L'antigène "Trypanosoma gambiense" dans la réaction d'immunofluorescence indirecte

Jean-Louis FREZIL*
Marie-Thérèse LOUEMBET**,
Jean ALARY***

RÉSUMÉ

Les auteurs présentent un mise au point sur les techniques de préparation et la valeur des différents antigènes du groupe brucei dans la réaction d'immunofluorescence indirecte. Leur travail repose sur une étude bibliographique des travaux antérieurs et une expérimentation personnelle effectuée avec des sérums de sommeilieux et des souches de T. gambiense d'Afrique Centrale. Leur conclusion est que la qualité de la réaction dépend très peu de l'antigène utilisé, à condition qu'il appartienne au groupe brucei.

MOTS-CLÉS : Immunologie - Trypanosomiasis - Afrique Centrale.

SUMMARY

"TRYPANOSOMA GAMBIENSE" ANTIGEN IN THE INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST.

The authors begin by giving an updated bibliography on techniques for preparing various antigens of the brucei group, and their value in the indirect fluorescent antibody test used for detecting sleeping sickness.

They go on to precise some controversial or insufficiently detailed points using data from a series of experiments carried out with strains of T. gambiense from Central Africa and sera from trypanosomiasis cases from the same region.

The statistical study of results does not allow to point out :

— *that there is some difference between the different strains used (in fact, all the polymorphic blood strains of brucei group seem to be suitable);*

— *that the number of passages of the strain in laboratory animals and the stage of the bleeding have some importance;*

— *that the antigen concentration has some influence on the reaction.*

KEY WORDS : Immunology - Trypanosomiasis - Central Africa.

1. INTRODUCTION.

La technique d'immunofluorescence indirecte, comme toutes les méthodes reposant sur une réaction antigène-anticorps, peut subir des fluctuations sensibles dans l'interprétation des résultats selon les modalités de préparation du test et leur lecture.

Nous ne nous attarderons pas sur le problème de la lecture puisque c'est à chaque opérateur de déterminer la positivité d'une réaction, par comparaison avec des témoins positifs et négatifs.

Par contre, la réaction elle-même mérite une mise au point.

Ce travail a été subventionné par l'O.M.S. Il a été exécuté dans le cadre de l'accord O.C.E.A.C.-O.R.S.T.O.M. en matière de recherche médicale.

* Parasitologiste O.R.S.T.O.M., Centre O.R.S.T.O.M. de Brazzaville, B.P. 181, Congo.

** Technicienne de l'O.R.S.T.O.M.

*** Médecin statisticien - épidémiologiste.

Etant donné que :

- d'une part, le sérum fluorescent antiglobulines humaines se trouve dans le commerce, où il est de qualité satisfaisante et constante,
- d'autre part, la technique de la réaction semble parfaitement mise au point depuis le travail de Wery *et al.* (1970),

on peut raisonnablement estimer que la qualité du résultat dépend essentiellement de l'antigène utilisé.

Quelques auteurs ont tenté de déterminer les meilleures conditions de préparation de l'antigène, et, en particulier, ont essayé plusieurs modes de fixation tels que formol, méthanol, chaleur, etc... (Bailey *et al.*, 1967; Courtois et Bideau, 1966; Lucasse, 1970; Latif et Adam, 1973; Weitz, 1963).

C'est cependant la technique de Wery (*loc. cit.*) qui donne actuellement le plus de satisfactions et tend à se généraliser. Elle consiste à utiliser des frottis de sang parasite, non fixés, et simplement conservés au congélateur.

La valeur antigénique de diverses souches ou espèces de trypanosome, et même de différents stades du cycle de ce parasite a fait l'objet d'un certain nombre de travaux :

— Williams *et al.* (1963) constatent expérimentalement que les formes sanguines de *T. gambiense* et *T. rhodesiense* produisent un meilleur antigène que les formes de culture. Ils notent que les réactions sont plus fortes avec l'antigène homologue, mais qu'il peut y avoir des réactions croisées avec *T. lewisi*.

— Sadun *et al.* (1963), observent sur des sérums de sommeilleux des réactions croisées importantes entre *T. rhodesiense* et *T. gambiense*, et, à un degré moindre, *T. cruzi*.

— Latif et Adam (1973), montrent expérimentalement avec *T. brucei*, *T. rhodesiense* et *T. gambiense*, que « le titre d'un immunsérum est au moins quatre fois plus élevé en présence de l'antigène homologue que de l'antigène hétérologue ».

