

Article original

ANTICORPS ANTI-PfS48/45 DANS LES SERUMS DE DEUX POPULATIONS VIVANT EN ZONE D'ENDEMIE PALUSTRE DE NIVEAUX DE TRANSMISSION DIFFERENTS.

GOUNOUÉ R^{1,2}, LE GOFF G², MULDER B^{2,3}, ROEFFEN W³, VERHAVE JP³, BOUDIN C³

RESUME

La présence d'anticorps antigamète (Pfs48/45) a été recherchée par la technique d'ELISA compétition chez deux groupes de populations vivant en zone d'endémie palustre de niveau de transmission différente (Mbébé : 200 pi/h/an et Ebolowa : 25 pi/h/an). Le pourcentage d'individus possédant les anticorps anti-Pfs48/45 ainsi que les titres moyens obtenus ont été faibles. (7,1% d'individus avec des titres variants de 1/20 à 1/320 à Mbébé et 2,7 % avec des titres de 1/20 à Ebolowa). L'âge moyen d'apparition de ces anticorps était très élevé (37,4 ans). Ces observations indiquent que l'immunité naturelle antigamète (Pfs48/45) serait un phénomène qui s'acquiert très lentement et nécessite plusieurs épisodes palustres.

Mots clés : ELISA compétition, anticorps anti-Pfs48/45, immunité antigamète, Plasmodium falciparum.

INTRODUCTION

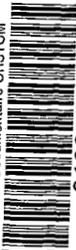
Le gamécyte des Haemosporidae constitue le stade par lequel le plasmodium est transmis de l'hôte vertébré au moustique vecteur. Chez les vertébrés, le gamécyte est localisé dans le cytoplasme du globule rouge. Il est alors relativement à l'abri des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, mais il peut être phagocyté par les macrophages (Sinden et Smalley, 1976) ou être inactivé (incapable de se transformer en gamètes) par les cytokines (Naotunne *et al.*, 1993) et les anticorps (Carter *et al.*, 1988). Après un repas sanguin infectant par un moustique vecteur, le gamécyte subit diverses transformations qui aboutissent à la formation du gamète, du zygote, de l'ookinète dans l'estomac, puis de l'oocyste de l'autre côté de la paroi stomacale et enfin des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

Dans l'estomac du moustique, les antigènes de surface du zygote et de l'ookinète sont exposés au con-

tenu du repas sanguin tel que les phagocytes, les anticorps, les cytokines et les enzymes digestives du moustique. Les antigènes les plus connus sont : le doublet protéique lipophile de 48 et 45 kD (Kumar et Carter, 1984 ; Vermeulen *et al.*, 1985) et la protéine hydrophile de 230 kD (Rener *et al.*, 1983 ; Kumar et Carter, 1984 ; Vermeulen *et al.*, 1985 ; Carter *et al.*, 1990). Ces antigènes forment un complexe à la surface du parasite. Ils sont déjà présents au stade du gamécyte, mais ne sont exprimés à la surface du parasite que plus tard au cours de la gamétogénèse (Vermeulen *et al.*, 1985). La formation du gamète chez le moustique laisse apparaître une troisième protéine lipophile de 25 kD (Kaslow *et al.*, 1991) qui devient prédominante à la surface de l'ookinète. Cette dernière n'existe pas chez le gamécyte. Elle pourrait favoriser la migration de l'ookinète à travers la paroi épithéliale de l'estomac du moustique (Vermeulen *et al.*, 1985 ; Alano, 1991).

Ces antigènes sont intéressants car certains des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre eux bloquent la transmission homme-moustique. Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène Pfs48/45 sont "complément indépendants" ; ils bloquent le processus de fécondation par le microgamète et agissent sur la transformation du zygote en ookinète

1. Département de Biologie et Physiologie animale, Université Yaoundé I, BP 812, Yaoundé, Cameroun.
2. Laboratoire de Recherches sur le Paludisme, ORSTOM/LAF 302/OCEAC, BP 288, Yaoundé, Cameroun.
3. Department of medical parasitology, University of Nijmegen, BP 9101, 6500 HB, Nijmegen, Hollande.



