

## Valeur et limites de l'antigène *Plasmodium gallinaceum* pour le sérodiagnostic du paludisme humain par immunofluorescence indirecte \*

P. AMBROISE-THOMAS,<sup>1</sup> C. C. DRAPER,<sup>2</sup> T. KIEN TRUONG,<sup>3</sup> & A. GOULLIER<sup>4</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 (*Plasmodium 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 et al. (1945) par la technique de fixation du complément, Todorovic et al. (1967) par des tests d'agglutination et surtout Kielmann et al. (1968 a, b; 1970 a, b) en immuno-fluorescence indirecte. Au contraire, Ingram et al. (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*; 90 de ces sérums ont en outre été étudiés face à l'antigène *P. falciparum*.

### Matériel et méthodes

**Antigènes.** Pour la préparation de nos antigènes, nous avons utilisé :

- deux souches différentes de *P. gallinaceum* (Institut tropical suisse de Bâle et Institut Pasteur de 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'inoculation 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. Lors du prélèvement, effectué après 7 à 10 jours, la parasitémie était de 10% environ;
- enfin, une souche de *P. falciparum* entretenue sur des *Aotus trivirgatus* splénectomisés. La parasitémie au moment du prélèvement était de 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 & Wilson (1967).

Jusqu'au moment de leur emploi, ces préparations antigéniques ont été conservées au congélateur à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**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 témoins);
- 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  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ils avaient été au préalable

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

<sup>1</sup> Professeur agrégé, Laboratoire de Parasitologie et Pathologie exotique, Faculté de Médecine de Grenoble, 38 La Tronche, France.

<sup>2</sup> Senior Lecturer, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, Londres, Angleterre.

<sup>3</sup> Assistant au Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Lyon, France.

<sup>4</sup> Assistante de Parasitologie, Centre hospitalier universitaire, Grenoble.

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 réactions d'immunofluorescence avec l'antigène *P. falciparum* ont été effectuées aux dilutions 1/16, 1/32, 1/64, etc.

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

**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 ses collaborateurs.

#### Résultats et commentaires

**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 :

— la souche de *P. gallinaceum* (Institut tropical suisse de Bâle ou Institut Pasteur de Paris);

— la date de prélèvement des sangs parasités (entre le 6<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> 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 al. (1970 a, 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.

**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 et 1/20 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 1).

Par ailleurs, un pool d'immunsérums de souris blanches anti-*P. berghei yoelii* a été incorporé dans

Tableau 1. Sérums témoins

Antigène	Nature des sérums	Nombre de sérums présentant un titre (inverse) d'anticorps fluorescents de					Total
		0	16	20	32	40	
<i>P. falciparum</i>	H <sup>a</sup>	38	2	NP <sup>b</sup>	0	NP	40
	S <sup>c</sup>	1	0	NP	0	NP	1
<i>P. cynomolgi bastianellii</i>	H	38	NP	2	NP	0	40
	S	0	NP	0	NP	1	1
<i>P. gallinaceum</i>	H	39	NP	1	NP	0	40
	S	0	NP	1	NP	0	1

<sup>a</sup> H = sérum humain témoin négatif.

<sup>b</sup> NP = test non pratiqué.

<sup>c</sup> S = pool d'hyperimmuns sérums de souris anti-*P. berghei yoelii*.

Tableau 2. Sérums de chimpanzés impaludés expérimentalement

Singe N°	Type et ancienneté de l'infection			Traite- ment	Inverses des titres d'anticorps fluorescents avec les antigènes		
	<i>P. falci- parum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>		<i>P. falci- parum</i>	<i>P. cynomolgi bastianellii</i>	<i>P. galli- naceum</i>
315	NP <sup>a</sup>	12 mois	48 mois	0	64	80	20
521	3 mois	24 mois	NP	0	64	40	0
	4 mois ½	25 mois ½	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

<sup>a</sup> NP = Test non pratiqué.

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 insu, 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 en ce qui concerne la valeur des réactions d'immunofluorescence

Tableau 3. Sérums humains de sujets suspects de paludisme ou d'antécédents palustres : comparaison des antigènes *P. cynomolgi bastianellii* et *P. gallinaceum*<sup>a</sup>

	Antigène <i>P. gallinaceum</i>								Total
	0	20	40	80	160	320	640		
Antigène <i>P. cynomolgi bastianellii</i>	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 (55,8%)	67	22	12	10	7	1	1	120	95 sérums positifs (80,2%) MGIT <sup>b</sup> : 22,4
53 sérums positifs (44,2%) MGIT <sup>b</sup> : 5,4									

<sup>a</sup> La teneur des sérums en anticorps est exprimée par l'inverse des titres.

<sup>b</sup> MGIT = moyenne géométrique de l'inverse des titres d'anticorps fluorescents.

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.

*Sérums de chimpanzés impaludés expérimentalement.* Le tableau 2 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 8 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).

*Sérums humains prélevés chez les malades suspects d'antécédents palustres.* La comparaison des antigènes *P. gallinaceum* et *P. cynomolgi bastianellii* a porté sur 120 sérums de sujets ayant séjourné outremer et présentant des antécédents palustres certains ou très probables (tableau 3).

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.

La comparaison des antigènes *P. falciparum*, *P. cynomolgi bastianellii* et *P. gallinaceum* a été effectuée sur 30 des sérums précédents qui ont été également étudiés face à l'antigène *P. falciparum* (tableau 4).

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*.