— Par contre, d'après Wery (*loc. cit.*) : les titres sont remarquablement constants avec tous les antigènes du groupe *brucei* qui ont gardé leur polymorphisme.

Ce dernier auteur introduit également les critères de durée de la parasitémie et de concentration de l'antigène.

D'après lui, chez le cobaye, plus l'infection est ancienne et plus la réaction est sensible et donc moins spécifique. (En effet des fluorescences trop fortes peuvent fausser l'estimation de la positivité). Il constate également que la concentration d'antigène n'a pas d'effet sur la brillance de la coloration, mais qu'il est cependant plus facile d'interpréter la réaction lorsque le frottis présente 5 à 20 parasites par champ.

Les différentes conclusions des travaux précités font ressortir quelques analogies, mais aussi quelques contradictions qui justifient la poursuite de recherches dans ce domaine.

Comme nous travaillons exclusivement avec des souches de *T. gambiense*, il nous a semblé intéressant de préciser les points et hypothèses suivants :

— Influence du temps passé par le parasite chez le rat donneur : il est possible que les anticorps produits par le rat saturent progressivement les structures antigéniques du parasite et empêchent par la suite les anticorps humains de se fixer normalement.

— Influence de la concentration des parasites par champ : selon Ambroise-Thomas (1974), « toute réaction sérologique suppose un équilibre entre différents facteurs et, en premier lieu, entre les quantités d'antigène et d'anticorps mis en présence ». Logiquement, les anticorps sont d'autant plus répartis que la préparation est riche en parasites, ce qui doit se traduire par une baisse d'intensité de la réaction.

— Influence de l'origine géographique du trypanosome : il peut en effet exister certaines variations antigéniques importantes entre les trypanosomes d'une même sous-espèce provenant de foyers ou de pays différents.

— Influence du nombre de passages sur animaux de laboratoire : des souches qui ont perdu depuis longtemps le contact avec l'homme peuvent avoir modifié certaines de leurs structures antigéniques.

Trois séries d'expériences ont donc été réalisées pour contribuer à résoudre ces problèmes.

2. EXPÉRIMENTATION.

2.1. Prélèvement périodique d'antigène sur un même rat.

2.1.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Trois rats sont simultanément inoculés avec une même souche de *T. gambiense* et la même quantité de parasites (rats Ag I, Ag II et Ag III).

Tous les 5 jours, le sang est prélevé dans le sinus rétro-orbital avec une pipette rincée à l'héparine.

Nous avons pu ainsi obtenir 3 lots successifs d'antigène avec les rats Ag II et Ag III et 2 lots avec Ag I qui est mort avant les 2 autres.

Pour chaque série de prélèvement, les tests sont immédiatement effectués selon la méthode de Wery *et al.* (1970).

L'ANTIGÈNE « *TRYPANOSOMA GAMBIENSE* » EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Nous avons utilisé 10 sérums : 8 proviennent de trypanosomés avant traitement, 1 de malade en rechute et 1 de témoin.

Les dilutions du sérum vont du 1/20 au 1/160^e.

Au moment de la lecture, le nombre moyen de trypanosomes par champ est évalué.

2.1.2. RÉSULTATS.

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau I (en annexe).

On ne peut mettre en évidence de différence statistique significative entre les rats inoculés avec une même souche de trypanosome, autrement dit pour des lots d'antigène obtenus à partir d'une même souche inoculée à des rats différents. Et ceci est valable quels que soient le délai écoulé après l'inoculation et le nombre de trypanosomes par champ.

Nous serons toutefois de l'avis de Wery (1970) en ce qui concerne la concentration des trypanosomes. Il est, en effet, difficile d'interpréter la réaction lorsqu'il n'y a qu'un seul parasite dans le champ microscopique, ou qu'il y en a trop, par excès ou manque de contraste. En effet dans le cas du témoin n° 9, avec moins d'un trypanosome par champ, nous atteignons le titre de 1/40^e qui représente pour nous le seuil d'estimation de la trypanosomiase.

2.2. Prélèvement simultané d'antigène sur des rats différents.

2.2.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Cette expérimentation complète, pratiquement, la précédente. En effet, dans cette dernière, la fabrication d'antigène était échelonnée dans le temps, à partir de rats inoculés extemporanément.

Ici, au contraire, l'antigène a été préparé simultanément à partir de rats inoculés à des moments différents.

