

a 63359



WHO/Ma1/393  
3 mai 1963

ORIGINAL : ANGLAIS

MESURE DES ANTICORPS DANS LES INFECTIONS PALUDEENNES CHEZ L'HOMME,  
AU MOYEN DE L'EPREUVE D'HEMAGGLUTINATION UTILISANT DES HEMATIES DE MOUTON  
TRAITEES A L'ACIDE TANNIQUE ET AU FORMOL<sup>1</sup>

par

B. Stein & R. S. Desowitz  
Service de Parasitologie, Faculté de Médecine,  
Université de Singapour, Singapour

On sait que chez l'homme et chez l'animal l'impaludation provoque une réaction d'immunité, mais on n'a disposé jusqu'à présent que d'un petit nombre de moyens pour déceler et mesurer les anticorps humoraux élaborés pour combattre le parasite. Eaton (1938) a décrit une épreuve d'hémagglutination utilisant un antigène homologue et le sérum de singes atteints de paludisme chronique, ou guéris d'une infection à Plasmodium knowlesi. En 1939, Eaton & Coggeshall ont démontré la présence d'anticorps fixant le complément chez des singes immunisés au moyen d'injections de Plasmodium knowlesi tué utilisé comme antigène. Ils ont abouti à la conclusion que ces anticorps étaient spécifiques de groupe et non de souche et ne protégeaient pas l'organisme contre une nouvelle infection. En 1950, Sutliff et al. ont découvert que l'épreuve de fixation du complément avec P. knowlesi pouvait être utilisée pour faire le diagnostic des cas dont le tableau clinique et l'historique sont ceux du paludisme, mais sans parasitémie décelable. Plus récemment, la technique de l'immuno-fluorescence a été employée par Tobie & Coatney (1961), Tobie, Kuvin, Coatney & Evans (1962) et Voller & Bray (1962).

<sup>1</sup> Travail exécuté avec l'appui de l'Organisation mondiale de la Santé.

L'épreuve d'hémagglutination avec des hématies traitées à l'acide tannique s'est révélée remarquablement sensible; elle ne nécessite que de petites quantités d'anticorps et d'antigène et a été appliquée à la recherche des anticorps élaborés par l'organisme contre un certain nombre de parasites tels que Toxoplasma (Lunde & Jacob, 1959) et Schistosoma (Kagan, 1955). En 1962, Desowitz & Stein ont décrit l'application de la méthode en question avec l'anticorps de P. berghei et l'antigène homologue. Le présent rapport expose une variante de cette épreuve dans laquelle on emploie des hématies de mouton traitées à l'acide tannique et au formol pour déterminer les réactions des divers antigènes plasmodiaux et des sérums de sujets humains paludéens.

#### MATERIEL ET METHODES

##### Préparation des antigènes

Dans ces expériences, on a utilisé comme antigènes des extraits aqueux de P. berghei, P. cynomolgi et P. vivax. P. berghei a été prélevé soit sur des jeunes rats (4 à 6 semaines) dont le sang examiné à l'objectif à immersion présentait 30 à 40 parasites par champ, soit sur des rats adultes splénectomisés. Dix jours après la splénectomie, ces derniers ont reçu, à trois ou quatre jours d'intervalle, quatre injections intra-péritonéales de 0,5 ml de sang de jeune rat fortement infecté; ils ont ensuite été saignés par ponction du coeur dès que l'examen microscopique d'un étalement mince faisait apparaître 30 à 40 parasites par champ. L'antigène de P. cynomolgi a été préparé à partir du sang d'un singe Rhesus fortement infecté,<sup>1</sup> et l'antigène de P. vivax à partir du sang de malades impaludés, en traitement à l'hôpital général de Singapour.

