

# ETUDE DES SEROLOGIES PALUSTRES EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE CHEZ DES ENFANTS DE LA REGION DE TANANARIVE 1987

par

J.P. LEPERS, M.D. ANDRIAMANGATIANA-RASON, J.A. RAMANAMIRIJA  
P. COULANGES

## RESUME

Les auteurs ont étudié par une technique simplifiée d'immunofluorescence indirecte, la répartition des anticorps antipaludéens chez des enfants scolarisés dans des villages au alentours de la capitale TANANARIVE.

Sur les 639 sérums étudiés, 80 p. 100 présentent des anticorps décelables en immunofluorescence.

Ce test confirme les indices paludométriques classiques.

Il existe à la fois une augmentation du nombre des sérums positifs et une augmentation du taux des anticorps dans les tranches d'âge les plus élevées.

## INTRODUCTION

La réapparition et l'extension du paludisme depuis quelques années sur les Hauts Plateaux de Madagascar constituent un grave problème de Santé Publique et nous ont conduits à étudier les défenses immunitaires des habitants de ces régions longtemps indemnes puisque déclarées « zone de surveillance » après les campagnes d'éradications successives réalisées à partir de 1949.

Dans le cadre d'une étude à long terme sur ce problème le laboratoire du Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar a tenté par une technique simplifiée d'immunofluorescence d'évaluer le degré immunitaire de ces populations proches de la capitale.

## I. MATERIEL ET METHODES

### 1. LES POPULATIONS ETUDIEES

a) En Janvier 1987, l'étude a porté sur une région à proximité de l'aéroport d'Ivato, à 25 km au Nord de Tananarive. Là ont été recueillis 431 sérums au cours d'une enquête active menée auprès des populations d'âge scolaire.

b) En Mars 1987, toujours dans le cadre d'un dépistage actif dans les écoles, il a été recueilli 208 sérums à Manarintsoa, petit village situé à 20 km au Sud-Ouest de la capitale et à environ 35 km du précédent.

Ces deux villages sont situés sur les Hauts Plateaux malgaches et bénéficient du climat tropical d'altitude avec une saison chaude et humide de Novembre à Avril et une saison « fraîche » de Juin à Octobre. Pendant cette dernière, le niveau de

transmission est très faible puisque les températures nocturnes avoisinent 5° C et sont néfastes au développement des anophèles vecteurs. Pendant la saison chaude, le paludisme règne sur un mode épidémique avec des indices parfois élevés. Mais il existe une différence entre ces régions :

Ainsi au moment de notre étude, les indices paludométriques dans la population prélevée sont beaucoup plus faibles à IVATO qu'à MANARINTSOA (8).

à MANARINTSOA : I.S. = 57 p. 100 I.P. = 62 p. 100

à IVATO : I.S. = 27 p. 100 I.P. = 19 p. 100

Les raisons de ces différences sont analysées par ailleurs (4, 5).

Dans les deux cas, nous estimons avoir examiné 90 p. 100 des effectifs des écoles visitées. A IVATO, nous avons pu prélever un échantillonnage représentatif des enfants en bas âge et préscolarisés. A MANARINTSOA, nous avons dû nous contenter des élèves présents des deux écoles.

Le tableau 1 résume la répartition géographique des prélèvements en fonction de l'âge.

## 2. ENQUETES EPIDEMIOLOGIQUES

Les dépistages actifs ont été réalisés sur le terrain. Chaque enfant a subi une visite médicale complète avec prise de température, recherche d'une splénomégalie et frottis sanguin, lu immédiatement après coloration rapide (DIFF QUICK). La parasitémie est établie par observation de 10000 hématies. Par ailleurs, la plupart ont subi un prélèvement sanguin sur tube sec pour recueil du sérum.

## 3. SEROLOGIE

La sérologie s'est effectuée en Immunofluorescence indirecte selon la technique classique de SULTZER (6).

L'antigène est constitué d'hématies humaines parasitées par *Plasmodium falciparum* provenant de deux malades. L'un de la région d'IVATO, l'autre de MANARINTSOA, chaque souche a servi à tester les sérums de la région correspondante.

Le sang, fraîchement recueilli sur anticoagulant est ensuite lavé cinq fois en tampon PBS (pH 7,2). Les hématies sont remises en suspension et réparties selon la technique de la goutte épaisse dans les cupules des lames pour immunofluorescence. Après séchage, elles sont conservées à moins 80° C jusqu'à utilisation. La maturation en culture pour obtenir un maximum de schizontes n'a pu être réalisée mais l'antigénicité de chaque lot a été testée avec un sérum positif au 1/4000ème fourni par l'Institut de Médecine et d'Epidémiologie Tropicale (Hôpital Claude Bernard à Paris).

Pour chaque sérum est établie une dilution de raison 4 et seules les dilutions au 1/64, au 1/256, au 1/1024 et au 1/4096 sont mises en contact avec l'antigène.

La dilution de 1/64 est celle qui est habituellement retenue comme seuil de positivité.

La révélation de la fixation des anticorps utilise le sérum anti Ig (GAM) chaînes H et L de Diagnostic Pasteur dilué en PBS au 1/100 additionné de bleu d'Evans comme contre colorant à la dilution finale de 1/10000.

La lecture s'est effectuée au microscope à fluorescence LEITZ et chaque série a été contrôlée par les témoins positifs et négatifs habituels (Témoin conjugué et témoin sérum négatif).