Tableau 4. Sérums humains de sujets suspects de paludisme ou d'antécédents palustres : comparaison des antigènes *P. falciparum*, *P. cynomolgi bastianellii* et *P. gallinaceum*

Antigène	Nombre de sérums présentant un titre (inverse) d'anticorps fluorescents de															Total	Sérums positifs	MGIT <sup>a</sup>	
	0	16	20	32	40	64	80	128	160	256	320	512	640	1024	2048				4096
<i>P. falciparum</i>	13 (43,3%)	7	NP <sup>b</sup>	0	NP	6	NP	0	NP	2	NP	0	NP	1	0	1	30	17 (56,6%)	10,5
<i>P. cynomolgi bastianellii</i>	9 (30%)	NP	8	NP	9	NP	2	NP	2	NP	0	NP	0	NP	NP	NP	30	21 (70%)	12,6
<i>P. gallinaceum</i>	23 (76,6%)	NP	2	NP	4	NP	0	NP	1	NP	0	NP	0	NP	NP	NP	30	7 (23,3%)	2,4

<sup>a</sup> MGIT = moyenne géométrique de l'inverse des titres d'anticorps fluorescents.  
<sup>b</sup> NP = test non pratiqué.

Tableau 5. Paludismes humains certains: comparaisons des antigènes *P. falciparum*, *P. cynomolgi bastianellii* et *P. gallinaceum*

Sérum N°	Type d'infection	Inverses des titres d'anticorps fluorescents avec les antigènes		
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. cynomolgi bastianellii</i>	<i>P. gallinaceum</i>
1	<i>P. ovale</i> (en cours d'accès)	32	80	20
2	<i>P. vivax</i> (primo-invasion)	NP <sup>a</sup>	320	0
3	<i>P. vivax</i> (rechute)	NP	2560	2560
4	<i>P. vivax</i> (rechute)	NP	1280	640
5	<i>P. vivax</i> (rechute)	NP	640	640
6	<i>P. vivax</i> (rechute)	256	640	160
7	<i>P. vivax</i> (1 semaine après traitement par la chloroquine)	256	1280	320
8	<i>P. vivax</i> (anciennement traité par la chloroquine)	64	80	20
9	<i>P. falciparum</i> (pool de sérums positifs)	4096	320	160
10	<i>P. falciparum</i> (en cours d'accès)	1024	160	40
11	<i>P. falciparum</i> (1 semaine après traitement par la chloroquine)	1024	40	20
12	<i>P. falciparum</i> post-transfusionnel (1 an après traitement par la chloroquine)	1024	20	20
13	<i>P. falciparum</i> (6 mois après traitement par la chloroquine)	256	40	40
14	<i>P. malariae</i> (rechute) <sup>b</sup>	64	320	20

<sup>a</sup> NP = test non pratiqué.

<sup>b</sup> Sérum positif à 1/2560 face à l'antigène *P. malariae*.

*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 5).

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<sup>os</sup> 9 et 13, *P. malariae* pour le sérum N<sup>o</sup> 14), ou qu'un antigène très proche de l'antigène spécifique (*P. cynomolgi bastianellii* pour les sérums anti-*P. vivax* N<sup>os</sup> 2, 6, 7 et 8).

Contrairement à Kielmann et al. (1970a), nous n'avons pas observé de titres 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 N<sup>os</sup> 3, 4 et 5).

Cependant, un des sérums étudiés a été trouvé négatif avec ce même antigène, 7 autres sérums n'étant que faiblement positifs (1/20 ou 1/40) ce qui correspond sensiblement à la limite de la spécificité du test.

#### 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 de ses collaborateurs. 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 peut présenter leur préparation, 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 al.<sup>1</sup> et peut-être par la possibilité de conserver ces antigènes sous forme lyophilisée (Ambroise-Thomas et al., 1972).

<sup>1</sup> Sulzer, A. J., Turner, A. & Wilson, M. (1971). *A preliminary report on the preparation and trial of multi-species antigen on human malarials for use in the indirect fluorescent antibody test*. Document non publié WHO/MAL/71.749.

## 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 Institut Pasteur de Paris de *P. gallinaceum*; le Dr Alister Voller, de Londres, à l'amitié duquel nous devons les antigènes *P. falciparum* et *P. malariae* utilisés pour les tests réalisés en France; le Dr A. Kielmann et le Dr 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.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambroise-Thomas, P. (1969) *Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence* (Thèse Doctorat ès sciences, Lyon)
- Ambroise-Thomas, P., Duprat, J., Goullier, A. & Kien Truong, T. (1972) *Bull. Org. mond. Santé*, **46**, 558
- Ambroise-Thomas, P., Kien Truong, T., Saliou, P. & Mojon, M. (1969) *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, **2**, 275
- Ingram, R. L., Otken, L. B. & Jamper, J. R. (1961) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **106**, 52
- Kielmann, A., Sarasin, G., Bernhard, A. & Weiss, N. (1970a) *Bull. Org. mond. Santé*, **43**, 617
- Kielmann, A. & Weiss, N. (1968a) *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **62**, 458
- Kielmann, A. & Weiss, N. (1968b) *Acta tropica*, **25**, 185
- Kielmann, A., Weiss, N. & Sarasin, G. (1970b) *Bull. Org. mond. Santé*, **43**, 612
- Lippincott, S. W. et al. (1945) *J. clin. Invest.*, **24**, 362
- Sulzer, A. J. & Wilson, M. (1967) *J. Parasit.*, **53**, 1110
- Todorovic, R., Ferris, D. & Ristic, M. (1967) *Ann. trop. Med. Parasit.*, **61**, 117
- Voller, A. (1962) *Bull. Org. mond. Santé*, **27**, 283