 tours/minute pendant 5 minutes) le culot a été repris dans une solution de saccharose à 5 % dans de l'eau bidistillée, jusqu'à obtention du volume initial du sang prélevé.

L'ensemble a été agité pendant un quart d'heure, pour homogénéiser le produit qui a ensuite été réparti dans des flacons de type pénicilline à raison de 0,5 ml par flacon.

La précongélation fut réalisée par immersion des flacons dans des vapeurs d'azote liquide à $-150^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.

La lyophilisation a été effectuée dans un appareil muni d'une boîte boucheuse contenant les flacons, et dont la température a été stabilisée à -50°C par circulation d'un liquide réfrigérant refroidi par l'azote liquide.³

La sublimation a été faite à -50°C (sous un vide de 5 à $10\ \mu$ de mercure en fin d'opération) et la dessiccation secondaire effectuée à la température ambiante du laboratoire ($+30^{\circ}\text{C}$ environ). La lyophilisation proprement dite a, au total, duré 8 heures.

¹ Appareil Virtis 10-146 M.R.B.A.

² Silicagel.

³ Appareil Air liquide, type L.Y. 2, équipé d'une boîte boucheuse Usifroid.

Le vide a alors été cassé avec de l'azote et les flacons ont été bouchés dans l'enceinte en atmosphère d'azote, ce qui fait que le produit lyophilisé n'est jamais entré en contact avec l'air.

Après avoir scellé les flacons avec les capsules, le produit a été comme précédemment stocké à +4°C. Certains flacons ont par ailleurs été maintenus un mois à la température ordinaire.

Au moment de l'emploi, le contenu de chaque flacon a été remis en suspension dans 0,5 ml d'eau bidistillée puis réparti en gouttes de 60 microlitres environ sur des lames porte-objets. Après séchage, ces préparations étaient immédiatement disponibles pour des réactions d'immunofluorescence ou bien encore elles pouvaient être conservées au congélateur à -70°C.

2. Résultats et commentaires

2.1 Les préparations lyophilisées sur lames nous ont dans l'ensemble donné d'excellents résultats. Ce type de conservation pose néanmoins d'assez gros problèmes pratiques. Il est en effet indispensable de placer les lames dans un récipient hermétique et qui leur assure par ailleurs un minimum de protection contre les chocs. Pour les essais, nous avons recouru à une technique très artisanale en utilisant des bocaux de verre garnis intérieurement de fragments de polystyrène expansé. Une telle solution est évidemment inemployable sur une vaste échelle et, inversement, la réalisation de boîtes spéciales répondant aux différentes conditions, nous paraît bien trop onéreuse.

2.2 Les meilleurs résultats ont été indiscutablement obtenus à partir des sangs lyophilisés en flacons. Nous en avons vérifié la qualité antigénique immédiatement après la lyophilisation puis à des intervalles d'un mois. Pour cela, on a effectué des séries de réactions d'immunofluorescence indirecte en faisant réagir au moins 8 sérums témoins (dont 3 négatifs) sur les différents lots d'antigènes lyophilisés et sur des préparations témoins.

Pour 3 lots d'antigènes, ces contrôles n'ont pu être répétés que durant 5 mois, tandis que le dernier lot a, lui, été vérifié pendant 8 mois.

Dans tous les cas, nous n'avons enregistré aucune baisse de l'activité antigénique des plasmodiums par rapport aux lames témoins non lyophilisées et conservées d'emblée à -70°C.

Nous n'avons pas non plus observé de différences décelables entre les flacons conservés à +4°C et ceux qui ont été maintenus à la température ordinaire pendant une période d'un mois.

Enfin, nous avons contrôlé la qualité de gouttes épaisses réalisées à partir des sangs lyophilisés et qui, après séchage à l'air, ont été conservés au congélateur à -70°C. Avec un recul de 2 mois, ces préparations antigéniques paraissaient avoir les mêmes caractéristiques que les préparations témoins.

3. Conclusions

Ces expériences sont bien trop préliminaires pour que nous puissions en dégager des conclusions définitives. Cependant, nos premiers résultats ont été assez satisfaisants pour que nous jugions utile de les rapporter, dans l'espoir que notre technique pourra être reprise, sur une plus vaste échelle, dans d'autres laboratoires.

La lyophilisation de sangs parasités paraît en effet offrir d'intéressantes possibilités pour la conservation et surtout pour le transport ou l'expédition des antigènes figurés destinés à l'immunofluorescence indirecte du paludisme.

Cette technique pourrait peut-être aussi simplifier la préparation des antigènes multispécifiques réalisés suivant la méthode de Sulzer & coll. (1971). Pour ces antigènes, il faut en effet disposer, au même moment, de sangs de plusieurs singes parasités par différents plasmodiums et présentant tous un niveau optimal de parasitémie. Tous ces impératifs sont probablement difficiles à satisfaire et il serait sans doute plus commode de pouvoir lyophiliser séparément chacun de ces sangs pour procéder ultérieurement à leur mélange.

Summary

One of the difficulties in using antigen blood slides for the malaria indirect fluorescent antibody test is that these slides must be maintained at -70°C and lose activity rapidly if the temperature is allowed to rise appreciably during transportation. To overcome this, lyophilization techniques were tested. Using the blood of Macaca mulatta infected with Plasmodium cynomolgi bastianellii with 8-10% red blood cells showing parasites, two techniques were employed, lyophilization of the blood on the slide and lyophilization of a formalized, centrifuged blood specimen.

A disadvantage of the lyophilized blood slide, which otherwise gave excellent results, was that specimens must be retained in hermetically sealed containers and be protected against vibrations.

The second method which necessitates the reconstitution of the specimen with distilled water, followed by drying, gave comparable results after five and up to eight months storage at 4°C or at room temperature with those obtained from control thin and thick blood slides prepared in the usual way and preserved at -70°C or in liquid nitrogen. It is believed that preservation of these specimens by lyophilization could be useful especially where transport of the antigens for the IFA test is necessary; but further experience is required to confirm their keeping properties.

BIBLIOGRAPHIE

- Ambroise-Thomas, P. (1969) Etude séro-immunologique de 10 parasitoses par les techniques d'immunofluorescence, Thèse Doct. ès sciences, 645 pages, Lyon
- Sulzer, A. J. & Wilson M. (1967) The use of thick-smear antigen slides in the malaria fluorescent antibody test, J. parasit., 53, 1110-1111
- 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, Doc. ronéotypés OMS, WHO/MAL/71.749

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.