

4. NICOLLE (CH.), ANDERSON (CH.) et COLAS-BELCOUR (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1927, **185**, 334 et *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1928, **17**, 1.
5. SERGENT (E.) et FOLEY (H.). — *Annales Inst. Pasteur*, 1910, **24**, 337.
6. SERGENT (E.) et PONCET (A.). — *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 1961, **39**, 109.
7. SPARROW (H.). — *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1956, **33**, 163.
8. SPARROW (H.). — *Bull. OMS*, 1958, **19**, 673.

**RÉACTIONS SÉROLOGIQUES CROISÉES  
ENTRE *PLASMODIUM FALCIPARUM*  
ET *PLASMODIUM CYNOMOLGI BASTIANELLII*.  
APPLICATIONS AU SÉRO-DIAGNOSTIC,  
PAR IMMUNOFLUORESCENCE,  
DU PALUDISME HUMAIN A *PLASMODIUM FALCIPARUM***

Par J. P. GARIN, M. REY et P. AMBROISE-THOMAS (\*)  
(avec la collaboration technique de Mlle A. RIGAUD et de Mme M. MINJAT)

L'existence de caractères antigéniques communs à plusieurs plasmodiums parasites des primates est aujourd'hui bien démontrée par l'immuno-fluorescence.

Particulièrement intéressantes nous ont paru les réactions croisées entre *Plasmodium cynomolgi bastianellii* et les hématozoaires de l'homme car, en dehors de leur importance épidémiologique (*P. cynomolgi bastianellii* est inoculable à l'homme) elles sont susceptibles d'intéressantes applications pratiques pour le séro-diagnostic du paludisme humain. Dans une étude antérieure (3), nous avons repris les travaux de VOLLER et ceux de TOBIE et COATNEY en ce qui concerne la très grande similitude antigénique de *P. vivax* et de *P. cynomolgi bastianellii* dont nous avons proposé l'utilisation pour l'étude sérologique des paludismes humains à *P. vivax* (nos résultats, en ce domaine, portent actuellement sur plus de 400 sérums humains).

Il restait cependant à démontrer qu'une communauté antigénique, également importante, existait entre cet hématozoaire du singe et les autres plasmodiums humains, en particulier *P. falciparum*. Deux études ont, jusqu'ici, été consacrées à ce sujet. Elles ont été réalisées par KUVIN et VOLLER (1963) et par COLLINS, JEFFERY et coll. (1966).

KUVIN et VOLLER ont étudié les sérums de 26 anciens paludéens (paludisme à *P. falciparum*) en les faisant réagir avec *P. cynomolgi bastianellii* et *P. falciparum*. Les taux obtenus, dans chaque cas, n'ont pas montré de différences significatives et ces auteurs ont sug-

(\*) Séance du 6 juillet 1966.

géré l'utilisation de *P. cynomolgi bastianellii* pour le séro-diagnostic du paludisme à *P. falciparum*.

L'étude de COLLINS, JEFFERY et coll. a porté sur les sérums de 11 patients impaludés, pour malariathérapie, avec *P. falciparum* (l'inoculation a été réalisée par l'anophèle ou par injection de sangs parasités). Ces sérums ont été testés avec, comme antigène, 3 plasmodiums de l'homme (*P. falciparum*, *P. malariae* et *P. vivax*) et 7 plasmodiums des singes (*P. fieldi*, *P. gonderi*, *P. inui*, *P. coatneyi*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi bastianellii* et *P. brasilianum*). Des réactions croisées ont été observées dans tous les cas mais, pour *P. falciparum*, ces réactions croisées ont été plus intenses avec *P. fieldi* qu'avec *P. cynomolgi bastianellii*. Sans être opposées, ces deux séries de conclusions sont nettement divergentes encore que les conditions expérimentales n'aient pas été exactement les mêmes (en particulier les malades de COLLINS et JEFFERY avaient subi plusieurs impaludations successives avec, dans certains cas, *P. malariae*, *P. ovale* puis *P. falciparum*).