(Vermeulen *et al.*, 1985). Ceux dirigés contre Pfs230 sont "complément dépendants" et agissent par lyse du macrogamète et du zygote (Quakyi *et al.*, 1987). Les anticorps monoclonaux anti-Pfs25 sont aussi indépendants du complément. Ils empêchent la migration de l'ookinète à travers la paroi de l'estomac du moustique (Vermeulen *et al.*, 1986 ; Alano, 1991). Les antigènes Pfs230 et Pfs48/45 existent déjà chez l'hôte humain qui peut donc se sensibiliser contre eux. Les anticorps naturels qui sont sans effet sur le gamétocyte à l'abri dans le globule rouge le deviennent sur le gamète, le zygote et l'ookinète dans l'estomac du moustique. L'antigène Pfs25 n'existe pas chez l'hôte humain, par conséquent aucun anticorps naturel n'est synthétisé contre lui.

Dans notre étude nous avons voulu savoir :

1- A partir de quel âge les individus vivant en zone d'endémie palustre possédaient des anticorps contre les antigènes de stade sexué notamment l'antigène Pfs48/45 ;

2- Si le taux de ces anticorps était fonction du niveau de transmission.

MATERIELS ET METHODE

1. Les sérums

Les sérums sont collectés chez deux groupes de population de tous les âges vivant au Cameroun. Un premier groupe de 183 individus en zone de transmission permanente, avec 200 piqûres infectantes pour l'homme et par an : Mbébé (Robert *et al.*, 1995) et un autre groupe de 179 sujets en zone de moins forte transmission avec 25 pi/homme/an : Ebolowa. Un pool de sérums provenant des donneurs hollandais sans expérience palustre a été utilisé comme contrôle négatif.

Deux sérums prélevés chez des Hollandais ayant vécu en Afrique dans des zones endémiques pendant 30 ans et possédant des anticorps antigamètes ont été utilisés comme contrôles positifs.

2. Les parasites et les monoclonaux

Les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* (souche, NF54/Amsterdam) sont produits dans un système de culture automatique comme décrit par Ponnudurai *et al.* (1986). La gamétogénèse est induite en incubant les gamétocytes matures dans du sérum de veau foetal (SVF) pendant 30 mn à la température ambiante. Les macrogamètes et les zygotes issus de cette gamétogénèse sont solubilisés dans du triton X-114

et un tampon tris-Hcl (10mM tris-Hcl, 150mM NaCl, 1mM phenylméthylsulfonyl fluoré pH7,4) pendant 90mn à 4°C. Les particules insolubles sont enlevées par centrifugation à 40,000 rpm à 4°C pendant 60mn. Le surnageant est placé à 4°C pendant 10mn puis chauffé à 37°C pendant 15 mn pour créer un choc thermique après lequel une autre centrifugation permet de distinguer deux phases : une phase supérieure aqueuse et une phase inférieure détergente. Après séparation des deux phases, l'opération est répétée 3 fois et on obtient à la fin des phases relativement pures. La phase détergente qui contient des protéines lipophiles est utilisée comme source d'antigène Pfs48/45 (Roeffen *et al.*, 1995a). Elle est conservée à -80°C jusqu'à usage.

Le titrage de l'extrait de gamète est déterminé par ELISA avec un anticorps monoclonal 32F3 (Vermeulen *et al.*, 1985).

Les monoclonaux 32F3 et 82F45.3 sont synthétisés comme décrit par Vermeulen *et al.* (1985) et le marquage à la peroxidase de l'anticorps monoclonal 82F43.3 selon la méthode de Wilson et Nakane (1978) in Roeffen *et al.*, 1995a).

3. Le test ELISA compétition

Ce test utilise l'antigène Pfs48/45 mais peut aussi utiliser d'autres antigènes de gamètes selon la technique de préparation. Son principe est basé sur la compétition entre les anticorps antigamètes sériques et l'anticorps monoclonal marqué à la peroxidase pour la fixation sur un même épitope de l'antigène Pfs48/45.