Les rats ont été infectés avec la même souche et saignés selon le calendrier suivant :

Chronologie	Rats inoculés	Saignées
J0	a 1, b 1, c 1	
J5	a 2, b 2, c 2	
J10	a 3, b 3, c 3	
J15	a 4, b 4, c 4	
J20	a 5, b 5, c 5	1 ^{ère} saignée
J30	a 6, b 6, c 6	2 ^e saignée
J40		3 ^e saignée
J50		4 ^e saignée

Il y a donc eu 4 saignées successives sur l'ensemble des rats inoculés. Les rats n'ont pas survécu plus de 42 jours, ce qui correspond à 3 prélèvements, au maximum, pour un même rat.

Les tests ont été effectués avec les mêmes sérums et la même méthodologie que dans la première expérimentation.

2.2.2. RÉSULTATS.

Nous ne jugeons pas utile de présenter ici la totalité de nos chiffres, par trop indigestes. Nous nous contenterons des tableaux II et III (en annexe), qui résument les résultats provenant de rats inoculés depuis plus ou moins longtemps.

Les résultats obtenus à partir des mêmes sérums de trypanosomés sont pratiquement identiques entre eux et confirment les observations de la première expérimentation.

A la lecture directe de l'ensemble des résultats, nous avons eu l'impression que le titre de positivité de la réaction s'élevait légèrement en fonction de la durée de la parasitémie chez le rat donneur.

L'étude statistique nous montre qu'il n'est pas possible de mettre en évidence un facteur « durée de la parasitémie » mais qu'il existe un « facteur sérum » particulièrement net pour les sérums 7 et 10.

En effet ces derniers présentent des variations de titre assez importantes selon l'antigène avec lequel ils sont testés.

Ces différences de titre pourraient être liées au phénomène de la variation antigénique.

2.3. Valeur antigénique de souches différentes.

2.3.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Six souches polymorphes de *Trypanosoma gambiense* ont été utilisées : 5 proviennent de différents foyers de la République Populaire du Congo, le sixième est d'origine camerounaise (souche MOS).

Ces souches ont été isolées depuis plus ou moins longtemps (cinq ans pour la plus ancienne) et portent, au moment du prélèvement les numéros de passage : 1, 4, 4, 7, 9 et 71. (Le n° du passage indique le nombre de fois qu'une souche a été transmise de rat à rat depuis son isolement à partir du malade).

Les rats ont été saignés pour préparation d'antigène dès que la parasitémie a été jugée satisfaisante.

Une série de tests a été pratiquée avec 12 sérums de trypanosomés et 2 témoins.

2.3.2. RÉSULTATS.

Le tableau IV (en annexe) présente les titres obtenus en utilisant des souches diverses avec des densités parasitaires différentes.

On ne peut mettre en évidence de différence statistiquement significative entre les résultats des 6 souches utilisées comme antigène, ce qui semble confirmer les observations de Gray (1974) qui trouve d'étroites relations antigéniques entre les isolats de *Trypanosoma gambiense* du Zaïre, Nigeria, Sénégal et Ouganda.

On peut également constater que le nombre de passages sur animaux de laboratoire n'a pas d'influence notable sur les propriétés antigéniques.

3. CONCLUSION.

Les études de nos prédécesseurs, ainsi que nos propres résultats, permettent de dégager les observations suivantes :

— n'importe quelle souche sanguine polymorphe de trypanosome du groupe *brucei* semble convenir comme antigène ;

— on ne peut mettre en évidence que le moment du prélèvement, ainsi que le nombre de passages sur animaux de laboratoire, aient une importance ;

— la concentration d'antigène n'influe pas sur la réaction, sauf dans les cas extrêmes (moins d'un ou plus de 500 parasites par champ) où l'opérateur peut être gêné dans son estimation.

Cette mise au point permet de penser que la qualité de la réaction dépend en fait très peu de l'antigène utilisé, à condition qu'il appartienne au groupe *brucei*.

Le problème de la lecture du test, que nous avons déjà évoqué, est facilement surmonté lorsque l'opérateur travaille en zone d'endémie avec un important matériel biologique à sa disposition. Il peut ainsi répéter les expérimentations jusqu'à ce que son interprétation des tests soit satisfaisante.

Etant donné le faible nombre de variables qui peuvent apparaître dans sa réalisation, la technique de Wery reste donc une méthode de choix dans le diagnostic immunologique de la trypanosomiase.

