

**ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DU MALI**

Année 1983

N. 1

**LA REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE APPLIQUEE
A L'EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME**

**(AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE DEUX METHODES DE PRELEVEMENT
DE SANG SUR LE TERRAIN : PRELEVEMENT VEINEUX EN TUBE OU SUR PAPIER ABSORBANT)**

THESE :

**Présentée et soutenue publiquement le 10 Février 1984 devant l'Ecole Nationale
de Medecine et de Pharmacie du Mali**

Par : Mamourou DIAKITE

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLOME D'ETAT)

EXAMINATEURS

PRESIDENT : Professeur Michel QUILICI

Professeur Ag. Philippe

RANQUE

MEMBRES :

Docteur LE DU

Docteur Hama CISSE

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET PHARMACIE DU MALI

ANNEE ACADEMIQUE 1982/83

Directeur Général	:	Professeur Aliou	BA
Directeur Général Adjoint	:	Professeur Bocar	SALL
Secrétaire Général	:	Monsieur Sory	COULIBALY
Econome	:	Philippe	SAYE
Conseiller Technique	:	Professeur Agr. Philippe	RANGUE

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur	Sadio	SILLA	:	Anatomie
"	Francis	MIRANDA	:	Biochimie
"	Michel	QUILICI	:	Immunologie
"	Humbert	GIONO-BARBER	:	Pharmacodynamie
"	Jacques	JOSSELIN	:	Biochimie
"	Jean-Paul	MARTINEAUD	:	Physiologie
"	Michel	POUSSET	:	Matière médicale
"	Jacques	MAGNAN	:	Oto - rhino laryngologie
Docteur	Bernard	LANDRIEU	:	Biochimie
"	Gérard	TOURAME	:	Psychiâtrie
"	Jean	DELMONT	:	Santé publique
"	Boubacar	CISSE	:	Toxicologie-hydrologie
Madame	Paula	GIONO-BARBER	:	Anatomie-physiologie humaines
"	Thérèse	FARES	:	Anatomie-physiologie humaines

*

*

*

*

PROFESSEURS TITULAIRES RESIDANT A BAMAKO

Professeur	Aliou	BA	: Ophtalmologie
"	Bocar	SALL	: Anatomie-orthopédie-traumatologie
"	Mamadou	DEMBELE	: Chirurgie générale
"	Mohamed	TOURE	: Pédiatrie
"	Souleymane	SANGARE	: Pneumo-Phtisiologie
"	Mamadou	KOUMARE	: Pharmacologie-Matière médicale
"	Mamadou Lamine	TRAORE	: Obstétrique-Médecine légale
"	Aly	GUINDO	: Gastro-Entérologie
"	Abdoulaye	AG - RHALY	: Médecine Interne
"	Sidi Yaya	SIMAGA	: Santé publique
"	Siné	BAYO	: Histologie-Embryologie-Anatomie-pat.
"	Abdel Karim	KOUMARE	: Anatomie-chirurgie générale
"	Bréhima	KOUMARE	: Bactériologie
"	Mamadou Koreïssi	TOURE	: Cardiologie
"	Philippe	RANGUE	: Parasitologie
"	Bernard	DUFLO	: Pathologie médicale-Thérapeut. Héma.
"	Robert	COLOMAR	: Gynécologie-Obstétrique
"	Oumar	COULIBALY	: Chimie organique
"	Adama	SISSOKO	: Zoologie
"	Bouba	DIARRA	: Microbiologie
"	Salikou	SANOGO	: Physique
"	Niamanto	DIARRA	: Mathématiques

*

*

*

ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur	Abderhamane Sidèye	MAÏGA	:	Parasitologie
"	Sory	KEÏTA	:	Microbiologie
"	Yaya	FOFANA	:	Hématologie
"	Sory Ibrahima	KABA	:	Santé publique
"	Moctar	DIOP	:	Sémiologie chirurgicale
"	Balla	COULIBALY	:	Pédiatrie-Médecine du travail
"	Bénitiéni	FOFANA	:	Obstétrique
"	Boubacar	CISSE	:	Dermatologie
"	Souleymane	DIA	:	Pharmacie chimique
"	Yacouba	COULIBALY	:	Stomatologie
"	Sanoussi	KONATE	:	Santé publique
"	Issa	TRAORE	:	Radiologie-Physique
"	Mme SY Assitan	SOW	:	Gynécologie
"	Kalilou	OUATTARA	:	Urologie
"	Mahamane K.	MAÏGA	:	Néphrologie

CHARGES DE COURS

Docteur	Gérard	GAUCHOT	:	Microbiologie
"	Gérard	TRUSCHEL	:	Anatomie-Sémiologie chirurgicale
"	Boukassoum	HAIDARA	:	Galénique-Diététique
"	Philippe	JONCHERE S	:	Urologie
"	Hamadi Mody	DIALLO	:	Galénique-Chimie analytique
"	Aliou	KEÏTA	:	Galénique
"	Saïbou	MAÏGA	:	Galénique
Monsieur	Cheick Tidiani	TANDIA	:	Hygiène du milieu
Docteur	Abdoulaye	DIALLO	:	Gestion-Législation
Professeur	N'Golo	DIARRA	:	Botanique-Cryptogamie-Biologie-Vég.
"	Souleymane	TRAORE	:	Physiologie générale

*

*

*

JE DEDIE CE TRAVAIL

A mon père

Grâce à vos conseils quotidiens j'ai pu achever ce travail. Veuillez accepter ici toute reconnaissance.

A ma mère

Tu m'as toujours aimé avec tendresse. Tu n'as ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail. A côté de toi, j'ai toujours eu la joie de vivre. Accepte, chère mère toute mon affection.

A Baba- Sidy TRAORE et famille à N'Tomi-korobougou.

Veuillez accepter mes remerciements les plus distingués pour les efforts louables que vous m'avez jamais cessé de me faire.

A mes frères et soeurs

Je souhaite à vous tous une bonne chance dans cette vie. Ce travail est également le votre.

A ma femme Fatoumata DIAWARA

Femme de dialogue, tu as toujours suivi mes conseils. Je t'en remercie infiniment. Que l'amour qui nous lie fleurisse toujours.

.../...

A mon fils

Tu es venu à un moment où le monde semble être bouleversé par les caprices de la nature. Je te souhaite courage et bonne chance afin de me surpasser.

A Sékou DIAKITE

Accepte à travers ce travail toute ma reconnaissance.

A Bakary MARIKI

Mes remerciements les plus distingués.

A Mamadou TRAORE dit " Kibli "

Tu as été pour moi un soutien matériel et financier. Ce travail est le tien. Accepte toute ma reconnaissance.

A ma tante Dégnouma DIAKITE

Toute ma reconnaissance

A mes amis du Lycée

Abdoulaye TRAORE , Sibiri COULIBALY, Ousseyni TOGO, Nana TRAORE, Abdoulaye TOURE.

En souvenir des moments passés ensemble.

.../...

A mes collègues de promotion

Badjigui TRAORE

Daouda M. TOURE

Déidia Nahamane BABY

Mamadou B. TRAORE

Abdrahamane S. DEMEULE

Binta KOUATE

Je leur souhaite bonne chance dans l'exercice
de la pharmacie.

A Mme KAMANO Fatoumata CAMARA

Mes sincères remerciements pour cette dacty-
lographie.

A Bakary KAREMBE et famille

Mes remerciements les plus distingués pour leur
esprit de solidarité.

A mes amis d'enfance

Ibrahima TRAORE

Birama TANGARA

Tiémoko BALLO

Lassana N'DIAYE

Sinaly TRAORE

A mes amis du Point-G

Modibo FOPANA

Bourama FOPANA

Chiaka DEMBELE

Souleymane DIARRA

Adama BAGAYOKO

Yacouba COULIBALY

Mes remerciements les plus sincères pour m'avoir rendu
le séjour agréable.

A mes amis

Siompéré KONE

Sidy SANGARE

Toute mon affection

A Fatoumata BERTHE

mes remerciements les plus sincères pour tout ce
qu'elle a fait pour moi.

Au Professeur Aliou BA. Directeur Général de l'École Nationale de Médecine et de Pharmacie.
Nous savons quel intérêt vous attachez à la formation des étudiants de cette école.
Vous vous êtes toujours battu pour la cause de vos élèves. Acceptez dans ce travail toute notre gratitude.

Au Docteur MAIGA.

Votre conduite m'a impressionné à bien d'égards. Vos qualités humaines me révèlent bien de chose. Mes très sincères remerciements.

A Moussa GUINDO. Votre dévouement n'a cessé de me donner des réflexions. Mes très sincères remerciements.

A Madame Binta SYLLA dite Matoukouné à Barouéli.

Mes sincères remerciements pour tous les services rendus pendant mon séjour sous votre surveillance.

A Bourama BARRY et Famille Markala. Mes remerciements.

Au Docteur Georges SOULA

Vous m'avez impressionné par vos qualités tant humaines que scientifiques. Vous avez toujours rendu le séjour agréable lors des enquêtes de masse par votre comportement. Mes sincères remerciements.

Au Docteur Ousmane TRAORE.

Toute ma reconnaissance.

A tout le personnel du Laboratoire d'Epidémiologie des Affections Parasitaires de l'École Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali.

Mes remerciements.

A tous les enseignants de cet établissement.

Mes remerciements pour les connaissances
qu'ils m'ont permis d'acquérir.

A tous les étudiants de l'Ecole Nationale de Médecine
et de Pharmacie du Mali.

Je souhaite courage et succès.

A notre Président du Jury : Le Professeur Agrégé

Michel QUILICI. Professeur de Parasitologie
à la Faculté de Médecine de Marseille

En ce jour mémorable, nous nous faisons le
plein devoir de vous adresser Monsieur le
Président, nos très sincères remerciements
pour avoir accepté, nonobstant vos multiples
occupations la présidence de ce jury de thèse.
En vous souhaitant bon retour parmi les ^{vôtres} ~~siens~~,
nous vous prions d'accepter monsieur le Prési-
dent l'expression de notre très haute consi-
dération.

A notre Directeur de thèse

Le Professeur Agrégé Philippe RANQUE.

Ce travail ainsi achevé est le votre. Vous
m'avez toujours attiré par votre accueil
chaleureux. Votre courage, votre dévouement,
votre ardeur dans le travail font de vous
un homme **exemplaire**. Vos qualités tant humaines
que scientifiques, votre expérience de terrain
font de vous cet homme que j'ai toujours sou-
haité avoir comme guide. Veuillez accepter
Monsieur le Professeur l'expression de mes
sentiments les plus distingués.

Au Docteur LE D^U. Malarialogiste, expert de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Vous m'avez assisté tout au long de ce travail. Douze mois durant, j'ai découvert en vous : simplicité, patience, dévouement et persévérance. Vous n'avez ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail témoignant votre entière disponibilité sans cesse renouvelée, vos bons conseils, l'amour que vous avez pour vos élèves. Soyez ici rassuré Monsieur que les connaissances que je viens de bénéficier auprès de votre éminente personnalité constitueront j'en suis sûr un trésor inestimable dont je garderai toujours la valeur à l'esprit. Je vous prie d'accepter monsieur l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

Au Docteur Hama CISSE. Pharmacien-Chef de l'Hôpital du Point-"G"

Ce jour me donne l'heureuse occasion de vous adresser un vibrant hommage pour votre esprit de créativité. Vous avez accepté volontiers de siéger dans ce jury malgré nos multiples occupations. Acceptez ici toute notre gratitude.