La préparation de l'antigène se faisait de la même façon pour toutes les espèces. Le sang infecté était hépariné, puis centrifugé à 4000 t/mn pendant 10 minutes; on décantait ensuite le plasma. On procédait alors à deux lavages des globules rouges dans de l'eau physiologique. Puis on hémolysait le sédiment dans 5 volumes d'eau distillée et on centrifugeait à nouveau à 4000 t/mn pendant 10 minutes. On jetait alors le liquide surnageant; on hémolysait à nouveau le sédiment, on le centrifugeait et le lavait deux fois dans une solution physiologique tamponnée

---

<sup>1</sup> Ce singe nous a été aimablement fourni par les Drs Eyles et Warren du United States Public Health Service Far East Research Project, attachés à l'Institut de Recherche médicale de Kuala Lumpur, Fédération de Malaisie.

au phosphate à pH 7,2 (STP). Le dépôt final était remis en suspension dans 1 ml de STP, soigneusement écrasé dans un homogénéisateur en tissu de verre et centrifugé à 1000 tr/mn pendant 5 minutes. Le liquide surnageant était utilisé comme antigène; à moins d'utilisation immédiate, il était conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . L'antigène témoin était préparé selon le même procédé à partir d'hématies normales non infectées.

#### Préparation des hématies de mouton traitées à l'acide tannique et au formol

Le sang de mouton était mélangé à un volume égal de solution d'Alsevers et conservé au réfrigérateur pendant plusieurs jours avant tout nouveau traitement. Les hématies étaient traitées au formol selon une variante du procédé de Czismas (1960). On lavait 100 ml de sang sept fois par centrifugation, dans de l'eau physiologique et on remettait les globules lavés en suspension dans 9 volumes de STP. Dans un Erlenmeyer on introduisait 200 ml de cette suspension et l'on y faisait tremper un sac de cellophane contenant 50 ml de formol à 20 %. On secouait le flacon pendant deux heures puis on perçait le sac, libérant ainsi le formol dans la suspension cellulaire. On mélangeait alors les globules et le formol au moyen d'un agitateur magnétique pendant 18 heures, puis on retirait le caillot formé, on filtrait la suspension sur une gaze et, pour terminer, on la lavait sept fois dans 10 volumes de STP.

Le traitement par l'acide tannique se faisait en mélangeant à volumes égaux une solution d'acide tannique à 1:20 000 dans la STP et une suspension d'hématies à 2,5 % (également dans la STP), puis en faisant incuber le mélange à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes. Après incubation, les hématies étaient lavées une fois et remises en suspension dans la STP à un taux de dilution de 2,5 %.

#### Sensibilisation des hématies par l'antigène et mode opératoire pour réaliser l'épreuve

Pour réaliser l'épreuve, il faut tout d'abord déterminer la concentration optimum d'antigène nécessaire à la sensibilisation des hématies traitées à l'acide tannique et au formol. Les concentrations trop élevées produisaient des réactions

faussement positives, aussi était-il nécessaire d'éprouver chaque lot d'antigène au moyen d'une solution d'albumine de boeuf cristallisée à 0,125 % p/v dans la STP (ABCP). La sensibilisation des hématies s'obtenait en mélangeant à volumes égaux la suspension à 2,5 % d'hématies traitées à l'acide tannique et une dilution d'antigène dans 4 volumes de STP. La série de dilutions d'antigène utilisée allait de 1:10 à 1:100. Le mélange était conservé pendant 15 minutes à la température du laboratoire, puis centrifugé à 1000-1500 tr/mn pendant 5 minutes et finalement remis en suspension dans 2 volumes d'ABCP. La suspension était de nouveau centrifugée à 1000 tr/mn pendant 5 minutes et le sédiment obtenu finalement remis en suspension dans un volume d'ABCP, ce qui ramenait la dilution à sa valeur primitive (2,5 %). L'épreuve était effectuée dans des tubes de 75 mm x 12 mm parfaitement propres. A 0,5 ml (1 goutte) d'ABCP, on ajoutait une goutte de la suspension d'hématies traitées à l'acide tannique et au formol, préalablement sensibilisée par la série de dilutions d'antigène. On choisissait la concentration la plus élevée qui donnait un résultat négatif au bout de 24 heures; elle correspondait généralement à un titre de dilution de l'antigène d'environ 1:50.