Il était donc intéressant de reprendre ce problème pour préciser si *P. cynomolgi bastianellii*, déjà utilisé pour le diagnostic sérologique du paludisme à *P. vivax*, pouvait être employé, dans les mêmes conditions pour l'étude immunologique de l'infection à *P. falciparum*.

C'est ce point que nous nous sommes efforcés de préciser en étudiant une cinquantaine de sérums humains anti-*P. cynomolgi bastianellii* et *P. falciparum*.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### 1° Antigène.

L'antigène est constitué par des étalements minces de sangs parasités. Il s'agit de :

. *sangs de singes Rhésus*, contenant 10 à 30 0/0 d'hématies parasitées par *P. cynomolgi bastianellii*. Prélevés du 8<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour suivant l'inoculation, ces sangs nous ont été adressés après addition d'héparine (\*);

. *sangs humains, parasités* par *P. falciparum* (la parasitémie étant de 2 à 3 0/0 environ) et recueillis à Dakar. Nous avons effectué, à Lyon, des préparations à partir de ces sangs héparinés ou défibrinés ou bien nous avons utilisé des étalements directement réalisés à Dakar.

(\*) Nous devons ces envois à l'amabilité du Professeur BENAZET des Laboratoires Rhône-Poulenc.

TABEAU I. — *Neuro-paludisme.*

N° sérum	Date (*)	Âge	Symptomatologie	Diagnostic	Évolution	Immuno-fluorescence	
						<i>P. cynomolgi bastianelli</i>	<i>P. falciparum</i>
538 A	2 jours	3 ans	convulsions, coma	GE ++ PBF +	guérison	640	320 (640)
640 A	2 jours	5 ans	convulsion, obnubilation	GE ++ PBF -	"	320 (640)	320 (640)
604 A	2 jours	3 ans 1/2	coma	GE - PBF +	"	320 (640)	640
571 A	2 jours	1 an	coma	GE + PBF +	"	320 (640)	640
618 A	2 jours	3 ans	convulsions, tr. psychiques	GE ++ PBF +	"	20 (160)	640
667 A	3 jours	1 an 1/2	convulsions, rigidité	GE ++ PBF +	"	20	20 (160)
667 B	14 jours				"	640	160 (320)
635 A	1 jour	2 mois	convulsions, anémie splénomégalie	GE ++	"	160	160
635 B	16 jours				"	160	20 (160)
642 A	5 jours	8 ans	déficit en G6 PD	GE - PBF +	guérison	20	20 (160)
642 B	14 jours				"	20 (160)	20 (160)
608 A	1 jour	10 ans	convulsions	GE - PBF +	"	160 (320)	
623 A	5 jours	8 mois	convulsions	GE - PBF +	"	640	
738 A	1 jour	4 ans	convulsions, coma vigil	GE ++	décès en 3 jours	20 (160)	160 (320)
718 A	1 jour	3 ans	convulsions, coma	GE +++	décès en 4 jours	160	160
725 A	1 jour	3 ans	Tr. psychique ++ hypertonie intense bilieuse hémoglobinurique-déficit G6 PD	GE ++	décès en 10 jours	160	640
1 093 A	3 jours	19 ans		GE ++	décès en 3 jours	640	640
<i>Paludisme non neurologique</i>							
Accès simple + s. viscéraux							
643 A	2 jours	2 ans	accès simple	GE + PBF -		160	160
677 A	3 jours	3 ans 1/2	palu-viscérol	GE +++		640	160 (320)
655 A	3 jours	1 an 1/2	"	GE ++		160 (320)	640
636 A	6 jours	1 an 1/2	"	GE ++		640	
584 A	3 jours	3 ans 1/2	accès simple	GE - PBF +		640	640
555 A	2 jours	28 ans	"	GE - PBF +		640	
55 C			"			160	20 (160)
654 A	3 jours	44 ans	"	GE +		160	160
649 A	2 jours	25 ans	"	GE +		640	
648 A	2 jours	30 ans	"	GF +		640	640
628 A	4 jours	20 ans	"	GE +		160	640
626 A	4 jours	36 ans	"	GE ++		640	640
621 A	8 jours	30 ans	palu-lèpre	GE +		160	160 (320)
Paludisme associé							
656 A	2 jours	3 ans	rougeole	GE +		160	160
630 A	2 jours	1 an	rougeole	GE +		20	20 (160)
519 A	10 jours	7 mois	laryngite	GE +		160	20 (160)
711 A	5 jours	3 ans	rougeole	GF +		160	160 (320)
<i>Enquête épidémiologique (sujet à GE négative)</i>							
Enfants (saison sèche)							
435 A		2 ans	varicelle-rougeole			20 (160)	160 (320)
436 A		2 ans 1/2	fièvre typhoïde			20	20
438 A		5 ans	méningite purulente			20 (160)	
432 A		1 an	rougeole			160	160
430 A		1 an	herpès			20	160
425 A		3 ans	pneumopathie			20 (160)	20 (160)
Enfants (saison des pluies)							
554 A		4 ans	pneumopathie			640	
558 A		4 ans	diphtérie			20	20 (160)
552 A		2 ans	rougeole			160	20 (160)
540 A		1 an 1/2	diarrhée			640	
531 A		1 an	diphtérie			640	640
Adultes (saison des pluies)							
622 A		20 ans	méningite purulente			20	160
695 A		25 ans	bilharziose G. U.			160	160 (320)
550 A		28 ans	fièvre typhoïde			160	
(*) Prélèvement fait après traitement.							
Nota : Tous les malades sont des Africains nés et demeurant en zone d'endémie (sauf le n° 555 : Libanaise née à Dakar).							