S O M M A I R E

	Page
INTRODUCTION	1
1. TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE	
APPLIQUEES AU PALUDISME.....	3
1.1. Réaction antigène-anticorps....	3
1.2. Principe de la réaction d'immuno- fluorescence.....	3
1.3. Différentes modalités d'application	4
1.4. Réactions d'immunofluorescence, appliquées au paludisme	6
2. TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	8
2.1. Conditions de réalisation et objectif du test	8
2.2. Réalisation du test	9
3. TRAVAUX PERSONNELS.....	15
3.1. Prélèvement des sérums.....	15
3.2. Prélèvement sur papier absorbant.	16
3.3. Préparation des solutions pour le test IFI.....	17
3.4. Expérience proprement dite : traitement simultané des sérums et éluats par le test IFI.....	18
3.5. Résultats.....	20
4. DISCUSSION.....	33
4.1. Résultats.....	33
4.2. Avantages et inconvénients des sérums et éluats.....	34
4.3. Application pratique des deux techniques.....	35
CONCLUSION	36
BIBLIOGRAPHIE	

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

Dépuis sa découverte jusqu'à nos jours le paludisme reste la maladie la plus importante, mondialement reconnue tant par ses ravages directs sur les êtres humains que les conséquences socio-économiques qui s'en suivent.

Au lendemain de la découverte du parasite du paludisme par LAVEYERAN tous les chercheurs du monde ont contribué à l'amélioration des techniques de diagnostic de cette maladie afin de mieux lutter contre elle et de la prévenir.

Il s'est écoulé plusieurs décades depuis la première coloration du parasite en 1886 par GOLGI, MARCHIAFAVA et CELLI, l'introduction de la technique de la goutte épaisse par ROSS en 1903 pour le dépistage rapide des Plasmodium du paludisme, jusqu'à leur première visualisation par la technique d'immunofluorescence.

L'application des méthodes serologiques à l'étude épidémiologique du paludisme a grandement influencé les récents travaux des chercheurs en paludologie.

Au Mali le paludisme est un problème de santé publique de première importance. Il représente la première cause de mortalité infantile, est responsable d'accidents obstétricaux chez la femme enceinte et constitue l'une des causes primordiales d'absentéisme parmi la population active.

A travers le pays, de nombreuses enquêtes paludométriques ont été menées, mais en général, elles ont été réalisées suivant les techniques courantes : préparation de gouttes épaisses et splénométrie.

Dans un proche avenir, quand les moyens de lutte contre le paludisme auront été réalisés sur une grande échelle, la technique d'immunofluorescence indirecte constituera un instrument précieux pour contrôler l'efficacité des campagnes.

En notre laboratoire d'épidémiologie des affections parasitaires de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie, nous avons déjà mis au point la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) pour le diagnostic du paludisme. Cette technique a été déjà appliquée au cours des grandes enquêtes entreprises par l'Ecole dans plusieurs régions du pays.

Cependant, le problème qui se pose est la technique de la collecte des échantillons sur le terrain et leur acheminement vers le laboratoire le plus proche. Pour que le test IFI puisse être réalisé dans de bonnes conditions, ces échantillons devraient être conformes à un certain nombre de critères, pendant le prélèvement et le transport au laboratoire pour traitement.

Les enquêtes menées par l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie (E.N.M.P.) se déroulent jusqu'ici dans des villages éloignés de notre laboratoire. De ce fait les échantillons de sang prélevés sur la population villageoise ne peuvent être acheminés rapidement.

C'est dans cette éventualité que nous essayons de voir les avantages et les inconvénients qui existent dans l'utilisation des sérums de malades conservés et transportés au laboratoire à travers une chaîne de froid, ou des prélèvements de sang sur du papier absorbant qui sont plus économiques, d'un maniement plus facile et dont le transport n'exige pas de réfrigération.

Ceci constitue en bref l'étude que nous essayons de présenter par la suite.

APPLIQUÉS AU PATRIOTISME
TECHNIQUES D'INNOVATION

PREMIÈRE PARTIE

1. TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE APPLIQUEES AU PALUDISME.

1.1. Réaction antigène-anticorps

Les anticorps sont le plus souvent des protéines sériques, les immunoglobulines encore appelées anticorps humoraux. Ils sont élaborés quelques jours après la pénétration de l'antigène et vont se lier à celui-ci au niveau des sites spécifiques qui jouent d'ailleurs un rôle important dans l'apparition de ces anticorps.

Un antigène est une substance qui, après pénétration chez un être vivant, amène ce dernier à former des immunoglobulines ou anticorps capables de réagir avec l'antigène d'une façon spécifique.

D'une manière générale, une réaction immunologique consiste en une fixation des anticorps sur les antigènes correspondants qui deviennent visibles si les anticorps sont liés à une substance fluorescente appelée fluorochrome.

1.2. Principe de la réaction d'immunofluorescence

Il consiste à mettre en contact un antigène figuré et un sérum marqué par un fluorochrome.

Si le sérum contient des anticorps spécifiques de l'antigène considéré, le complexe antigène-anticorps formé persistera après lavage et sera fluorescent en lumière ultraviolette.

Si, par contre, les anticorps ne sont pas spécifiques de l'antigène, aucune liaison ne se produit. Ces anticorps seront éliminés par lavage.

Ainsi à l'examen microscopique en lumière ultra-violette la préparation apparaît sombre due à l'absence de la fluorescence.

1.3. Différentes modalités d'application

Les principales en sont celles

- de la réaction d'immunofluorescence directe
- de la réaction d'immunofluorescence indirecte
- de la réaction d'inhibition ou de blocage.

1.3.1. Méthode directe

Elle consiste à utiliser des immun-sérums spécifiques connus marqués par un fluorochrome et permet la recherche et l'identification sélective de micro-organismes ou antigènes. Ainsi l'immun-sérum spécifique de l'antigène à étudier doit être préalablement conjugué au fluorochrome. Cette technique utilisée en bactériologie ne trouve pas d'applications pratiques au diagnostic du paludisme.

1.3.2. Méthode indirecte

Elle est utilisée en notre laboratoire depuis 2 ans. Dans la réaction d'immunofluorescence indirecte positive, il y a une liaison entre les anticorps du sujet à tester et l'antigène. Cette liaison est mise en évidence dans un second temps par l'action d'un conjugué fluorescent anti-immunoglobulines humaines qui se fixera sur le sérum du sujet.

Les anticorps contenus dans tous les sérums d'une espèce animale donnée peuvent être ainsi détectés par le même conjugué fluorescent anti-immunoglobulines. Dans ce cas le sérum joue le rôle d'antigène sur lequel copule le conjugué anti-immunoglobulines fluorescent.

.../...

La réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI) bénéficie d'une sensibilité 4 à 12 fois supérieure à celle de la technique d'immunofluorescence directe (IFD) (FRISMAN et col (1953) (46)

La réaction indirecte comporte deux phases :

- dans un premier temps le sérum à tester est mis en incubation avec un antigène préalablement fixé sur une lame.
- dans un second temps la préparation subit l'action d'un conjugué fluorescent anti-immunoglobulines lors d'une incubation de 30 minutes à 37°C.

Les lames subissent deux lavages successifs de 5 minutes chacun, après chaque temps d'incubation.

Après on procède à la lecture des lames au microscope en lumière ultra-violette.

Si les anticorps contenus dans le sérum testé sont spécifiques de l'antigène, le complexe antigène- anticorps formé persistera après la première série de lavages.

A son tour, le conjugué fluorescent anti-immunoglobulines va se fixer au niveau des immunoglobulines du sérum qui sont restées liées à l'antigène. Après la deuxième série de lavages le complexe antigène-anticorps devenu fluorescent persistera. Il apparaîtra une fluorescence brillante de couleur typiquement jauné-vert sur un fond sombre lorsque la préparation sera examinée au microscope en lumière ultra-violette. La réaction est alors dite positive.

Contrairement au cas précédent, il ne se produit aucune liaison si les anticorps du sérum testé ne sont pas spécifiques de l'antigène. Dans cette éventualité les anticorps vont disparaître de la surface de la préparation au cours de la première série de lavages.

Lors de la seconde phase de la réaction, le conjugué fluorescent anti-immunoglobulines ne trouvera pas d'immunoglobulines auxquelles se lier.

Il sera aussi éliminé au cours de la deuxième série de lavages. Ainsi sur la préparation il ne persistera qu'un antigène d'aspect sombre en lumière ultra-violette. La réaction est alors dite négative.

1.3.3. Méthode d'inhibition ou de blocage

En 1950 COONS et HARLAN (12) ont constaté que les réactions spécifiques antigène-anticorps pouvaient être bloquées par l'action préalable d'une solution d'anticorps spécifiques de l'antigène. Les anticorps d'un sérum spécifique conjugué ne trouveront aucun site antigénique libre pour se fixer. Lorsque le test est positif, la coloration fluorescente n'est pas totalement absente, mais son intensité est très faible. Quand le test est négatif une vive fluorescence s'observe. Cette dernière méthode n'est pas employée couramment.

1.4. Réactions d'immunofluorescence appliquées au paludisme

Toutes les techniques immunologiques peuvent être appliquées au paludisme, mais c'est la technique d'immunofluorescence indirecte qui demeure de loin la plus utilisée. Cette méthode a en effet l'important avantage de n'exiger pour la préparation des antigènes qu'une infime quantité de sang parasité. Par ailleurs, ces antigènes constitués par les Plasmodium eux-mêmes possèdent des caractéristiques évidemment constantes. Ceci assure à la méthode une bonne reproductibilité.

Un très grand nombre d'études sérologiques dans le cadre de l'épidémiologie du paludisme a été réalisé par la méthode d'immunofluorescence indirecte au Nigéria, en Gambie, au Sénégal, au Libéria, en Tanzanie en Ethiopie, et Tunisie et aussi en France. COLLINS et al (1967) (10) HARVERSON et al (1963).

.../...