Le sérum à expertiser était inactivé à 56° pendant 30 minutes, puis mis à absorber pendant une nuit au réfrigérateur avec un volume égal d'hématies de mouton agglomérées, préalablement lavées trois fois avec de la STP. On diluait ensuite le sérum inactivé, absorbé, avec de l'ABCP, en série de raison 2, à partir de 1:100 jusqu'à 1:25 600. A 0,5 ml de sérum dilué on ajoutait une goutte de la suspension d'hématies sensibilisées, on agitait le tube, on lisait le résultat une première fois 4 heures plus tard et une seconde fois 24 heures plus tard. Les lectures étaient faites conformément à la description des schémas d'hémagglutination donnée par Stavitsky (1954) et Boyden (1951).

## RESULTATS

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1. Sur les 27 sujets dont le sérum a été expertisé, 25 étaient atteints d'une infection à P. vivax, un d'une infection mixte à P. vivax et P. falciparum et un d'une infection à P. falciparum. La banque de sang de l'Hôpital général a fourni 38 sérums témoins prélevés sur des adultes apparemment indemnes de paludisme. Bien qu'il n'y ait pas de paludisme à Singapour, cette maladie est endémique dans la Fédération de Malaisie et dans les îles indonésiennes avoisinantes. Aussi était-il difficile de s'assurer que les donneurs de sérum témoin n'avaient pas contracté le paludisme à un moment quelconque de leur existence. Un certain nombre des sérums provenant des sujets normaux ont donc réagi, mais généralement beaucoup moins que les sérums des malades impaludés. Par rapport aux sérums témoins, le titre moyen des sérums des sujets infectés a été trouvé cinq fois plus élevé avec l'extrait antigénique de P. berghei, huit fois plus élevé avec celui de P. cynomolgi et 12 fois plus élevé avec celui de P. vivax. Bien que le titre moyen des sérums témoins ait été plus fort avec l'extrait de P. vivax, celui des sérums des sujets infectés s'est aussi élevé, proportionnellement, de 1:9170. Le titre maximum des sérums des sujets infectés a été de 1:3200 avec l'extrait antigénique de P. berghei, de 1:6400 avec celui de P. cynomolgi et de 1:25 600 avec celui de P. vivax. Il est intéressant de noter que le sérum du malade présentant une infection à P. falciparum et celui d'un enfant de 6 ans atteint de paludisme à P. vivax donnaient une réaction négative avec l'extrait antigénique de P. berghei, mais donnaient, avec celui de P. vivax, des titres de 1:400 et 1:800, respectivement. Le tableau 2 rassemble les résultats de quelques épreuves d'hémagglutination caractéristiques.

L'antigène témoin préparé à partir de sang indemne n'a provoqué aucune réaction d'hémagglutination positive.

## DISCUSSION

L'un des principaux obstacles à la mise au point d'une épreuve sérologique pratique pour déceler l'immunité paludéenne est la difficulté d'extraire du petit parasite intracellulaire une quantité suffisante d'antigène. L'épreuve d'hémagglutination utilisant des hématies traitées à l'acide tannique et au formol résout ce

problème car elle n'exige que des quantités minimales, (probablement de l'ordre du microgramme) de protéine antigénique et un millilitre de sérum de sujet infecté suffit largement. La méthode semble extrêmement sensible, car on a enregistré des titres allant jusqu'à 1:25 600 avec l'antigène homologue. La possibilité d'obtenir des résultats positifs avec l'extrait antigénique de P. berghei prouve que l'on dispose d'une source d'antigène facilement accessible pour la détermination expérimentale ordinaire de la présence d'anticorps, au moins dans le cas des infections à P. vivax. Il faut reconnaître que les titres obtenus avec l'antigène hétérologue sont inférieurs à ceux que donne l'antigène homologue, mais il semble qu'un titre supérieur à 1:400 avec l'extrait antigénique de P. berghei soit le signe d'une infection à P. vivax. Des travaux sont actuellement en cours pour suivre la réponse d'immunité démontrée par les titres d'hémagglutination au cours d'infections paludéennes en vue d'établir un rapport entre le stade de l'infection et le degré d'immunisation, d'une part, et le titre d'hémagglutination, d'autre part.