2° *Sérums étudiés.*

Les 55 sérums étudiés ont été prélevés à Dakar, chez des malades atteints de paludisme à *P. falciparum* et mis en ampoules sur place (service du Professeur Agrégé M. REY). Prélevés pour la plupart durant l'année 1964, ces sérums ont été stockés sur place à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant un an environ, avant d'être expédiés à Lyon. Leur transport a entraîné une décongélation de deux jours. Leur conservation, à Lyon, a été assurée à  $+4^{\circ}\text{C}$ , pendant quelques jours ou à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour ceux d'entre eux dont nous avons dû différer l'étude de quelques semaines.

3° *Conjugués fluorescents.*

Nous utilisons des produits commercialisés (antiglobulines fluorescentes B-D Merieux) dilués au 1/8, en moyenne, dans du tampon à pH 7,2.

4° *Installation microscopique.*

Notre installation comprend un microscope Reichert « Zetopan », équipé pour la fluorescence et le contraste de phase. Cet appareil est pourvu d'un stabilisateur de tension qui assure un éclairage rigoureusement constant en lumière ultra-violette. Nous utilisons un condensateur à fond clair, « à sec », un filtre BG 12/3 mm. (filtre d'émission) et des filtres CG 9/1 mm. et OG 1:1 mm. 5 comme filtres d'arrêt.

#### MODE OPÉRATOIRE

La technique demeure pratiquement identique à celle que nous avons précédemment décrite (2, 3, 5). La seule modification concerne le temps de fixation, dans l'acétone, des étalements de sang. Au lieu d'être réalisée pendant 30 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ , cette fixation a été effectuée pendant 5 minutes à la température ordinaire. De même la deshémoglobinisation, par l'acide chlorhydrique, n'est plus pratiquée.

#### RÉSULTATS

Sur les 55 sérums considérés, nous avons éliminé 7 prélèvements très contaminés et donnant des résultats sans valeur. Sur les 48 sérums restants 40 ont été étudiés en parallèle, avec *P. falciparum* et *P. cynomolgi bastianellii*. Dans tous les cas les dilutions envisagées ont été : 1/20, 1/60, 1/320 et 1/640.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant où sont indi-

qués les titres obtenus. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux titres pour lesquels nous avons observé une très légère fluorescence traduisant une réaction douteuse.