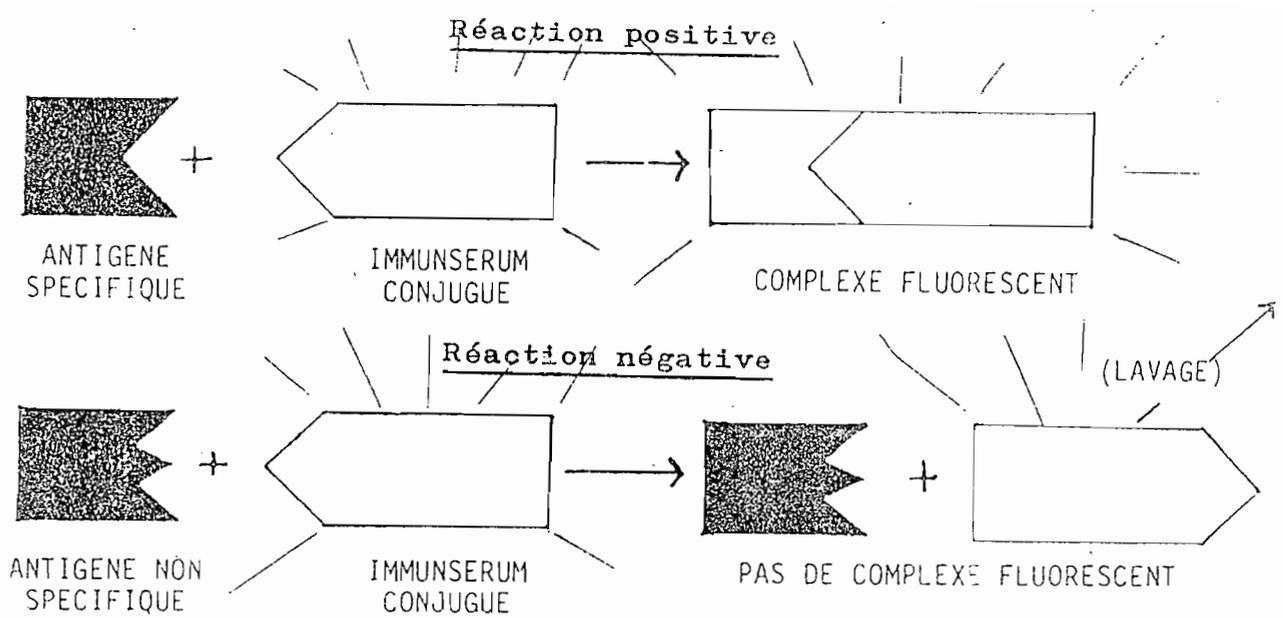


Fig.1 - Principe de la méthode directe d'Immunofluorescence

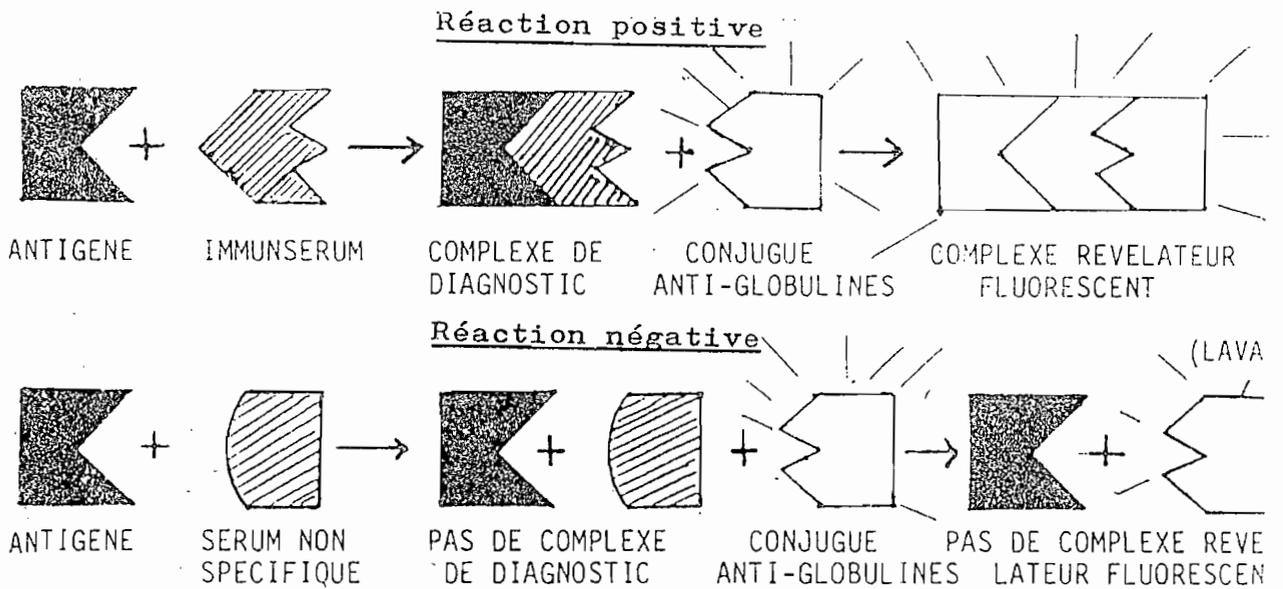
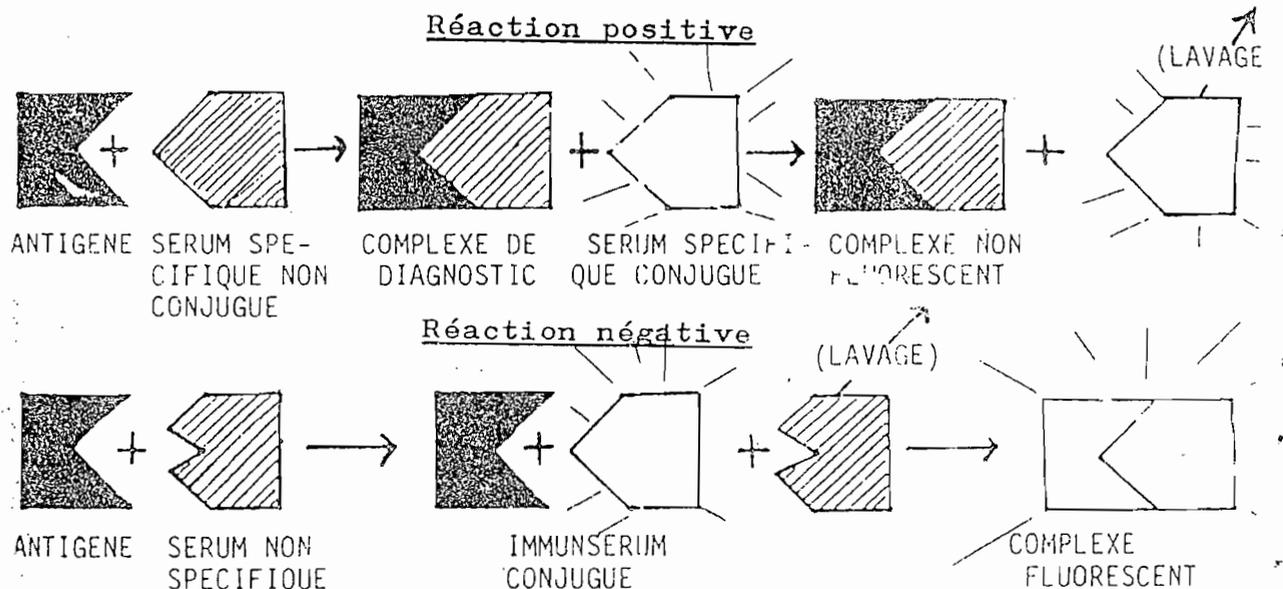


Fig.2 - Principe de la méthode indirecte d'Immunofluorescence



Principe de la méthode d'inhibition d'Immunofluorescence

(21); LELIJVELD (1971) (32) ; ORIENO et al (1971) (44); VOLLER et al (1962) (59) ; AMERCISE-THOMAS et col ; MC-GREGOR et al (1965) (36).

Cette méthode conserve encore toute son importance.

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

2. TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

2.1. Conditions de réalisation et objectif du test

Au laboratoire d'épidémiologie des maladies parasitaires de l'École Nationale de Médecine et de Pharmacie (E.N.M.P.) on a adopté la technique d'immunofluorescence indirecte car plusieurs conditions sont propices à sa réalisation.

Pour un début, on s'est limité à la réalisation du test en utilisant exclusivement des préparations antigéniques provenant de Plasmodium falciparum humain. En effet ce parasite occupe une place prédominante dans l'endémie palustre sévissant au Mali. En période de transmission du paludisme les cas d'infestation sont considérables. On peut donc prélever du sang sur des individus hautement infestés par ce parasite pour la préparation des antigènes.

Pour le moment on n'envisage pas l'utilisation de test IFI pour la détection des infestations à Plasmodium malariae, à Plasmodium vivax et Plasmodium ovale pour lesquels il faut recourir à l'utilisation de Plasmodium simiens : P. brasilianum, P. cynomolgi bastianelli et P. fieldi respectivement.

Sur le plan épidémiologique, sauf de rares cas de paludisme importé, P. vivax est absent de l'Afrique Occidentale, P. malariae est de moindre importance, et P. ovale a une représentation négligeable.

Le test nécessite un matériel simple et peu coûteux à l'exception du microscope à fluorescence. Certains produits doivent être importés, mais leur consommation étant minime ne nécessitent pas un renouvellement fréquent du stock.

.../...

† 2.2. Réalisation du test

2.2.1. Lames pour utilisation en microtechnique

On a adopté la microtechnique semi-automatisée. Les lames destinées à recevoir l'antigène sont des lames ordinaires que nous recouvrons d'une mince couche de téflon. Elles comportent 16 plots disposés en 2 rangées de 8 aux endroits non recouverts par ce produit.

2.2.2. Préparation des antigènes

2.2.2.1. Avantages de l'utilisation des antigènes humains homologues

La réaction d'immunofluorescence ne nécessite qu'une faible quantité d'antigènes figurés constitués par les parasites eux-mêmes. Les Plasmodium contenus à l'intérieur des globules rouges parasités représentent un matériel antigénique qui ne nécessite ni extraction ni purification. La réalisation des préparations antigéniques n'exige que l'étalement d'un très faible volume de sang suffisamment parasité sur des lames de microscope en téflon décrites ci-dessus.

L'antigène P. falciparum se révèle plus efficace pour détecter les anticorps de sujets vivant dans un pays où domine l'infestation par cette espèce plasmodiale.

Les antigènes simiens se révèlent presque aussi efficaces que P. falciparum pour la détection des anticorps.

Plasmodium fiëldi obtenu après infection du singe rhésus splénectomisé Macacca-mulata, semblait être un antigène valable pour l'étude des antisérums P. falciparum et P. vivax alors que la parenté de P. brasealianum avec P. malariae laisse supposer que cette dernière espèce avait une antigénicité plus proche des Plasmodium humains.

.../...

MEUWISSEN (1968) (37) avait déjà mis en évidence la valeur de P. fieldi spécialement pour détecter les anticorps causés par un paludisme à P. ovale

Les Plasmodium des rongeurs (P. berghei) ou des oiseaux (P. gallinaceum) sont d'obtention plus facile; mais ces antigènes hétérologues, s'ils peuvent permettre des résultats sérologiques positifs face à des sérums humains, ne donnent, en raison de leur assez faible similitude avec les Plasmodium de l'homme, que des résultats quantitativement difficiles à interpréter. (AMEROLISE-THOMAS et col (1972) (3). Donc de tels antigènes sont à proscrire pour une étude sérologique précise.