On pourrait également appliquer la technique susmentionnée à la détermination du rapport antigénique entre différentes espèces de Plasmodia. L'antigène hétérologue donne des résultats positifs, mais il faut noter que l'on obtient des réactions plus fortes avec l'extrait antigénique de P. cynomolgi qu'avec celui de P. berghei lorsqu'on utilise des antisérums de P. vivax, ce qui indiquerait une relation plus étroite entre le premier nommé et P. vivax. L'unique échantillon de sérum prélevé sur un malade atteint d'une infection à P. falciparum n'a donné de réaction croisée ni avec l'extrait antigénique de P. berghei, ni avec celui de P. cynomolgi, alors qu'on a obtenu un titre de 1:400 avec celui de P. vivax. On rassemble actuellement des sérums de sujets atteints d'infection à P. falciparum afin de procéder à des nouveaux essais sérologiques. Il sera également intéressant de suivre la variation des titres d'hémagglutination après chimiothérapie, afin de savoir si la technique étudiée peut indiquer l'obtention d'une guérison radicale.

Il faudra aussi chercher à élucider la cause des réactions positives obtenues avec des sérums témoins censés être "normaux". Il est pratiquement impossible

de trouver à Singapour, pour le prélèvement de sérum, des autochtones n'ayant jamais eu de contact avec le paludisme. Le titre moyen des sérums normaux est plus élevé avec l'extrait antigénique de P. vivax qu'avec celui de P. berghei ou de P. cynomolgi. Cela donne à penser que certaines des réactions positives obtenues avec les sérums "normaux" pourraient être dues à la présence d'anticorps. On s'efforce actuellement de recueillir du sérum de sujets n'ayant jamais pénétré dans une zone impaludée, afin de vérifier si les réactions positives données par les sérums témoins étaient dues à de faibles concentrations d'anticorps ou à la présence dans certains d'entre eux d'un facteur normal non spécifique.

#### RESUME

On a utilisé pour mesurer les anticorps élaborés au cours du paludisme humain une épreuve d'hémagglutination avec des hématies de mouton traitées à l'acide tannique et au formol. Le présent document décrit la préparation de l'antigène à partir de globules rouges infectés hémolysés, ainsi que la technique d'exécution de l'épreuve. L'antigène a été extrait de P. berghei, P. cynomolgi et P. vivax. La plupart des sérums ont été prélevés sur des sujets atteints d'infection à P. vivax; c'est avec les extraits antigéniques de P. cynomolgi et P. vivax qu'ils donnaient les titres les plus élevés (jusqu'à 1:25 600). On a constaté des réactions d'hémagglutination positives avec les extraits antigéniques de P. berghei, mais à des titres inférieurs.