#### COMMENTAIRE

Il est bien difficile, à partir de cette première série de résultats d'établir une correspondance entre les données de la sérologie et les formes cliniques observées. Il est de même impossible d'apprécier le niveau moyen des anticorps présentés par une population noire vivant en zone d'endémie. Nos résultats sont insuffisamment nombreux pour cela et de plus il aurait fallu, pour chaque sérum, poursuivre la réaction jusqu'à sa négativation totale, alors que nous nous sommes arbitrairement fixés comme limite supérieure le taux de dilution de 1/640. Il faut cependant souligner que tous les sérums en bon état de conservation sont positifs quel que soit l'âge du sujet ; en zone endémique, tous les individus sont porteurs d'anticorps fluorescents.

Par contre, notre étude permet de vérifier l'importance des réactions croisées entre *P. cynomolgi bastianellii* et *P. falciparum*. Pour les 40 sérums étudiés simultanément avec ces deux antigènes nous n'avons pas noté de différences bien significatives entre les deux séries de résultats. Les taux moyens sont en effet de 296 avec *P. cynomolgi bastianellii* et de 344 avec *P. falciparum*, ce qui indique bien l'importance de la fraction antigénique commune à ces deux protozoaires mais cependant la spécificité plus grande avec *P. falciparum*.

Ces notions apparaissent plus nettement si l'on considère la fréquence de distribution des titres obtenus avec les deux types de parasites et qui sont résumées dans le tableau II.

On voit ainsi que pour 15 sérums sur 40, il y a une stricte concordance entre les deux séries de résultats.

Pour 15 sérums on note une légère divergence : réaction positive, pour un taux de dilution avec un antigène et douteuse, pour le taux supérieur de dilution, avec l'autre antigène. Sur ces 15 sérums, 10 ont un titre légèrement plus élevé avec *P. falciparum* et 5 avec *P. cynomolgi*.

Enfin pour 10 sérums nous avons noté une discordance plus nette. 8 sérums ont un titre plus élevé avec *P. falciparum* et 2 avec *P. cynomolgi*. Dans l'ensemble ces différences semblent bien correspondre à ce qui est généralement observé dans toute réaction suivant que l'on utilise l'antigène spécifique ou un antigène de groupe. Les réactions croisées sont cependant suffisamment intenses pour que, en fonction de ces résultats et de ceux obtenus par KUVIN et VOLLER,

TABLEAU II

Réactions croisées entre *Plasmodium falciparum* (P. f.)  
et *Plasmodium cynomolgi bastianellii* (P. c.).  
Titres obtenus  
dans l'étude de 40 sérums humains anti-*Plasmodium falciparum*.

P. f. P. c.	Négatif	20	± 160	160	± 320	320	± 640	640
Négatif								
20		1						
± 160		4	2	4				
160		2		6				
± 320			2	4	0			2
320						0		
± 640							1	1
640			1	2	1		2	5

on puisse considérer que *P. cynomolgi bastianellii* est parfaitement utilisable pour le diagnostic sérologique des paludismes humains à *P. falciparum*.

Cette utilisation nous semble justifiée pour trois raisons :

1° *La sensibilité* de la technique n'est que relativement peu affectée par l'emploi de l'antigène simien.

2° *La spécificité* ne paraît en rien modifiée puisque tous les sérums témoins employés au cours de notre étude, ont été trouvés également négatifs avec l'un et l'autre antigène.

3° *La commodité d'emploi* de *P. cynomolgi bastianellii* est plus grande.