Le chimpanzé (Pan satrymus ou Pan troglodytes) splénectomisé s'est révélé très tôt l'hôte satisfaisant qui pourrait entretenir tous les Plasmodium de l'homme BRAY (1958) (6), RHODAIN et JARDIN (1964) (50); mais cet animal est difficile à se procurer et le coût de son élevage est excessif. Son utilisation comme source d'antigènes pour la réaction d'IFI se limite actuellement à quelques instituts de recherche.

Actuellement avec les recherches sur le futur vaccin antimalarique l'inoculation du singe reprend son importance; l'espèce la plus employée est le Saimiri (11).

⊗ En 1962 KUVIN et col (29) d'une part, VOLLER et BRAY (59) d'autre part, utilisent le sang pour la réalisation directe des frottis sanguins qui après conservation sont fixés une minute dans l'acétone avant leur emploi. Sachant que les complexes antigènes-anticorps peuvent être dissociés à pH acide, KABAT et MAYER (1961) (24); KUVIN et col (1962) (29) traitent les frottis lors de leur emploi avec l'acide chlorhydrique à 0,5-1 pour cent avant les actions successives de l'eau, de l'acétone et d'une solution tampon.

.../...

Ce procédé permet la déshémoglobination des frottis en même temps que la dissociation des complexes antigène-anticorps SULZER et WILSON (1967) (55) montrent que le lavage immédiat du sang dès le prélèvement débarrasse les hématies de tout anticorps.

2.2.2.2. Dépistage des porteurs de P.falciparum

Vers la fin de la saison de transmission, on a pu facilement obtenir au niveau des centres de P.M.I. et dans le service de Pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE à Bamako même, un bon nombre d'échantillons de sang d'enfants de moins de deux ans atteints d'accès pernicleux. Chez les enfants la quantité de sang prélevée n'excède jamais 5 millilitres. Chez certains individus âgés ayant une forte parasitémie nous soumettons le sang prélevé à de nombreux lavages ce qui permet quand même d'obtenir des antigènes très valables.

De préférence nous choisissons les échantillons de sang ayant approximativement 3.000 parasites par millimètre cube.

2.2.2.3. Confection des lames d'antigènes

Le sang prélevé sur tube hépariné est immédiatement centrifugé à 3.000 tours par minute pendant 5 minutes. Le plasma est recueilli pour mesurer le taux d'anticorps fluorescents du donneur. Le culot d'hématies est repris dans du PBS. Au terme du cinquième lavage le culot est remis en suspension dans du PBS en quantité adéquate pour obtenir une densité optimale d'éléments figurés (approximativement 10 parasites par champ microscopique) avant d'être déposé en gouttelettes sur les lames décrites précédemment à l'aide d'un applicateur à 16 tiges.

.../...

2.2.3. Les Anticorps : Les Sérums et
Les Eluats

√ 2.2.3.1. Les sérums

Au cours des enquêtes, lorsque les conditions requises sont réunies on peut prélever le sang, le centrifuger, pour obtenir le sérum surnageant. Ceci nécessite la mise en place d'une chaîne de froid permettant de transporter ces sérums du lieu de prélèvement jusqu'au laboratoire sous réfrigération.

2.2.3.2. Les éluats

Quand il s'avère impossible de conserver et transporter le sérum sous réfrigération on a dans ce cas recours à la méthode de prélèvement sur papier absorbant. ^{Cinquante} micro litres de sang sont prélevés au bout des doigts suite à une piqûre à la lancette au moyen d'un tube capillaire hépariné. Cette quantité de sang est étendue sur du papier absorbant. Les échantillons de sang une fois séchés sont remis dans un sac en plastique et transférés aussitôt que possible au laboratoire pour traitement.

√ 2.2.4. Le conjugué fluorescent

Pour nos réactions nous avons utilisé un sérum conjugué fluorescent de l'Institut Pasteur de Paris. Il s'agit de globulines fluorescentes de mouton anti-immunoglobulines humaines (code n°74511) livré en flacon compte gouttes.

Ce conjugué fluorescent est conservé à + 4°C à l'obscurité. Le conjugué est dilué dans du tampon PBS _pH 7,2. Au moment de la réaction il lui est ajouté un contre colorant, le bleu d'Evans.

Nous préparons notre conjugué fluorescent suivant les proportions ci-dessous indiquées.

.../...

Tampon PBS pH 7,2 3 millilitres
Sérum conjugué fluorescent..... 4 gouttes
Bleu d'Evans bio Mérieux dilué
à 1/5000250 microlitres

Cette quantité de conjugué fluorescent ainsi préparée est suffisante approximativement pour 25 lames d'antigènes.

2.2.5. Conduite de la réaction d'IFI

2.2.5.1. Déshémogloblinisation

Les lames d'antigènes conservées au congélateur à - 20°C sont déshémogloblinisées à l'eau distillée pendant quelques minutes. Une fois séchées elles sont prêtes à recevoir les sérums à tester.

2.2.5.2. Contact antigène-anticorps

Le sérum subit plusieurs dilutions avant d'être déposé sur les lames d'antigène. Une fois que le sérum est mis en contact avec l'antigène on laisse incuber le mélange pendant 30 minutes à 37°C en atmosphère humide.

Les lames sont ensuite lavées 2 fois au PBS pendant 5 minutes chacune.

2.2.5.3. Contact combiné antigène-anticorps avec le conjugué fluorescent

Le complexe antigène-anticorps soumis à l'action du conjugué fluorescent subit une seconde incubation de 30 minutes en atmosphère humide. Après elles sont lavées au PBS deux fois 5 minutes.

Le montage sous lamelles avec de la glycérine tamponnée pH 7,2 se fait pendant que les lames sont encore humides.

Au cours de chaque séance d'IFI nous avons eu soin de toujours inclure un témoin positif et un témoin négatif pour contrôle.

.../...

2.2.5.4. Lecture

Nous utilisons un microscope à fluorescence ZEISS Standard 14 équipé d'un épicondenseur de fluorescence IVF1 à lampe à halogène.

La lecture des préparations se fait au grossissement 400 à l'aide d'un objectif 40/0,85 à immersion ZEISS à l'aide de la glycérine tamponnée pH 7,2 et d'un oculaire CPLW 10/ 18 ZEISS.

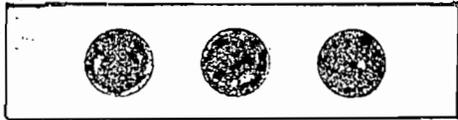
Les Plasmodium perdent rapidement une partie de leur fluorescence dès qu'ils sont soumis à la lumière ultra-violette, ce qui nécessite de ne visualiser trop longtemps le même champ.

L'existence des préparations standard témoins paraît le meilleur guide pour l'appréciation des résultats des sérums ou des éluats testés.

Nous pensons pouvoir exprimer comme positive toute préparation où les parasites sont visualisés par une fluorescence même la plus faible.

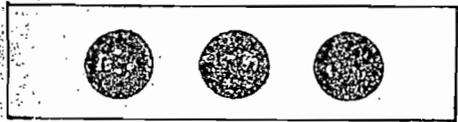
Sur les témoins négatifs le fond est uniformément gris verdâtre ou gris rougeâtre sur lequel aucun parasite n'est visualisé.

.../...



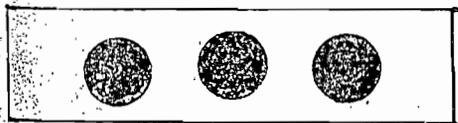
- Goutte épaisse de sang parasité dans cercles

- Déshémoglobination par eau distillée (5 mn)



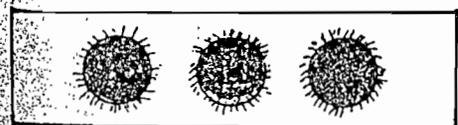
- Action des sérums (S) 30 mn

- Lavages



- Action du conjugué fluorescent (C) pendant 30 mn

- Lavages



- Montage avec glycérine sous lamelle et examen au microscope à lumière ultra-violette

- REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TECHNIQUE d'IFI APPLIQUEE AU PALUDISME

TROISIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

3. TRAVAUX PERSONNELS

L'enquête polyvalente conduite par le laboratoire d'Epidémiologie des affections parasitaires de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie s'est déroulée du 24 Avril au 12 Mai 1983 dans 12 villages du cercle de Kolokani.

Pour la recherche sur le paludisme on a fait des gouttes épaisses pour le diagnostic microscopique des hématozoaires. Des sérums et du sang sur papier absorbant ont été prélevés pour le test IFI du paludisme.

3.1. Prélèvement des sérums

La ponction veineuse se fait au pli du coude avec une aiguille stérile (Réf ED n° 05 186) de 11/10⁰ pour adultes ^{et} 9/10⁰ pour les enfants. La quantité de sang prélevée d'environ 5 millilitres est mise dans un tube contenant de l'EDTA. Le bouchon est remis sur le tube qu'on fait retourner une dizaine de fois pour empêcher la coagulation. Les tubes de sang portant le numéro d'identification des patients sont mis sur des portoirs en mousse et conservés sous réfrigération dans une glacière dans laquelle on a mis au préalable des conservateurs de froid.

Le laboratoire de campagne est situé à plusieurs kilomètres des lieux de prélèvement.

En fin de journée, les échantillons de sang sont acheminés vers le laboratoire toujours dans la glacière. Au laboratoire ils sont ensuite centrifugés à 3.000 tours minute pendant 5 minutes. Le plasma surnageant est ensuite transféré dans un autre tube sec portant le même numéro d'identification puis conservé, au congélateur à - 20°C jusqu'à son transfert final au laboratoire d'Epidémiologie des maladies parasitaires de l'E.N.M.P. .../...

pour traitement. Le prélèvement s'opère chez les individus chez qui la ponction veineuse est possible au niveau du pli de coude. C'est ainsi qu'un grand nombre de nourrissons et d'enfants en bas âge n'ont pu être prélevés de cette manière.

Dans les régions où l'électrification fait défaut, nous devons installer un générateur électrique pour faire fonctionner les centrifugeuses et les congélateurs.

3.2. Prélèvement sur papier absorbant

Les papiers de forme rectangulaire sont découpés au préalable par paquets de 100 et mis dans des sacs en plastique bien fermés pour les mettre à l'abri de la poussière.

Une piqûre à la lancette est pratiquée au niveau de la pulpe du doigt préalablement désinfectée. Chez les nourrissons, la piqûre se fait au niveau du gros orteil. On met un tube capillaire hépariné (TERUMO CAPILLARY TUBE Ref VC-HO75H) d'une capacité de 50 microlitres en contact avec la goutte de sang qui se forme au niveau de la piqûre. Ce sang est versé ensuite sur papier absorbant (Whatman n°3) en mettant en contact, l'un des bouts du tube capillaire avec la surface de ce papier, en le faisant suivre un trajet excentrique. Le sang se dépose ainsi sous forme d'une tache de diamètre d'environ 1,5 centimètre. On confectionne pour chaque individu deux taches de sang portant son numéro d'identification écrit au crayon ordinaire. On évite d'utiliser le stylo à bille car l'encre de ce dernier risque de produire des fluorescences parasites. Les préparations confectionnées sont embrochées en éventail sur une tige métallique pointue. On obtient ainsi une "brochette" qu'on laisse sécher à l'air libre.