Un certain nombre des sérums témoins "normaux" fournis par la Banque de Sang de l'Hôpital général de Singapour ont donné des réactions positives, mais généralement à un titre beaucoup plus faible que les sérums prélevés sur des malades. On étudie actuellement les causes possibles de ces réactions positives.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à adresser leurs sincères remerciements aux Drs D. Eyles et W. M. W. Warren du United States Public Health Service Far East Research Project qui les ont aidés à obtenir des antigènes de paludisme simien. Ils remercient également M. S. Subbiah, F.I.M.L.T., de l'Hôpital général de Singapour qui leur a fourni du sérum de sujets humains impaludés.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boyden, S. V. (1951) J. exp. Med., 93, 107
- Czismas, L. (1960) Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 103, 157
- Desowitz, R. S. & Stein, B. (1961) Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 56, 257
- Eaton, M. D. (1938) J. exp. Med., 67, 857
- Eaton, M. D. & Coggeshall, L. T. (1939) J. exp. Med., 70, 141
- Kagan, I. G. (1955) Exp. Parasit., 4, 361
- Lund, M. N. & Jacobs, L. (1959) J. Immunol., 82, 146
- Stavitsky, A. B. (1954) J. Immunol., 72, 360
- Sutliff, W. D., Dulaney, A. D. & Davis, W. L. (1950) J. nat. Malar. Soc., 9, 75
- Tobie, I. E. & Coatney, G. R. (1961) Exp. Parasit., 11, 128
- Tobie, I. E., Kuvin, S. F., Contacos, P. G. & Coatney, G. R. (1962) Amer. J. trop. Med. Hyg., 11, 589
- Voller, D. & Bray, R. S. (1962) Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 56, 436

TABLEAU 1. RESULTATS DES EPREUVES D'HEMAGGLUTINATION EFFECTUEES  
AVEC DU SERUM DE SUJETS INFECTES ET DE SUJETS INDEMNES,  
ET TROIS EXTRAITS ANTIGENIQUES PLASMODIAUX

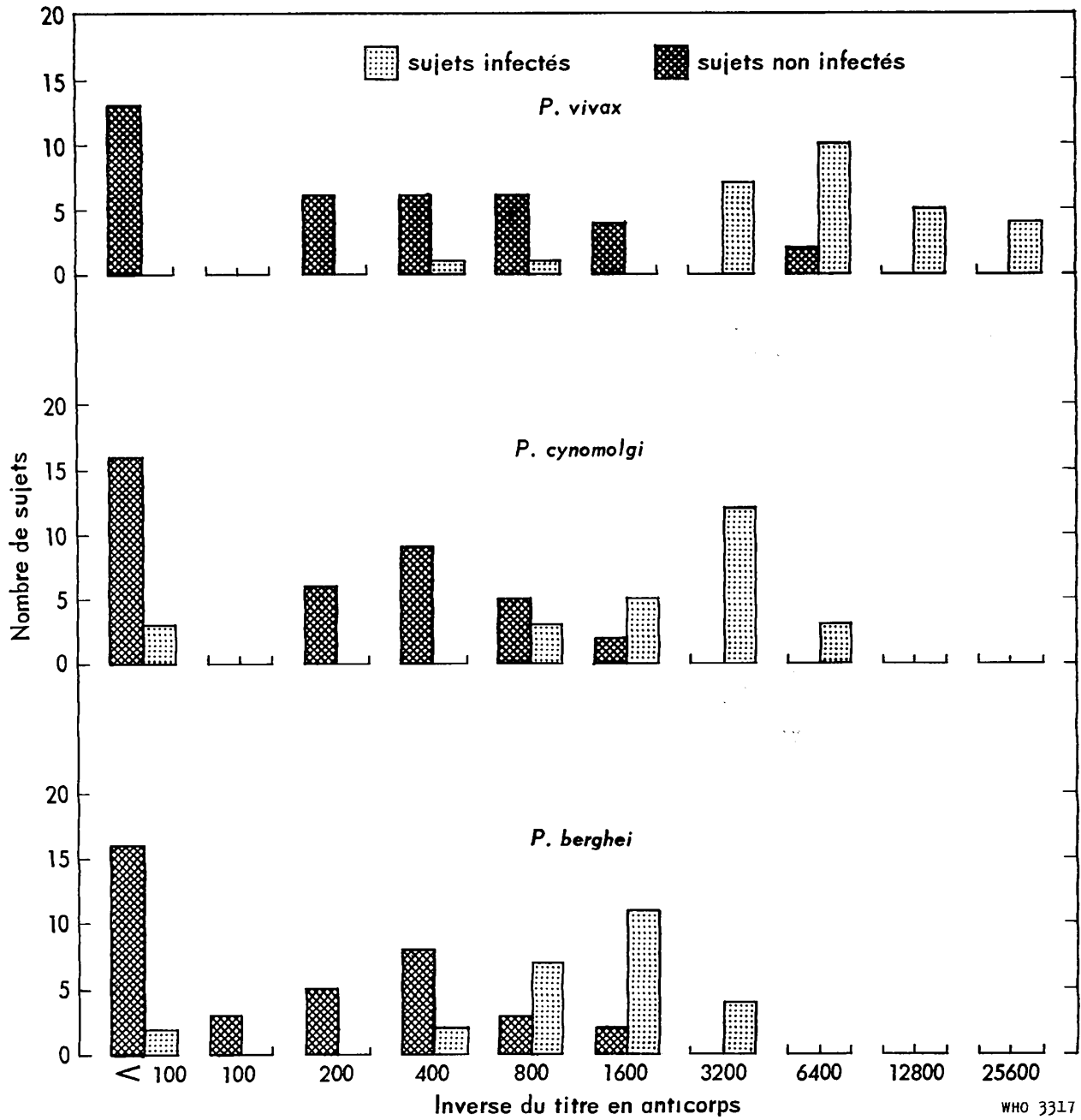
	Titres des anticorps (inverses)									
	100	100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600
Extrait antigénique de <u>P. vivax</u>										
Sujets infectés	-	-	-	1	1	-	7	10	5	4
Sujets indemnes	13	-	6	6	6	4	-	2	-	-
Extrait antigénique de <u>P. cynomolgi</u>										
Sujets infectés	16	-	6	9	5	2	-	-	-	-
Sujets indemnes	3	-	-	-	3	5	12	3	-	-
Extrait antigénique de <u>P. berghei</u>										
Sujets infectés	16	3	5	8	3	2	-	-	-	-
Sujets indemnes	2	-	-	2	7	11	4	-	-	-