Les puits des plaques de microtitration (Greiner®) sont sensibilisés pendant 60 mn avec 50 µl d'anticorps monoclonal (32F3) dilué dans du PBS (10 µg/ml). Cet anticorps monoclonal est dirigé contre l'épitope I et servira à accrocher l'antigène sur la plaque. Les puits sont lavés 3 fois pour éliminer l'excès de monoclonal. Les espaces non occupés par le monoclonal sont ensuite saturés avec 150 µl de SVF à 5% pendant 30 mn. Après 3 lavages avec du PBS, les puits sont incubés pendant 2 heures avec 50 µl d'antigène Pfs 48/45 dilué dans du PBST-20/0,2% SVF, contenant un équivalent de 150000 parasites. L'antigène se fixe au monoclonal par son épitope I. Les puits sont ensuite lavés 3 fois pour éliminer l'excès d'antigène et incubés avec un mélange de 25 µl de sérum à tester et 25 µl de l'anticorps monoclonal marqué (82F45.3-po). Ce monoclonal est spécifique

de l'épitope III de l'antigène Pfs48/45. Les puits sont lavés 4 fois puis incubés avec le substrat TMB. La réaction est stoppée avec H₂SO₄ (4N) et la coloration est lue à 450nm.

Les échantillons sont dilués du 1/20 au 1/1280 dans du PBST-20/0,2% SVF. Si le sérum à tester contient des taux élevés d'anticorps naturels anti-Pfs48/45, on observe peu de fixation du monoclonal marqué donc une faible coloration dans les puits. Le titre de l'anticorps sérique est défini comme étant la dilution du sérum à tester qui donne la même valeur de densité optique (D.O) que la moyenne du control négatif (Graves *et al.*, 1988).

Un sérum est considéré comme positif quand le titre est ≥ 20 (Roeffen *et al.*, 1995a).

4. Analyses et Statistiques

Nous avons comparé les moyennes géométriques des réponses des anticorps entre Mbébé et Ebolowa. Les deux échantillons ayant une distribution par âge différente, et l'âge intervenant sur les taux d'anticorps (facteurs de confusion), il était important de standardiser sur l'âge avant de comparer. Nous avons comparé les différences des deux moyennes (Mbébé-Ebolowa) à zéro après standardisation sur l'âge (Lelouch et Lazar, 1974).

Dans le cas de la prévalence, nous avons fait un χ^2 de Mantel-Haenszel (Lelouch et Lazar, 1974).

RESULTATS

Le test ELISA compétition avec l'antigène Pfs48/45 a permis de détecter et de quantifier les anticorps spécifiques antigamètes dans les sérums de deux groupes d'individus vivant dans des zones d'endémie palustre : Mbébé et Ebolowa.

Tableau I

Pourcentage d'apparition d'anticorps anti-Pfs48/45 dans la population de Mbébé et Ebolowa.

Titres	Prévalence des sérums positifs %	
	Ebolowa (n = 179)	Mbébé (n = 183)
0	97,2	92,9
1/20	2,8	3,9
1/40	-	2,2
1/80	-	0,5
1/160	-	0
1/320	-	0,5

Le pourcentage d'individus possédant des anticorps antigamètes est de 7,1 % à Mbébé et seulement de 2,7 % à Ebolowa. Les titres d'anticorps varient de 1/20 à 1/320 à Mbébé et ne dépassent pas 1/20 à Ebolowa. Cependant, l'analyse statistique ne montre pas de différence significative entre les moyennes des deux populations après standardisation sur l'âge ($p=0,92$). La moyenne d'âge des individus qui apparemment ne possèdent pas d'anticorps antigamètes est de 25,6+18,5 ans et celle des répondeurs est de 37,4+26,2 ans. Le test non paramétrique de MANN-WHITNEY montre une différence significative entre les moyennes d'âge des individus non répondeurs et répondeurs. ($p=0,005$).

DISCUSSION

Cette étude a permis de détecter des anticorps antigamètes dans les sérums de deux populations (Mbébé et Ebolowa) de niveau de transmission très différent.