.../...

Il faut séparer les papiers les uns des autres jusqu'à ce qu'ils soient totalement séchés. Après, on peut les empiler, les mettre dans des sacs en plastique bien fermés pour les transporter tels quels au laboratoire aux fins de traitement.

Si on conserve longtemps ces papiers avant leur traitement, on les entropose de préférence dans le frigidaire à + 4°C.

3.3. Préparation des solutions pour le test IFI

Nous travaillons suivant des dilutions variées, mais en général, pour les enquêtes de masse nous adoptons les deux dilutions $\frac{1}{40}$ et $\frac{1}{640}$.

Pour obtenir la dilution initiale de $\frac{1}{40}$ pour le sérum comme pour l'éluat nous procédons de la façon suivante:

3.3.1. Les sérums

Le sérum est mis à décongélér à la température ambiante. Les tubes sont agités ensuite pour obtenir une bonne homogénéisation. Pour le traitement de masse, nous déposons sur les plaques de microtitration (Réf PS MIKROTITER PLATTE, 96 K n°651101), dans chaque puits correspondant au sérum à tester 195 microlitres de PBS auxquels nous ajoutons au moyen d'une micropipette "Pipetman Gilson P-100" 5 microlitres de sérum, ce qui nous donne dans ce puits une dilution de $\frac{1}{40}$.

Les dilutions successives sont préparées grâce à un multidiluteur et un distributeur à 8 canaux "MICROCOMPU-PET".

Seules les dilutions de $\frac{1}{40}$ et $\frac{1}{640}$ sont prélevées pour le test d'IFI.

.../...

3.3.2. Les éluats

On découpe aux ciseaux l'une des taches de sang en fines lamelles qu'on dépose au fond d'un tube à essai portant le même numéro d'identification. On met dans ce tube 1 millilitre de PBS. Pour que l'éluat soit totale, on laisse séjourner la solution pendant 24 heures au réfrigérateur.

L'éluat ainsi obtenu est approximativement à une dilution de $\frac{1}{40}$ soit 50 microlitres de sang séché dans 1.000 microlitres de PBS.

La dilution initiale de $\frac{1}{40}$ est déposée dans la première rangée des puits de la plaque de microtitration. Les dilutions successives sont obtenues avec le "Microcompu-pet" comme précédemment avec les sérums.

Seules les dilutions de $\frac{1}{40}$ et $\frac{1}{640}$ sont traitées.

3.4. Expérience proprement dite : traitement simultané des sérums et éluats par le test IFI

L'objectif de cette expérience consiste à évaluer la sensibilité des sérums et des éluats. Au cours de l'enquête polyvalente précitée, nous avons prélevé dans deux villages, Sirababougou (n°6) et Koundogo (n°10) du cercle de Kolokani, simultanément pour chaque patient un tube de sang et une carte de papier absorbant comportant deux taches de sang séché.

Nous ne considérons que les sujets de tout âge et sexe, chez qui il a été possible de prélever d'une façon concomitante des sérums et des cartes de papier absorbant.

Au premier village (Sirababougou) on a obtenu 102 paires de sérum/éluat et au second (Koundogo) 176 paires.

.../...

3.4.1. Préparation des sérums et éluats

Au moment du traitement des échantillons au laboratoire, les sérums et les éluats préparés comme décrit précédemment, sont tirés au hasard et disposés pour l'examen suivant un ordre aléatoire. De cette façon, au moment de l'examen microscopique en lumière ultra-violette, la lecture des préparations se fait en double aveugle.

Nous utilisons dans cette expérience des dilutions croissantes d'un rapport de 4 poussées à l'extrême pour évaluer la sensibilité maximale individuellement de chaque sérum ou éluat. Les dilutions préparées au "Microcompu-pet" sont les suivantes

$\frac{1}{40}$; $\frac{1}{160}$; $\frac{1}{640}$; $\frac{1}{2560}$; $\frac{1}{10240}$; $\frac{1}{40960}$; $\frac{1}{153840}$; $\frac{1}{655360}$.

3.4.2. Les antigènes

Les lames d'antigène sont préparées bien en avance et stockées au congélateur à - 20°C suivant la technique décrite précédemment au paragraphe 2-2-3.

Sur chaque lame, nous testons deux échantillons soit sérum, soit éluat, soit les deux à la fois suivant le tirage au hasard. Sur chaque rangée de 8 plots de la lame, nous déposons les préparations aux dilutions croissantes.

3.4.3. La réaction d'IFI

La réaction d'IFI s'effectue suivant la technique décrite au paragraphe 2-2-5

3.4.3.1. La lecture des préparations

Sous le microscope à fluorescence ZEISS au grossissement 400 (objectif 40 oculaire 10), la lecture se fait en double aveugle (l'examineur ne sachant si la rangée observée correspond à

.../...

un sérum ou à un éluat) de gauche à droite. On commence avec la dilution $\frac{1}{40}$ puis individuellement chaque plot suivant sera examiné. La fluorescence de chaque plot est notée ; le dernier qui fluoresce vers la droite représente la dilution extrême capable de révéler la présence de l'anticorps palustre pour l'échantillon sérum ou éluat examiné.

Pour chaque série d'IFI nous avons eu soin de préparer comme référence un témoin positif et un témoin négatif.

Les résultats sont portés sur un plan de lecture et une fiche d'analyse aux fins d'exploitation statistique ultérieure.

3.5. Résultats

L'IFI palustre est pratiquée sur 278 paires sérum/éluat récoltées chez 278 individus de tout âge des deux villages 6 et 10.

Les résultats globaux de l'expérience sont présentés ci-après.

Explication des abréviations

Ex : Nombre d'individus examinés.

S : Sérums

E : Eluats

(-): Négatifs

(+): Positifs

T(+): Total des positifs

Les dilutions croissantes sont numérotés de 1 à 8.

.../...

$$d1 = \text{dilution } \frac{1}{40}$$

$$d5 = \text{dilution } \frac{1}{10240}$$

$$d2 = \text{dilution } \frac{1}{160}$$

$$d6 = \text{dilution } \frac{1}{40960}$$

$$d3 = \text{dilution } \frac{1}{640}$$

$$d7 = \text{dilution } \frac{1}{163840}$$

$$d4 = \text{dilution } \frac{1}{2560}$$

$$d8 = \text{dilution } \frac{1}{655360}$$

Tableau 1. Résultats globaux de l'expérience.

Age	S/E	Ex	(+) d1 : d2 : d3 : d4 : d5 : d6 : d7 : d8								T(+)	%	(-)
0-9	S	62		2	10	16	15	11	3	3	60	96.8	2
	E	62	1	5	7	14	8	7	2	5	49	79.	13
10-14	S	54		3	6	15	8	8	4	8	53	98.1	1
	E	54	1	6	8	5	10	6	4	2	42	77.8	12
15-19	S	30			5	5	5	4	5	5	30	100.	
	E	30	1	1	4	5	5	3	3	2	24	80.	6
20 +	S	132		5	4	14	25	26	20	29	131	99.2	1
	E	132	1	3	7	33	35	18	15	9	121	91.7	11
TOT	S	278		10	26	51	53	49	40	45	274	98.6	4
	E	278	4	15	26	57	58	34	24	18	236	84.9	42

3.5.1. Positivité

.../...

Tableau 2. IFI. Sérums - Éluats positifs.

S/E	S	E
(-)	4	42
(+)	274	236
%	98.6	84.9
TOT.	278	278

Sur les 278 paires S/E testées, le pourcentage de positivité chez les sérums est plus élevé (98.6 pour cent) que chez les éluats (84.9 pour cent).

La différence est hautement significative avec

$$\text{Chi carré} = 34.22$$

$$\text{pour ddl} = 1$$

p est inférieur à 0,001

Ceci nous permet de penser que dans le test IFI le sérum permet de détecter les porteurs d'anticorps palustres à un pourcentage nettement plus élevé que les éluats.

La différence est statistiquement significative.

.../...

Tableau 3. IFI Sérums-Éluats positifs selon l'âge.

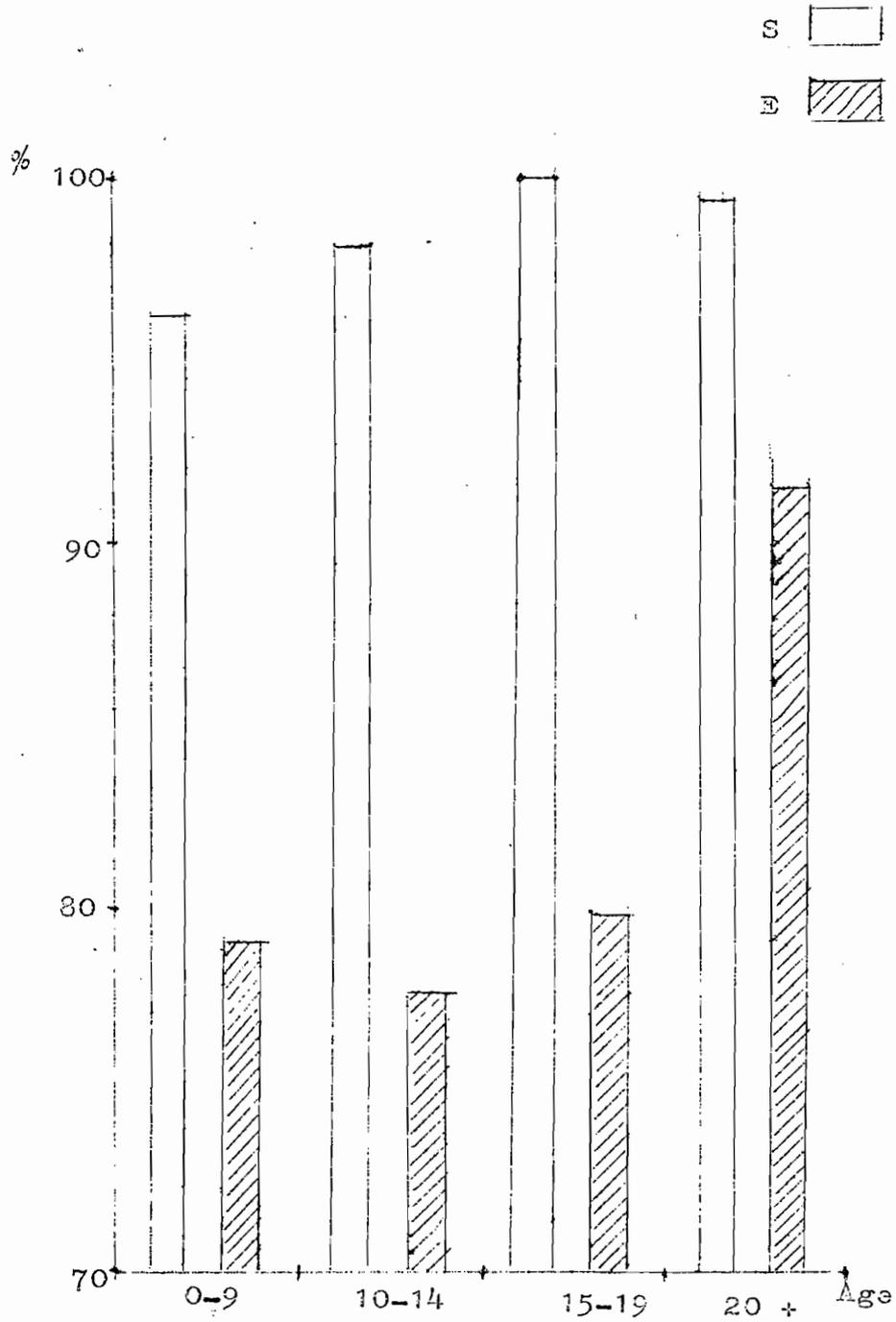
Age	S				E				Chi carré	p
	(-)	(+)	%	TOT.	(-)	(+)	%	TOT.		
0-9	2	60	96.8	62	13	49	79.	62	9.17	inférieur à 0.01
10-14	1	53	98.1	54	12	42	77.8	54	10.58	inférieur à 0.01
15-19		30	100.	30	6	24	80.	30	6.66	inférieur à 0.01
20 +	1	131	99.2	132	11	121	91.7	132	8.73	inférieur à 0.01
TOT.	4	274	98.6	278	42	236	84.9	278	34.22	à 0.001

Sur les 278 individus de tout âge examinés, nous constatons que la réponse à l'IFI est uniformément plus élevée chez les sérums que chez les éluats; au niveau de chaque tranche d'âge.