Toutefois son intérêt serait encore accru si les divers utilisateurs acceptaient de pratiquer la même méthodologie dans la préparation des tests, utiliser le même code de lecture et employer un antigène standardisé. Cette

uniformisation leur permettrait de parler le même langage et pouvoir ainsi comparer leurs résultats.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'O.R.S.T.O.M. le 10 octobre 1978.

BIBLIOGRAPHIE

- AMBROISE-THOMAS (P.), 1974. — La réaction d'immunofluorescence dans l'étude séro-immunologique du paludisme. *Bull. O.M.S.*, 50 : 267-276.
- BAILEY (N.M.), KIMBER (C.D.) et CUNNINGHAM (M.P.), 1967. — The indirect fluorescent antibody technique applied to dried blood samples in the diagnosis of human trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, 61, 5 : 696-700.
- COURTOS (D.) et BIDEAU (J.), 1966. — L'immunofluorescence appliquée au diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. Valeur comparative avec le titrage de l'immunoglobuline Ig M. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 59, 5 : 809-817.
- GRAY (A.R.), 1974. — Antigenic similarities among isolates of *Trypanosoma gambiense* from different countries in Africa. *Trans. Roy. Soc. Méd. Hyg.*, 68, 2 : 150-151.
- LATIF (B.M.A.) et ADAM (K.M.G.), 1973. — Differentiation of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* et *T. gambiense* by the indirect fluorescent antibody test. *Bull. O.M.S.*, 48, 4 : 401-407.
- LUCASSE (Chr.), 1970. — Fluorescent antibody tests applied to serum of patients with gambian Sleeping Sickness. *Trop. géogr. Méd.*, 22 : 227-236.
- SADUN (E.M.), DUXBURY (R.E.), WILLIAMS (J.S.) et ANDERSON (R.I.), 1963. — Fluorescent antibody test for serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in Man. *J. Parasitol.*, 49, 3 : 385-388.
- WEITZ (B.), 1963. — The specificity of Trypanosomal Antigens by immunofluorescence. *J. General Microbiolog.*, 32, 1 : 145-149.
- WERY (M.), WERY-PASKOFF (S.) et VAN WETTERE (P.), 1970. — The diagnosis of human african trypanosomiasis by the use of fluorescent antibody test. 1. Standardisation of an easy technique to be used in mass surveys. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 50, 5 : 613-634.
- WILLIAMS (J.S.), DUXBURY (R.E.), ANDERSON (R.I.) et SADUN (E.H.), 1963. — Fluorescent antibody reactions in *Trypanosoma rhodesiense* and *T. gambiense* in experimental animals. *J. Parasit.*, 49, 3 : 380-384.

L'ANTIGÈNE « TRYPANOSOMA GAMBIENSE » EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

ANNEXES

Les tableaux ont été établis selon le code suivant :

— = négatif
 ++ = douteux
 +++ = positif

Le titre de positivité est donné par la première dilution à fluorescence douteuse. Ex. : ++ 40 se lit : positif jusqu'au 1/40°. La cote +++ 160 signifie que la positivité va au-delà du 1/160°.

TABLEAU I

N° Sérum	Date du prélèvement	Ag I		Ag II		Ag III	
		IFI	Nombre de T. par champ	IFI	Nombre de T. par champ	IFI	Nombre de T. par champ
1	J5	++ 160	- d'1 T	+++ 160	- d'1 T	+++ 160	60 T
	J10	++ 160	500 T	++ 160	25 T	++ 160	400 T
	J15			++ 160	300 T	++ 160	500 T
2	J5	+++ 160	- d'1 T	+++ 160	- d'1 T	+++ 160	60 T
	J10	++ 160	500 T	++ 160	25 T	++ 160	400 T
	J15			++ 160	300 T	++ 160	500 T
3	J5	++ 160	- d'1 T	++ 160	- d'1 T	++ 160	60 T
	J10	++ 160	500 T	++ 80	25 T	++ 80	400 T
	J15			++ 80	300 T	++ 40	500 T
4 Rechute	J5	++ 160	- d'1 T	++ 160	- d'1 T	++ 160	60 T
	J10	++ 160	500 T	++ 80	25 T	++ 80	400 T
	J15			++ 160	300 T	++ 160	500 T
5	J5	++ 160	- d'1 T	+++ 160	- d'1 T	+++ 160	60 T
	J10	++ 160	500 T	++ 160	25 T	++ 160	400 T
	J15			++ 160	300 T	++ 160	500 T
6	J5	+++ 160	- d'1 T	+++ 160	- d'1 T	+++ 160	60 T
	J10	++ 80	500 T	++ 160	25 T	++ 160	400 T
	J15			++ 160	300 T	++ 160	500 T
7	J5	++ 160	- d'1 T	++ 160	- d'1 T	++ 160	60 T
	J10	++ 40	500 T	++ 80	25 T	++ 80	400 T
	J15			++ 80	300 T	++ 40	500 T
8	J5	++ 160	- d'1 T	++ 160	- d'1 T	+++ 160	60 T
	J10	+++ 160	500 T	++ 160	25 T	++ 160	400 T
	J15			++ 160	300 T	++ 80	500 T
9 Témoin	J5	++ 40	- d'1 T	++ 20	- d'1 T	-	60 T
	J10	-	500 T	++ 20	25 T	++ 20	400 T
	J15			++ 20	300 T	++ 20	500 T
10	J5	++ 160	- d'1 T	++ 160	- d'1 T	++ 160	60 T
	J10	++ 40	500 T	++ 40	25 T	++ 40	400 T
	J15			++ 80	300 T	++ 80	500 T