TABLEAU 2. QUELQUES REACTIONS D'HEMAGGLUTINATION CARACTERISTIQUES  
OBTENUES AVEC LES EXTRAITS ANTIGENIQUES DE P. BERGHEI, P. CYNOMOLGI ET P. VIVAX

Malade No	Age (années)	Infection	Titre obtenu avec <u>P. berghei</u>	Titre obtenu avec <u>P. cynomolgi</u>	Titre obtenu avec <u>P. vivax</u>
1	6	<u>P. vivax</u>	0	1:800	1:800
3	28	<u>P. falciparum</u>	0	0	1:400
4	25	<u>P. vivax</u>	1:800	1:1 600	1:3 200
7	29	<u>P. vivax</u>	1:800	1:1 600	1:3 200
11	13	<u>P. vivax</u>	1:1 600	1:1 600	1:6 400
12	25	<u>P. vivax</u>	1:400	1:3 200	1:3 200
13	10	<u>P. vivax</u>	1:800	1:1 600	1:6 400
15	11	<u>P. vivax</u>	1:1 600	1:6 400	1:6 400
16	25	<u>P. vivax + P. falciparum</u>	1:800	1:3 200	1:12 800
17	30	<u>P. vivax</u>	1:1 600	1:1 600	1:3 200
19	19	<u>P. vivax</u>	1:1 600	1:3 200	1:6 400
20	30	<u>P. vivax</u>	1:1 600	1:6 400	1:12 800
21	18	<u>P. vivax</u>	1:1 600	1:3 200	1:6 400
23	31	<u>P. vivax</u>	1:1 600	1:6 400	1:12 800

FIG. 1

DISTRIBUTION DES TITRES D'HÉMAGGLUTINATION OBTENUS AVEC DIVERS ANTIGÈNES PLASMODIAUX DANS UN GROUPE DE SUJETS NORMAUX ET DE SUJETS INFECTÉS PAR LE PALUDISME



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.