La différence est significative au sein de chaque groupe d'âge avec Chi carré variant de 6.66 minimum à 10.58 maximum pour ddl = 1, p est inférieur à 0.01.

.../..

Graphique 1. Pourcentage de positivité sérums/éluats selon l'âge.



3.5.2. Sensibilité, sérum/éluat

Tableau 4. Sérums Eluats positifs à la dilution extrême (d3)

S/E	S	E
(-)	233	260
(+)	45	18
%	16.2	6.5
TOT.	278	278

On observe qu'à la dilution extrême de $\frac{1}{655360}$ le pourcentage des positifs est nettement plus élevé parmi les sérums (16.2 pour cent) que parmi les éluats (6.5 pour cent).

La différence est significative avec

Chi carré = 13.05

pour ddl = 1

p inférieur à 0.001.

Tableau 5. Sérums et éluats positifs à la dilution extrême de $\frac{1}{655360}$ entre deux tranches d'âge de 0-19 ans et plus de 20 ans.

.../...

S/E	S				E				Chi carré	p
	(-)	(+)	%	TOT.	(-)	(+)	%	TOT.		
0-19	130	15	10.9	146	137	9	6.2	146	2.14	supérieur à 0.05
20+	103	29	22.	132	123	9	6.8	132	12.29	à 0.01 inférieur
TOT.	233	45	16.2	278	260	18	6.5	278	13.05	à 0.001 inférieur

Nous avons les observations suivantes.

a. IFI sérums pour les moins de 20 ans et les plus de 20 ans.

La réponse est nettement plus accentuée chez ceux qui ont plus de 20 ans (22. pour cent) que chez ceux qui ont moins de 20 ans (10.9 pour cent).

La différence est significative avec

Chi carré = 6.19

pour ddl = 1

p inférieur à 0.02

b. IFI éluats pour les individus de moins de 20 ans et les plus de 20 ans.

Il n'existe pas de différence entre ces deux groupes avec

Chi carré = 0.4

pour ddl = 1

p est supérieur à 0.50.

.../...

c. IFI sérums et éluats pour les moins de 20 ans.

Dans cette tranche d'âge il n'existe pas de différence significative entre les sérums (10.9 pour cent) et les éluats (6.2 pour cent) avec

Chi carré = 2.14
pour ddl = 1
p est supérieur à 0.05.

d. IFI sérums et éluats chez les plus de 20 ans.

Nous constatons que la réponse est plus accentuée avec les sérums (22. pour cent) qu'avec les éluats (6.3 pour cent).

Dans cette tranche d'âge la différence est significative avec

Chi carré = 12.29
pour ddl = 1
p est inférieur à 0.001.

Les observations précitées permettent de déduire que chez les individus âgés de plus de 20 ans, la réponse du sérum à l'IFI est significativement plus importante que chez les jeunes sujets. Il en est de même de la réponse des sérums par rapport aux éluats parmi les gens âgés.

Ceci nous fait penser au taux élevé d'anticorps palustres qu'hébergent les adultes en zone endémique.

3.5.2.1. Moyennes géométriques des titres d'anticorps

obtenues avec les sérums et les éluats.

Nous avons calculé les GMRT (Geometrical Mean Reciprocal Titre) pour comparer les résultats des IFI sérums et éluats pour chaque tranche d'âge.

.../...

Le GMRT est donné par la formule suivante.

$$GMRT = \text{antilog} \frac{\sum f \log x}{N}$$

où x représente l'inverse des différents titres d'anti-corps fluorescents.

f : le nombre de sérums ou éluats qui ont donné chacun de ces titres.

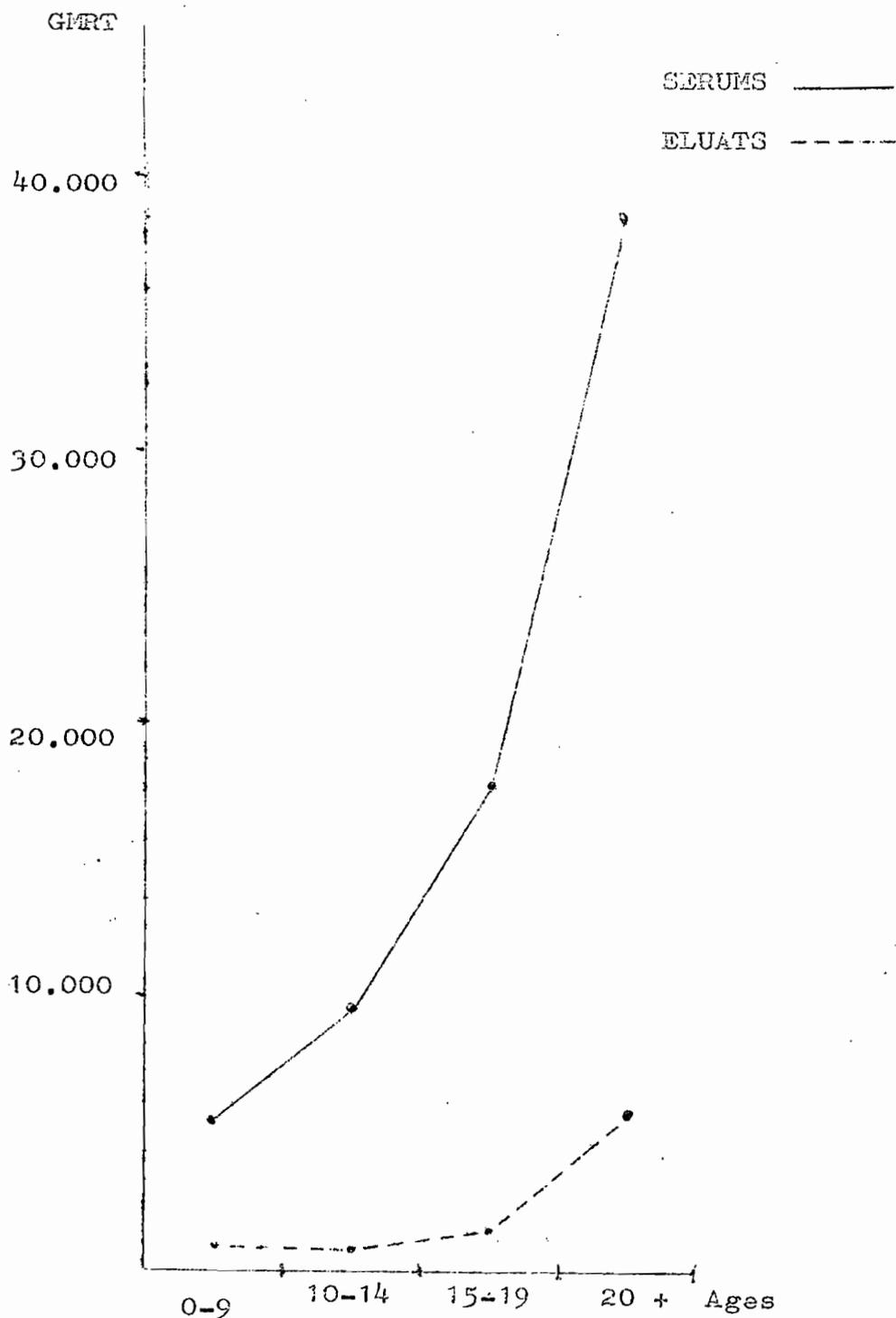
N : le nombre total des examens.

Tableau 6. GMRT S et E selon l'âge (IFI en 8 dilutions croissantes de d1 à d8)

Age	S/E	Ex	(+)								T(+)	GMRT
			d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8		
0-9	S	62		2	10	16	15	11	3	3	60	5315.
	E	62	1	5	7	14	8	7	2	5	49	923.
10-14	S	54		3	6	16	8	8	4	3	53	9319.
	E	54	1	6	8	5	10	6	4	2	42	728.
15-19	S	30			6	5	5	4	5	5	30	17828.
	E	30	1	1	4	5	5	3	3	2	24	1232.
20 +	S	132		5	4	14	25	26	28	29	131	38192.
	E	132	1	3	7	33	35	18	15	9	121	5559.
TOT.	S	278		10	26	51	53	49	40	45	274	17230.
	E	278	4	15	26	57	58	34	24	18	236	2141.

.../...

Graphique 2. GMRT S et E selon l'âge (IFI en 3 dilutions croissantes d1 à d3).



On constate que les GMRT obtenus avec les sérums sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec les éluats. La différence est de plus en plus accentuée au fur et à mesure qu'on avance en âge.

Tableau 7. GMRT S et E aux deux dilutions usuelles (d1 et d3)

S/E	DIL (+)		Ex	GMRT
	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{640}$		
S	10	264	278	527,82
E	19	218	278	204,18

Si on utilise que les deux dilutions usuelles de $\frac{1}{40}$ et $\frac{1}{640}$ tel qu'on procède habituellement dans les IFI de masse, on constate aussi que les GMRT obtenus avec les sérums restent supérieurs à ceux obtenus avec les éluats.

Tableau 8. Rapport de sensibilité entre les IFI S et E aux dilutions d1 et d3 et aux dilutions de d1 à d8.

.../...

S/E	IFI	IFI
	d1 et d3	d1.....d8
S	527	17230
E	204	2141
Rapport $\frac{S}{E}$	2.6	8.