Comme nous l'avions déjà signalé à propos du paludisme humain à *P. vivax*, l'emploi de *P. cynomolgi bastianellii* peut être particulièrement précieux dans les pays situés en dehors des zones d'endémie et où les sangs humains pouvant servir d'antigène sont évidemment rares. En outre cette solution permet un approvisionnement régulier en sangs très parasités dans la mesure où l'on dispose d'une animalerie suffisante pour entretenir sur singes rhésus, la souche de *P. cynomolgi bastianellii*.

Il faut de plus tenir compte des difficultés de lecture que nous avons rencontrées lorsque la réaction a été effectuée avec *P. falciparum*. Ceci semble tenir à plusieurs facteurs :

— *P. falciparum* a une allure plus grêle qui le rend plus difficile à distinguer en immuno-fluorescence.

— L'antigène pouvait avoir subi une altération du fait des délais de transport.

— Enfin, il est possible qu'une partie de l'activité antigénique des parasites ait été bloquée par les anticorps sériques présents dans les sangs utilisés pour faire les étalements.

Ces sangs ont en effet été collectés chez des Africains adultes vivant en zone d'endémie et présentant, au moment du prélèvement, un accès palustre avec parasitémie élevée à *P. falciparum*. Ces malades possédaient donc un taux élevé d'anticorps qui, s'ils ont été insuffisants pour assurer une protection face à des contaminations répétées, ont pu néanmoins se fixer sur les parasites déjà présents dans le sang circulant.

Cette hypothèse semble bien confirmée par ce que nous avons pu observer avec les étalements de sangs de singes.

Nous avons indiqué que ces sangs sont prélevés du 8<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour qui suit l'inoculation. En fait certains sangs prélevés plus tardivement se sont avérés inutilisables, comme le montre le tableau suivant :

TABLEAU III

Dates	Singes n°	Nombre de jours entre l'inoculation et le prélèvement	o/o d'hématies parasitées	Valeur antigénique
11-5-65	155	11	10	+
30-7-65	177	8	30	++++
5-10-65	188	13	2	+
21-10-65	202	15	0,1	+
5-1-66	240	19	1	—
3-3-66	254	7	5	++++
3-3-66	248	6	1	++++

Les meilleurs résultats sont donc obtenus avec les sangs d'animaux massivement infestés et chez lesquels le prélèvement a été assez précoce pour devancer l'apparition des anticorps, c'est-à-dire avant le 8<sup>e</sup> jour. Cette notion n'a pas, jusqu'ici, retenu l'attention. Elle paraît pourtant présenter une grande importance pratique et correspond à un phénomène assez général de « fragilisation », par le conflit antigène-anticorps, du matériel antigénique, tardivement prélevé (c'est par exemple ce qui est observé pour le test de lyse des toxoplas-

mes, ceux-ci devant être prélevés dans les 48 heures qui suivent l'inoculation).

Il serait intéressant de le vérifier pour *P. falciparum* ou *P. vivax*, prélevés de plus en plus tard par rapport au 1<sup>er</sup> accès fébrile. Au fur et à mesure qu'on s'éloigne de ce premier accès on verrait sans doute baisser le titre de la réaction. C'est pour cela que tous les résultats exprimés sans tenir compte de cette notion, risquent d'être incomplets. Les discordances enregistrées par les différents auteurs trouvent probablement là leur explication. A l'avenir il faudrait connaître le niveau des anticorps du donneur d'antigène, qu'il soit homme ou singe, et ne retenir comme bons donneurs, que ceux dont le titre est le plus faible.

Pour pouvoir utiliser des sangs humains parasités par *P. falciparum*, il faudrait donc que les prélèvements soient effectués chez des malades récemment contaminés et n'ayant pas encore un taux élevé d'anticorps circulants. Venant s'ajouter à l'impératif absolu d'une parasitémie élevée, cette nouvelle nécessité complique encore l'utilisation de *P. falciparum*. Ce pourrait être une indication supplémentaire à l'emploi de *P. cynomolgi bastianellii* pour l'étude des paludismes de l'homme, car, dans ce cas, il est plus facile d'obtenir un antigène stable et connu ce qui facilite la reproductibilité de la réaction sans pour autant diminuer sa sensibilité et sa spécificité.