Les titres moyens d'anticorps entre Mbébé (200 pi/h/an) et Ebolowa (25 pi/h/an) n'ont pas été significativement différents, mais l'échantillon des positifs était faible. On a remarqué que la totalité des sujets positifs avait des taux d'anticorps égal à 1/20 à Ebolowa et de 1/20 à 1/320 à Mbébé.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'individus possédant des anticorps antigamètes est très faible dans les deux groupes (7,1 % à Mbébé, et 2,7 % à Ebolowa). D'autre part l'âge moyen auquel on observe l'apparition des anticorps antigamètes est très élevé (37,4 ans) ce qui contraste avec l'âge classique d'apparition des anticorps contre les formes asexuées (vers 4 ans). Ces deux observations montrent que l'acquisition naturelle des anticorps antigamètes (Pfs48/45) serait probablement très lente et nécessite une longue expérience palustre.

Des études antérieures, (Quakyi *et al.*, 1989 ; Carter *et al.*, 1989 ; Riley *et al.*, 1990) ont montré qu'avec la technique de Western Blot ou d'immunoprécipitation, très peu d'individus donnaient une réponse positive contre l'antigène Pfs48/45. Parallèlement, Graves *et al.* (1988) observent en ELISA compétition avec des sérums d'adultes immuns vivant en région hyperendémique de Nouvelle Guinée, qu'une majorité de sérums donne des réponses positives contre les antigènes des stades asexués alors que très peu répondent à ceux des formes sexuées, particulière-

ment l'antigène Pfs48/45.

Les mécanismes de cette réponse immune tardive sont encore hypothétiques.

Pour être reconnu par le système immunitaire, un micro-organisme doit généralement être phagocyté et le macrophage doit présenter un antigène « digéré » à sa surface. S'il rencontre un lymphocyte T helper sensibilisé (porteur du récepteur pour l'antigène), seule l'association de l'antigène digéré (sur le macrophage) avec le récepteur antigénique (sur le lymphocyte) et le complexe moléculaire HLA strictement complémentaire pourra stimuler le lymphocyte. Donc le retard de réponse immune peut s'expliquer :

- soit par la rareté de présentation par le macrophage d'un antigène gamétocytaire immunogène ;
- soit par l'absence de complémentarité structurelle entre le complexe HLA et l'antigène (Carter *et al.*, 1988 ; Targett, 1988 ; Riley *et al.*, 1990). Mais Targett (1992), Carter et Mendis (1992), Riley *et al.* (1994) ne confirment pas cette hypothèse en travaillant avec des jumeaux homozygotes.

D'autres hypothèses peuvent être envisagées :

- les anticorps contre les gamètes ou les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* auraient une durée de vie très courte, comme dans *Plasmodium vivax* où la mémoire immunologique de l'agression est inexistante ou faible car liée à des lymphocytes T circulants et sensibilisés de courte durée de vie (Carter et Mendis, 1992).

- il peut exister une compétition entre les antigènes des stades asexués et ceux des stades sexués. Les formes asexuées sont extrêmement nombreuses et quasi permanentes chez l'individu vivant en zone d'endémie. Ce système immunitaire est donc en permanence inondé par les antigènes des stades asexués qui monopolisent les différents mécanismes de défense. Dans ce contexte de saturation, les antigènes des stades sexués, probablement plus rares, n'arrivent pas à stimuler le système immunitaire (Carter et Mendis, 1992).

- on sait que l'une des difficultés d'installation de l'immunité de protection dans le paludisme est vraisemblablement la variation antigénique. Le parasite est capable de changer rapidement son manteau antigénique sous la pression du système immunitaire spécifique. En face de ces nouveaux antigènes, l'organisme met un certain temps pour le reconnaître et

dès que les mécanismes de défense deviennent efficaces, le parasite change à nouveau son manteau antigénique (Smith *et al.*, 1995). Ce phénomène bien que très limité existe aussi pour les antigènes de gamétocytes et de gamètes, du moins pour les antigènes qui ont été déjà étudiés (230kD et 48/45kD). Ce processus permet au parasite d'échapper à la pression immune de l'hôte (Graves *et al.*, 1985). Cette variation n'a pas été observée pour l'antigène de 25kD, puisqu'il n'est pas exprimé chez l'hôte humain (Kaslow *et al.*, 1989).