Nous constatons :

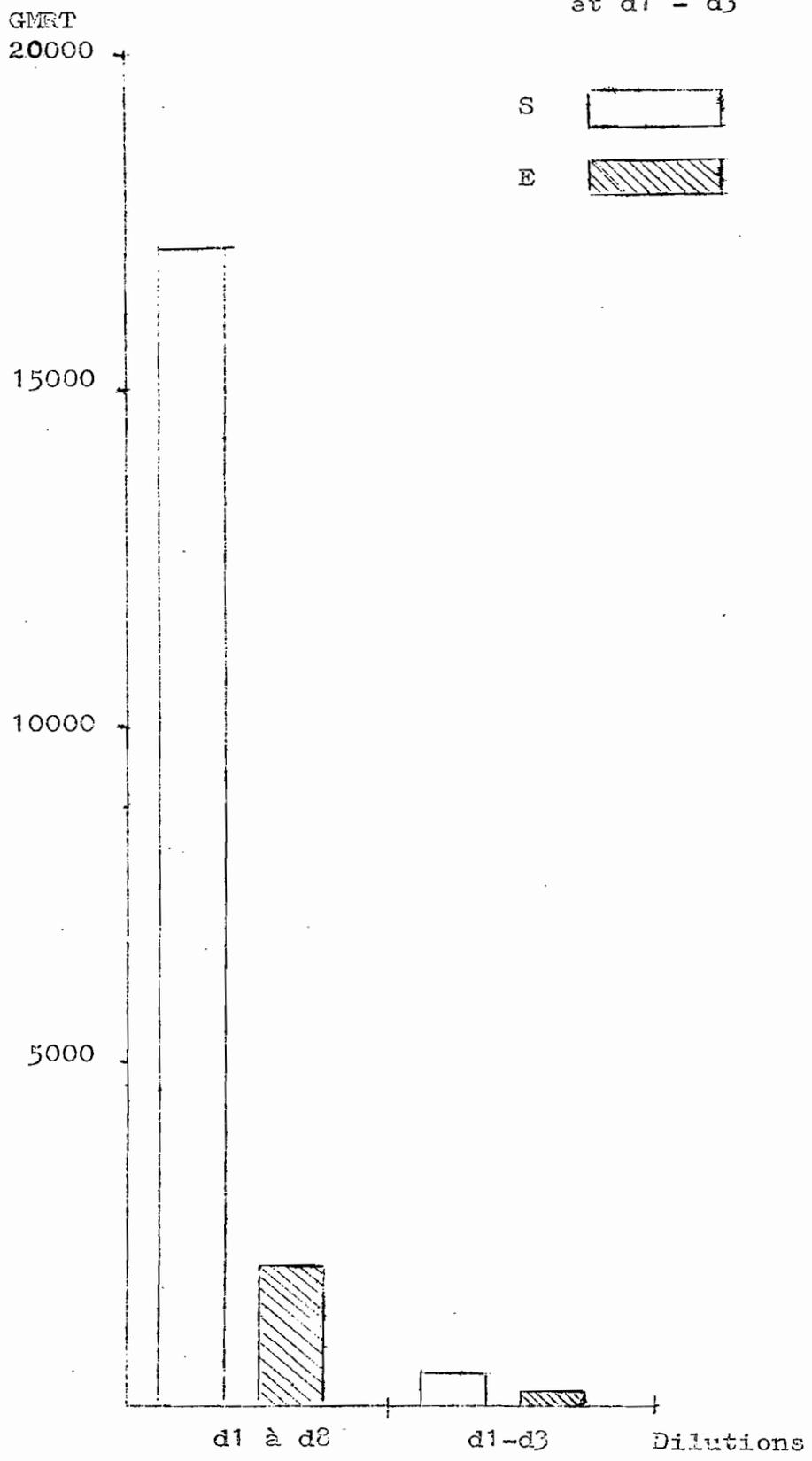
a. que pour les deux protocoles d'expérience le GMRT des sérums reste toujours supérieur à celui des éluats.

b. l'IFI aux dilutions de d1 à d8 donne un GMRT des sérums 8 fois plus élevé que celui des éluats tandis que l'IFI aux deux dilutions d1 et d3 donne un GMRT des sérums 2.6 fois plus élevé que celui des éluats.

Ceci confirme la supériorité de la sensibilité de l'IFI avec le sérum. Cette sensibilité est d'autant plus marquée si on procède à l'IFI avec des dilutions très poussées.

.../...

Graphique 3. GMRT S et E aux dilutions d1 à d8 et d1 - d3



QUATTREME PARTIE

DISCUSSION

4. DISCUSSION

4.1. Résultats

Il ressort de l'expérience conduite sur un échantillon de 278 paires sérums/éluats prélevées sur 278 individus de tout âge dans deux villages du cercle de Kolokanié. Le prélèvement pour les sérums au pli du coude des patients ne peut se faire que chez les enfants qui ont au moins 5 ans.

Les anticorps fluorescents sont obtenus d'une façon plus intense avec les sérums qu'avec les éluats. Cette intensité chez les sérums est d'autant plus accentuée si on avance en âge.

Ceci rejoint les observations de plusieurs auteurs :

VOLLER et BRAY (1962)(59) au Nigéria

Mc GREGOR et col (1965) (36) en Gambie

REY et col (1967)(49) au Sénégal

VOLLER et SCHINDLER (1967)(61) au Nigéria

VOLLER et BRUCE-CHWATT (1968)(60) au Nigéria

AMBROISE-THOMAS et col (1971)(4) au Sénégal

PICQ et col (1972)(45) en Haute-Volta

et confirmé par DELMONT (14) et KOKAINA (26).

D'après ces auteurs "les taux d'anticorps augmentent dès la fin de la première année, d'abord lentement puis rapidement pour atteindre vers 10 ans les valeurs moyennes de la population adulte".

Nous déduisons que la mise en évidence par le test IFI des anticorps fluorescents s'obtient d'une façon significativement plus intense chez les sujets âgés pour les sérums comme pour les éluats du fait qu'ils hébergent des anticorps palustres à un taux relativement élevé.

.../...

4.2. Avantages et inconvénients des sérums et éluats

L'IFI avec des sérums et des éluats comporte séparément pour chaque technique ses avantages et ses inconvénients

a. En ce qui concerne le sérum, le prélèvement est limité aux individus chez qui une ponction veineuse est possible. En campagne de masse on ne peut pas pratiquer chez les enfants une ponction sous-clavière ce qui est très dangereux et est réservé aux urgences en milieu hospitalier.

Ainsi, au cours des enquêtes, les enfants en bas âge n'ont pu être inclus. Les échantillons de sang prélevés doivent être aussitôt centrifugés, les sérums obtenus devant être transférés au laboratoire sous une réfrigération rigoureuse. Ceci nécessite une source électrique (générateur avec carburant si l'on travaille en zone rurale) et une chaîne de froid (glacière avec conservateurs de froid, frigidaire, congélateur).

Au laboratoire, les manipulations avec le sérum sont plus rapides et moins astringentes qu'avec les éluats.

Comme présenté précédemment, la réponse à l'IFI est obtenue plus facilement et d'une façon plus intense avec les sérums.

b. Quant à la méthode de prélèvement du sang sur papier absorbant qui est plus simple et plus économique, elle a fait ses preuves en campagne de masse. On peut prélever même chez les nouveaux-nés deux gouttes de sang pour confectionner une tache de sang sur papier absorbant. Il ne nécessite aucun équipement élaboré pour la confection comme pour le transfert au laboratoire pour traitement. Il suffit de mettre les cartes de papier absorbant à l'abri de la chaleur de la poussière et de les envoyer aussitôt au laboratoire où ils seront entreposés à + 4°C au réfrigérateur.

.../...

Mais la préparation des éluats à partir des cartes de papier absorbant s'avère fastidieuse. Il faut beaucoup plus de temps pour découper les taches de sang séchées en fines lamelles, de les déposer au-fond d'un tube à essai avant de les éluer dans du PBS.

La réponse à l'IFI obtenue avec les éluats est nettement inférieure à celle des sérums.

4.3. Application pratique des deux techniques

Au point de vue de l'application pratique de ces deux techniques, les sérums semblent mieux se prêter à la recherche des anticorps palustres aux dilutions les plus poussées. Ce qui peut se pratiquer en milieu hospitalier quand on fait la recherche des taux d'anticorps palustres chez des cas individuels.

En campagne de masse cette pratique s'avère impossible étant donné que l'IFI à une grande série de dilutions est plus astringente pendant les manipulations autant que pendant la lecture sous microscope à fluorescence. En plus elle nécessite une consommation plus importante des lames d'antigènes.

Au cours des enquêtes, quand les conditions sont réunies, on pourrait prélever des sérums qui seront traités de préférence aux dilutions choisies habituellement ($\frac{1}{40}$ et $\frac{1}{640}$) comme il se pratique dans notre laboratoire.

En l'absence d'un équipement approprié pour le prélèvement de sérum (centrifugation et réfrigération) on pourrait appliquer la technique de prélèvement du sang sur papier absorbant qui allège d'une façon remarquable le travail sur le terrain mais qui en plus permet d'incorporer l'ensemble de la population à toutes les classes d'âge.

.../...

CONCLUSION

CONCLUSION

Nous avons démontré au cours de cette expérience que par la technique d'IFI, les anticorps fluorescents sont obtenus plus facilement et d'une façon plus intense avec les sérums qu'avec les éluats.

L'application pratique de ces deux techniques dépend de ce qu'on veut obtenir de la réaction d'IFI. L'utilisation du sérum est propice en milieu hospitalier pour détecter la présence d'anticorps palustres aux dilutions variées dans des cas individuels.

En campagne de masse, notamment dans le contexte malien l'utilisation des sérums serait préférable à celle des éluats quand les conditions requises le permettent.

Dans le cas contraire, on pourrait avoir recours à l'IFI des éluats qui sont moins sensibles mais par contre cette technique est de loin la moins coûteuse et permet d'obtenir une meilleure couverture des populations étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

I

1. AMBROISE-THOMAS (P.). Apports et limites des techniques immunologiques dans l'évaluation séro-épidémiologique des risques parasitaires.
Rev. Epidem. et Santé Publ., 1977, 25, 521-530.
2. AMBROISE-THOMAS (P.). La réaction d'IFI dans l'étude séro-épidémiologique du paludisme. Rapport au Symposium O.M.S. sur le paludisme. Rabat 1-5 Avril 1974.
Bull. Org. Mondiale Santé 1974, 50, 267-276.
3. AMBROISE-THOMAS (P.); DRAPER (C.C.); KIEN (T.); GOULLIER (A.)
Valeur et limites de l'antigène de Plasmodium gallinaceum pour le séro-diagnostic du paludisme humain par immunofluorescence indirecte.
Bull. Org. Mondiale Santé 1972, 46, 856-861.
4. AMBROISE-THOMAS (P.); GAREN (J.P.); KIEN (T.). Intérêt de l'immunofluorescence dans le dépistage et l'étude épidémiologique des paludismes humains.
Bull. Org. Mondiale Santé. 1971, 44, 699-706
5. AMBROISE-THOMAS (P.); QUILICI (M.); RANQUE (Ph.). Réapparition du paludisme en Corse. Intérêt du dépistage séro-épidémiologique.
Bull. Soc. Path. Exot. 1972, 65, 533-542.
6. BRAY (R.S.). Studies on malaria in chimpanzees IV Laverania falciparum
Amer. J. trop. Med. Hyg. 1958, 7, 20-24.