#### RÉSUMÉ

Par la méthode d'immuno-fluorescence, les auteurs ont analysé 40 sérums humains anti-*P. falciparum*. Ces sérums ont été étudiés parallèlement avec, comme antigène, *P. falciparum* et *P. cynomolgi bastianellii*.

Les résultats confirment la très grande parenté antigénique de ces deux parasites. *P. cynomolgi bastianellii* semble donc pouvoir être régulièrement utilisé pour le diagnostic sérologique, par immuno-fluorescence, des paludismes humains à *P. falciparum*.

*Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Exotique, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon. Clinique des maladies infectieuses de Dakar.*

#### BIBLIOGRAPHIE

1. COLLINS (W. E.), JEFFERY (C. M.), GUINN (E.) et SKINNER (J. C.). — Fluorescent antibody studies in human malaria. IV Cross-reactions between human and simian malaria. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1966, 15, 11-15.



2. COUDERT (J.), GARIN (J. P.), AMBROISE-THOMAS (P.), SALIOU (P.) et LU HUYNH THANH. — L'Immuno-fluorescence dans le séro-diagnostic des paludismes humains expérimentaux et spontanés (A propos de 30 observations). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1965, **58**, 188-207.
3. COUDERT (J.), GARIN (J. P.), AMBROISE-THOMAS (P.), SALIOU (P.) et Mme MINJAT. — Utilisation de *P. cynomolgi bastianellii* dans le séro-diagnostic par Immuno-fluorescence, des paludismes humains. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1965, **58**, 630-639.
4. DIGS (C. L.) et SADUN (E. H.). — Serological cross reactivity between *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* as determined by a modified fluorescent antibody test. *Exper. Paras.*, 1965, **16**, 217-223.
5. GARIN (J. P.), AMBROISE-THOMAS (P.) et SALIOU (P.). — Diagnostic sérologique du paludisme par la méthode des anticorps fluorescents. *Presse Médicale*, 1965, **73**, n° 32, 1847-1852.
6. KUVIN (S. F.) et VOLLER (A.). — Malarial antibody titres of West-Africans in Britain. *Brit. Med. J.*, 1963, **24**, 477-479.
7. TOBIE (E. E.), KUVIN (S. F.), CONTAGOS (P. G.) et COATMEY (G. R.). — Cross reactions in human and animal malaria. *J. Amer. Med. Ass.*, 1963, **184**, 945-947.
8. VOLLER (A.). — Fluorescent antibody methods and their use in malaria research. *Bull. Org. Mond. Santé*, 1964, **30**, 343-354.

#### A PROPOS D'UN CAS DE BILHARZIOSE A *SCHISTOSOMA INTERCALATUM*

Par R. PAUTRIZEL, J. TRIBOULEY, J. GAUBERT,  
S. VERDAGUER et G. LOUISIA (\*)

Classiquement les bilharzioses en Afrique, affectent chez l'homme deux formes cliniques distinctes : forme vésicale à *Schistosoma haematobium*, et forme intestinale à *Schistosoma mansoni*.

En 1934, FISCHER devait individualiser une forme nouvelle de la maladie, de distribution restreinte, localisée à certaines régions de l'Afrique Équatoriale et caractérisée par l'élimination dans les selles d'œufs à éperon terminal. Les œufs du parasite sont de forme plus allongée que ceux de *S. haematobium* mais ils sont moins longs que ceux d'une autre espèce de schistosome à éperon terminal, *S. bovis* Sousino 1876 qui parasite les bovins. C'est afin de rappeler le caractère intermédiaire des œufs de l'espèce nouvellement identifiée que FISCHER lui donna le nom de *S. intercalatum* (5).

Nous rapportons ici un cas de bilharziose à *S. intercalatum*, affection de distribution plus restreinte que les autres bilharzioses et par conséquent moins bien connue.

(\*) Séance du 6 juillet 1966.