TABLEAU II. — Résultats de la 1^{re} saignée

Sérums	Rat A 2 (15 jours)	Rat B 2 (15 jours)	Rat C 2 (15 jours)
1	+++ 160	++ 160	++ 40
2	+++ 160	+++ 160	++ 80
3	++ 160	++ 160	++ 80
4	++ 160	++ 160	++ 80
5	+++ 160	+++ 160	++ 160
6	+++ 160	++ 160	++ 160
7	++ 160	++ 160	++ 80
8	++ 160	+++ 160	++ 160
9 témoin	++ 20	—	—
10	++ 80	++ 40	++ 40
Nombre moyen de T. par champ	31 T	1 T	240 T

TABLEAU III. — Résultats de la 2^e saignée

N° Sérum	Rat A 1 (30 jours)*	Rat B 2 (25 jours)	Rat B 3 (20 jours)	Rat A 4 (15 jours)
1	+++ 160	++ 160	++ 80	++ 160
2	+++ 160	+++ 160	++ 80	++ 160
3	++ 160	++ 40	++ 160	+++ 160
4	+++ 160	++ 80	++ 160	+++ 160
5	+++ 160	++ 160	++ 160	+++ 160
6	+++ 160	++ 160	+++ 160	+++ 160
7	++ 160	++ 80	++ 80	+++ 160
8	+++ 160	+++ 160	+++ 160	+++ 160
9 témoin	++ 40	++ 20	++ 20	—
10	++ 160	++ 40	++ 160	++ 80
Nombre de T. par champ	50 T	60 T	20 T	2 T

* Le nombre de jours entre parenthèses indique le temps séparant l'inoculation de la saignée.

TABLEAU IV

Souches Sérums	702 A71	724 BB9	604 OB1	32 MOS7	666 MA4	709 OK4
1	++ 160	++ 160	++ 80	++ 160	++ 160	++ 160
2	++ 160	++ 160	++ 160	++ 160	++ 160	+++ 160
3	++ 160	++ 80	++ 80	++ 80	++ 80	++ 80
4	++ 160	++ 80	++ 80	++ 80	++ 80	++ 160
5	+++ 160	+++ 160	++ 160	++ 160	++ 160	+++ 160
6	+++ 160	+++ 160	++ 160	+++ 160	++ 160	+++ 160
7	+++ 160	++ 80	++ 80	++ 80	++ 80	++ 40
8	+++ 160	++ 160	++ 160	+++ 160	+++ 160	++ 160
9 Témoin	++ 20	—	—	++ 20	—	—
10	++ 160	++ 80	++ 80	++ 80	++ 40	++ 80
11 Témoin	—	—	—	++ 20	—	—
12	++ 40	++ 20	++ 40	++ 40	++ 40	++ 40
13	++ 160	++ 80	++ 80	++ 80	++ 80	++ 80
14	++ 160	++ 40	++ 40	++ 80	++ 40	++ 40
Nombre de T. par champ	60 T ϕ	20 T ϕ	160 T ϕ	80 T ϕ	100 T ϕ	50 T ϕ

N.B. Dans la désignation des souches (ex. : 724 BB 9)
 — le premier nombre constitue le numéro du rat : (724);
 — le groupe de lettres, le nom de la souche : (BB);
 — le dernier nombre, le numéro du passage : (9).