.../...

II

7. BROOKE (M.M.); HEALY (G.H.) et MELVIN (D.M.). Staining Plasmodium berghei with fluorescein labelled antibodies.
Proc. 6th. Int. Congr. Trop.Med. Mal. 1959, 7, 59.
8. BROWN (K.N.) et BROWN (I.N.). Immunity to malaria : antigenic variation in chronic infections of P.knowlesi
Nature (LONDON) 1965, 203, 1286.
9. BRUCE-CHWATT (L.J.); DRAPER (C.C.). Sero-epidemiological evidence on - eradication of malaria from Mauritius,
Lancet 1973, 2, 547-551.
10. COLLINS (W.D.); SKINNER (J.C.) et COIFMAN (R.E.). Fluorescent antibody studies in human malaria V. Response of sera from Nigerians to five Plasmodium antigens.
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1967, 16, 560.
11. 2è Conférence internationale sur le Paludisme et les Babesioses 19.22 Septembre 1983 Annecy France, P. 75.
12. COONS (A.H.) et KAPLAN (M.H.). Localization of antigen in tissue cells II.
Improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J.Exp. Med. 1950, 91, 1.
13. CORRADETTI (A.), VEROLENI (F.) SEBASTIANI (A.), PROIETTI (A.M.) et AMATI (L.). Fluorescent antibody testing with sporozoites of Plasmodia.
Bull. Org. Mondiale Santé 1964, 30, 747.

.../...

III

14. DELMONT (J.). Diagnostic immunologique du paludisme par l'immunofluorescence. Modalités techniques. Applications cliniques et épidémiologiques. Dépistage des porteurs asymptomatiques en pratique transfusionnelle.
Thèse, Marseille, 1976, 326 pages.
15. DEMBELE (M.). Evaluation épidémiologique du paludisme avant la mise en eau du barrage de Sélingué (cercle de Yanfolila, République du Mali).
Thèse, med. Bamako, 1980, 188.
16. DICKO (B.S.). Intérêt de la sérologie du paludisme à propos de deux enquêtes épidémiologiques.
Thèse, med. Bamako, 1981, 8.
17. DOUMBIA (O.) Paludisme au Mali : Passé, Présent et Avenir
Thèse, med. Bamako, 1977, 21.
18. DRAPER (C.C.) ; VOLLER (A.) et CARPENTER (R.G.). The epidemiologic interpretation of serologic data in malaria.
Amer.J. Trop. Med. Hyg. 1972, 21, 5, 696-703.
19. GARIN (J.P.) ; AMBROISE-THOMAS (P.) ; KIEN (T.) ; SALIOU (P.)
Evolution des anticorps fluorescents au cours du paludisme humain par malariathérapie à Plasmodium vivax.
Bull. Org. Mondiale Santé 1971, 44, 689-699.

.../...

IV

20. GENTILINI (M.) et RICHARD-LEMOBLE (D.). Utilisation de l'antigène P. berghei pour le séro-diagnostic du paludisme humain par immunofluorescence indirecte. Bull. Soc. Path. Exot. 1972, 65, 315322.
21. HARVERSON (G.); WILSON (M.E.) et HALL (P.I.)
Assessment of current malaria endemicity in Bathurst, Gambia.
W. Afr. Med. J. 1968, 173, 63-67.
22. INGRAM (P.L.) et CARVER (R.K.). Malaria parasites. Fluorescent antibody technique for tissue stage study
Science, N.Y., 1963, 139, 405-406.
23. INGRAM (P.L.); OTKEN (L.B.) et JUMPER (J.R.). Staining of malariae parasites by the fluorescent antibody technique.
Proc. Soc. Exp. Biol. et Med. 1961, 106, 52-54.
24. KABAT (E.A.) et MAYER (M.M.). Experimental immunochemistry in Experimental immuno chemistry, Charles C. Thomas, Springfield 1961.
25. KIELMANN (A.) et WEISS (N.). Plasmodium gallinaceum as antigen in immunofluorescence studies.
Acta. Trop. (Basel) 1968, 25, 185.

.../...

26. KOKAINA (S.). Technique d'immunofluorescence indirecte appliquée à l'épidémiologie du paludisme.
Résultats d'une enquête menée dans 15 villages des cercles de KENIÈBA-BAFOULABÉ-KITA.
Thèse med. Bamako, 1982.
27. KONE (Z.). Enquête paludométrique dans 15 villages des cercles de Kénièba - Bafoulabé - Kita. Région de Kayes, République du Mali.
Thèse, med. Bamako, 1981.
28. KREIR (J.P.) et RISTIC MIODRA (C.). Detection of a berghei antibody complex formed in vivo.
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1964, 13, 6.
29. KUVIN (S.F.); TOBIE (J.E.), EVANS (C.B.); COATNEY (G.R.) et CONTACOS (P.G.). Antibody production in human malariae as determined by the fluorescent antibody technique- Science (N.Y.) 1962, 135, 1130-1131.
30. KUVIN (S.F.) et VOLLER (A.). Malarial antibody titers of West Africans in Britain
Brit. Med. J. 1963, 2, 477-479

.../...

VI

31. LACAN (A.) Repartition des especes plasmodiales du paludisme humain en Afrique du Sud du Sahara.
Med. Afr. Noire, 1967, 5, 203-220.
32. LELIJVELD (J.Z.M.) Sero-epidemiological studies of malariae in Tanzania.
Doctoral thesis, Nijmegen catholic University
1971.
33. MANAWADU (B.R.). Detection and measurement of malarial antibody by immunofluorescence.
These, P.R.D. LONDON University 1973.
34. MANAWADU (B.R.) et VOLLER (A.). The use of a fibre optic system in malarial immunofluorescence tests.
Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1971, 65, 5, 693-695.
35. Mc GREGOR (I.A.) Immunochimie du paludisme.
Med. Afr. Noire, 1967, 14; 5, 213-218.

VII

36. Mc GREGOR (I.A.); WILLIAMS (K.); VOLLER (A.) et BILLEWICZ (W.Z.). Immunofluorescence and the measurement of immune response to hyper-endemic malaria. Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1965, 59 395-414.
37. MEUWISSEN (J.H.E.Th.). Fluorescent antibody in human malaria especially in P. ovale. Trop. Geogr. Med., 1968, 210, 137-140.
38. MEUWISSEN (J.H.E.Th.). Antibody responses of patients with natural malaria to human and simian Plasmodium antigens measured by fluorescent antibody test. Trop. Geogr. Med. 1968, 210, 137-140.
39. MITCHELL (G.E.). Experimental studies on acquired malarial immunity. Thesis, LONDON, 1975.
40. O.M.S. Les progrès en immunologie du paludisme. Rapport d'un groupe scientifique, Série de rapports techniques 1975, n°579.

.../...

VIII

41. O.M.S. Comité OMS d'experts du paludisme. Seizième rapport.
Sér. Rapp. Tech. 1974, n°549.
42. O.M.S. Developments in malaria immunology.
Sér. Rapp. Tech. 1975, n° 579.
43. O.M.S. Epreuves sérologiques dans le paludisme.
Bull. OMS. 1974, 50, 3/4, 143372.
44. OTIENO (L.H.); LELIJVELD (J.), MEUWISSEN (J.H.D.Th.);
VERBEEK (A.M.J.A.) et DOESBURG (W.H.). Serological studies of malaria in East Africa I. Sero-epidemiological survey in a highly endemic malarious area.
Trop. Geogr. med. 1971, 23, 369.
45. PICQ (J.J.); ROUX (J.); MARCADET (Y); ETIENNE (J) et LAFAYE (A.). Variations des indices paludométriques classiques et des anticorps antipalustres décelés par une réaction d'immunofluorescence spécifique dans un village d'holo-endemie palustre à P. falciparum chez des sujets soumis à une chimioprophylaxie par la chloroquine et chez des sujets non soumis à la chimioprophylaxie.
Communication personnelle 1972. /

IX

46. PRESSMAN (D.); YAGI (Y.) et HIRAMOTOR (R). A comparaison of fluorescein and 1-131 as labels for determining the invivolocalization of anti-tissue antibodies
Int. Arch. Allergy 1958, 12, 125.
47. QUILICI (M.); DELMONT (J.); ROUGEMONT (A.) MATARESCHE (B.) BOISSON (M.E.). Evaluation de l'antigène P. falciparum d'origine humaine pour la réaction d'immunofluorescence indirecte dans le paludisme (sous presse).
48. RANQUE (J.); QUILICI (M.); DELMONT (J.). Les paludismes importés de premo-invasion à P. falciparum ; source d'antigène pour la réaction d'immunofluorescence.
Soc. Fse. parasit. Paris 1975.
49. REY (M.); Mc GREGOR (I.A.) et MATTER (P.). A propos des anticorps décalés chez les paludéens par immunofluorescence.
Med. Afr. Noire, 1967, 14, 319-322.

.../...

50. RODHAIN (J.), et JARDIN (J.). La transmission de P.falci-
parum au chimpanzé splénectomisé.
Ann. Soc. belge Med. Trop. 1964, 44, 531.
51. ROUX (J.); PICQ (J.J.); MARCADET (Y.). La réaction d'IFI
du paludisme utilisée en pays d'endémie avec
l'antigène homologue P.falciparum en goutte
épaisse.
Med. Trop. 1974, 34, 2, 145-155.
52. SALIOU (P.). Diagnostic sérologique du paludisme humain
par l'immunofluorescence.
Thèse, med. Lyon, 1964.
53. SULZER (A.J.) et WILSON (M.). The fluorescent antibody test
for malaria.
In the fluorescent antibody test for malaria
Critical Reviews in clinical laboratory Sciences
1971.

.../...

XI

54. SULZER (A.J.) et WILSON (M.). The use of thick-smear antigen slides in malaria indirect fluorescent antibody test.
J. Parasit. 1967, 53, 1110-1111.
55. TARGETT (G.A.T.). Antibody response to P. falciparum malaria. Comparisons of immunoglobulin concentration, antibody titres and the antigenicity of different asexual forms of the parasite.
Clin. Exp. Immunol. 1970, 7, 501.
56. THAYER (S.). Development in the I.F.A. test for tropical parasitic infections especially malaria.
Thesis, LONDON, 1975.
57. TOBIE (J.E.); COATNEY (G.R.) et EVANS (C.B.). Fluorescent antibody staining of human malaria parasites.
Exp. Parasitol, 1961, 11 - 123-132.
58. VOLLER (A.) et BRAY (R.S.). Fluorescent antibody staining as a measure of malaria antibody.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1962, 110, 907-910.
59. VOLLER (A.) et BRUCE-CHWATT (L.J.). Serological malaria surveys in Nigeria.
Bull. O.M.S. 1968, 39, 883.

.../...

XII

60. VOLLER (A.) et SCHENDLER (R.). An evaluation of complement fixation and immunofluorescent tests with a simian malaria parasite antigen in a study of malaria antibody levels in a population in a malaria endemic area.

Bull OMS. 1967, 37, 675.