- il est aussi important de signaler que la réactivité immunologique des anticorps monoclonaux contre les épitopes de l'antigène 48/45kD est dépendant de la structure tertiaire de la protéine, et probablement des hydrates de carbone qui contribuent à la formation de l'épitope comme ceci a été montré pour les protéines des parasites du stade asexué de *P. falciparum* (David *et al.*, 1988 ; Kemp *et al.*, 1986). La faible réponse immunologique pourrait être due à un effet combiné de la modification et du clivage des hydrates de carbone dans l'épitope de l'antigène Pfs48/45.

- le système immunitaire de l'enfant pourrait être constitutionnellement incapable de développer une réponse immune contre les antigènes de gamétocytes (Baird, 1995).

Enfin, avant de parler d'une défection du système immunitaire, il faut garder en mémoire que le test de dépistage des anticorps anti-gamétocytes ou gamètes pourrait manquer de sensibilité. Ceci pourrait être le cas notamment pour les tests d'immunoprécipitation et d'immuno blot, classiquement peu sensibles. Mais ceci n'est probablement pas le cas de l'ELISA jugée très sensible (Roeffen *et al.*, 1995b). En outre, ce test semble avoir une valeur prédictive de l'activité bloquant la transmission « Homme-moustique » (Roeffen *et al.*, 1995b).

CONCLUSION

Dans notre étude, nous avons testé un seul épitope (épitope III) de l'antigène Pfs48/45. D'autres épitopes existent, et des anticorps spécifiques peuvent être détectés en utilisant des monoclonaux différents. Certains monoclonaux dirigés contre les épitopes I, III et V sont bloquants ou inhibiteurs de la transmission de l'homme au moustique en expérimentation. On peut donc espérer que ces anticorps puissent refléter le pouvoir naturellement

bloquant du sérum sur la transmission Homme-moustique et intervenir dans la mise au point du vaccin "anti transmission".

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Alano P. Plasmodium sexual stage antigens. *Parasitology Today* 1991 ; 8 : 199-203.
- 2- Baird JK. Host age a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* 1995 ; 11 : 105-11.
- 3- Carter R, Kumar N, Quakyi I, Good M, Mendis K, Graves P, Miller L. Immunity to sexual stages of malaria parasites. *Prog Allergy* 1988 ; 41 : 193-214.
- 4- Carter R, Graves P, Creaney A, Byrne K, Read D, Alano P, Fenton B. *Plasmodium falciparum* : An abundant stage-specific protein expressed during early gametocyte development. *Exp parasitol* 1989 ; 69 : 140-9.
- 5- Carter R, Graves P, Keister DB, Quakyi IA. Properties of epitopes of Pfs48/45, a target of transmission blocking monoclonal antibodies on gametes of different isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasit Immunol* 1990 ; 12 : 587-603.
- 6- Carter R, Mendis K. Transmission immunity in malaria - Reflections on the underlying immune mechanisms during natural infections and following artificial immunization. *Mem Inst Oswalcz* 1992 ; 87 : 169-73.
- 7- David PH, del Portillo HA, Mendis KN. *Plasmodium vivax* malaria : Parasite biology defines potential targets for vaccines development. *Biol Cell* 1988 ; 64 : 251-60.
- 8- Graves PM, Carter R, Burkot TR, Rener J, Kaushal DC, Williams JL. Effects on transmission blocking monoclonal antibodies on different isolates of *Plasmodium falciparum*. *Inf Immun* 1985 ; 48 : 611-6.
- 9- Graves PM, Wirtz RA, Carter R, Burkot TR, Looker M, Targett GAT. Naturally occurring antibodies to an epitope on *Plasmodium falciparum* gametes detected by monoclonal antibody-based competition enzyme-linked immunosorbent Assay. *Infect immunit* 1988 ; 56 : 2818-21.
- 10- Kaslow DC, Quakyi IA, Keister DB. Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1989 ; 31 : 283-8.
- 11- Kaslow DC, Isaacs SN, Quakyi IA, Gwadz RW, Moss B, Keister DB. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Science* 1991 ; 252 : 1310-2.
- 12- Kemp DJ, Coppel RL, Stahl HD, Bianco AE, Corcoran LM, McIntyre P, Langford CJ, Favaloro JM, Crewther PE, Brown GV, Mitchell GF, Culvenor JG, Anders RF. Genes for antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 1986 ; 91 : S83-S108.
- 13- Kumar N, Carter R. Biosynthesis of the target antigens of antibodies blocking transmission of *Plasmodium falciparum*. *Mol biochem parasitol* 1984 ; 13 : 333-42
- 14- Lellouch J, Lazar P. Méthodes statistiques en expérimentation biologique. Ed Flammarion Méd. Sciences 1974.
- 15- Naotunne T de S, Karunaweera ND, Mendis KN, Carter R. Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependant on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. *Immunology* 1993 ; 78 : 555-62.
- 16- Ponnudurai T, Lensen AHW, Meis JFGM, Meuwissen JHETH. Synchronisation of *Plasmodium falciparum* gametocytes using an automated suspension culture system. *Parasitology* 1986 ; 93 : 263-74.
- 17- Quakyi IA, Carter R, Rener J, Kumar N, Good MF, Miller LH. The 230-kDa Gamete Surface Protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission blocking antibodies. *J Immunol* 1987 ; 139 : 4213-7.
- 18- Quakyi IA, Otoo LN, Pombo D, Sugars LY, Menon A, DeGroot AS, Johnson A, Alling D, Miller LH, Good MH. Differential non-responsiveness in humans of candidate *Plasmodium falciparum* vaccine antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1989 ; 41 : 125-34.
- 19- Rener J, Graves PM, Carter R, Williams JL, Burkot TA. Target antigens of transmission blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* 1983 ; 158 : 976-81.
- 20- Riley EM, Ong CSL, Olerup O, Eida S, Allen SJ, Bennett S, Anderson G, Targett GAT. Cellular and humoral immune responses to *Plasmodium*

- falciparum* Gametocyte Antigens in Malaria-Immune Individuals. Limited Response to the 48/45-kD Surface Antigen does not appear to be due to MHC Restriction. *J Immunol* 1990 ; 144 : 4810-6.
- 21- Riley EM, Williamson KC, Greenwood BM, Kaslow DC. Human immune recognition of recombinant protein representing discrete domains of the *Plasmodium falciparum* gametes surface protein, Pfs230. *Parasit Immunol* 1994 ; 17 : 11-9.
- 22- Robert V, Le Goff G, Essong J, Tchinkam T, Fass B, Verhave JP. Detection of falciparum malarial forms in naturally infected anophelines in cameroon using a fluorescent anti-25kD monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; 52 : 366-9.
- 23- Roeffen W; Lensen T, Mulder B, Teelen K, Sauerwein R, Van Druten J, Eling W, Meuwissen JHETH, Beckers PJA. A comparison of transmission blocking activity with reactivity in *plasmodium falciparum* 48/45 kD Molecule-Specific Competition ELISA. *Am J Trop Med Hyg* 1995a ; 52 : 60-5.
- 24- Roeffen W, Beckers PJA, Teelen K, Verhave JP, Eling W, Sauerwein R. Comparison of serological tests and bio-assay for malaria transmission blocking capacity in field sera. *Parasitology* 1995b ; 35 : 95-7.
- 25- Sinden RE, Smalley ME. Gametocytes of *Plasmodium falciparum*: phagocytosis by leucocytes *in vivo* and *in vitro*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1976 ; 70 : 344-5.
- 26- Smith JD, Chitnis EC, Craig GA, Roberts JD, Taylor-hudson ED, Person SD, Pinches R, Newbold IC, Miller HL. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995 ; 82 : 101-10.
- 27- Targett GAT. *Plasmodium falciparum*: Natural and experimental transmission blocking immunity. *Immunol Lett* 1988 ; 19 : 235-40.
- 28- Targett GAT. Virulence and the immune response in malaria. (Review) *Mem Inst Oswal Cruz* 1992 ; 87 : 137-44.
- 29- Vermeulen AN, Ponnudurai T, Beckers PJA, Verhave JP, Smits MA, Meuwissen JHETH. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med* 1985 ; 162 : 1460-76.
- 30- Vermeulen AN, Van deursen J, Brakenhoff RH, Lensen THW, Ponnudurai T, Meuwissen JHETH. Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in gametocyte cultures. *Mol Biochem Parasitol* 1986 ; 20 : 155-63.