Pour chaque tranche d'âge, la moyenne géométrique de l'inverse des dilutions a été calculée. Le G.M.R.T. ou Geometrical Mean Reciprocal Titer est donné par la formule suivante :

$$\text{GMRT} = \text{antilog} \left[ \frac{F (\log x)}{N} \right]$$

F : nombre de sérums qui ont respectivement donné chacun des titres observés.

x : Inverse des différents titres d'anticorps

N : nombre total d'examen.

## II. RESULTATS

### 1. RESULTATS GLOBAUX

Au total 639 sérums ont été étudiés par cette méthode et 512 sont positifs soit 80 p. 100.

Le tableau 2 détaille les résultats des dilutions et selon les tranches d'âge avec pour chacune d'elles l'indication du G.M.R.T.

Le tableau 3 indique le nombre et le pourcentage des sérums positifs en fonction des tranches d'âge.

### 2. RESULTATS PAR REGION

a) A IVATO, en Janvier 1987 sur 431 sérums prélevés, 329 se sont révélés positifs, soit 76,5 p. 100.

b) A MANARINTSOA, (tableau 5) en Mars 1987, 183 sérums sont positifs sur 208 prélevés, soit 88 p. 100.

Dans cette région, intervenant à l'époque pour des raisons épidémiologiques, il ne nous a pas été possible de prélever un échantillonnage de sujets identiques à celui d'IVATO. La comparaison entre les deux villages n'est donc statistiquement pas possible mais les différences des taux de positivité sont certainement en rapport avec les différences des indices paludométriques classiques cités plus haut.

### 3. RESULTATS COMPARATIFS

Il nous a paru intéressant de comparer à titre indicatif, les pourcentages de positivité pour chaque dilution de sérum avec calcul des écarts-types dans chaque village et de résumer ces résultats dans les histogrammes 1 (Manarintsoa) et 2 (Ivato) du graphique 4.

## III. COMMENTAIRES

La présence d'anticorps fluorescent chez un individu est un moyen de diagnostic rétrospectif du paludisme. Mais son intérêt en zone d'endémie est que ce test constitue un excellent indicateur du degré d'impaludation d'une population donnée. En effet, les anticorps fluorescents persistent un certain temps et sont de toutes façons entretenus par les infestations successives, avec augmentation des titres.

L'accumulation d'anticorps antipalustres au sein d'une collectivité est donc fonction de l'endémicité. Le taux des anticorps croît avec l'âge et reflète l'intensité des contacts entre l'Homme et le Parasite (1, 2).

La détection des anticorps fluorescents est simplement le témoignage du contact de l'hématozoaire avec le système immunitaire d'un individu et ne signifie en aucun cas la présence d'anticorps protecteurs.

L'étude des résultats sur les Hauts Plateaux confirme ces données et peut se faire de façon quantitative ou qualitative.

## 1. AU PLAN QUANTITATIF

Le tableau 3 met bien en évidence l'augmentation du nombre des sérologies positives en fonction de l'âge.

Les répartitions observées diffèrent significativement entre elles au risque  $\alpha < 0,005$  (test du  $X^2$ ).

Le nombre maximum de sérums positifs se trouve dans chaque tranche d'âge de 8 à 9 ans. Il baisse ensuite sans qu'un biais particulier ait pu être mis en évidence. Quel est le rôle du développement récent de l'épidémie sur les Hauts Plateaux dans cette observation?

## 2. AU PLAN QUALITATIF

Le tableau 2 où les répartitions observées diffèrent également entre elles au risque  $\alpha < 0,001$  met bien en évidence l'augmentation du taux des anticorps avec l'âge des sujets prélevés avec toujours une baisse discrète dans la tranche d'âge de 10 à 15 ans.

Il en est de même de l'histogramme 4 qui, à titre purement indicatif, montre la différence qui existe entre les deux régions avec une nette importance des taux sériques les plus élevés à MANARINTSOA. Dans ce village, les chiffres trouvés sont très proches de ceux observés en 1982 sur la Côte Est de Madagascar (3).

## CONCLUSION

L'étude de la présence d'anticorps fluorescents antipaludéens est intéressante à divers degrés.

Elle étaye et complète les études paludométriques classiques.

Elle confirme la répétition des agressions parasitaires qui augmentent à la fois le taux des séropositivités et le taux des anticorps chez les sujets les plus âgés.

En fait leur étude est très intéressante au plan épidémiologique mais totalement insuffisante quant à l'appréciation de la présence d'anticorps protecteurs.

Ce travail a bénéficié d'une aide de la Tropical Pathology Society.

## BIBLIOGRAPHIE

1. C. BOUDIN, D. BAUDON, R. DEVAUCOUX : Les relations hôte parasite dans l'infection paludéenne. *Etudes Médicales*, Juin 1984, n° 2, 91-104.
2. P. CARNEVALE, D. BAUDON et coll. : Evaluation épidémiologique des paludismes. *Etudes Médicales*, Juin 1984, n° 2, 107-115.
3. Laurent GAUFROY : Enquête séro-épidémiologique par immunofluorescence indirecte sur le paludisme dans la plaine côtière de l'Est de Madagascar. Relation avec les splénomégalies. Thèse 1982. Université Paris Val de Marne. Faculté de Médecine de Créteil.
4. J.P. LEPERS, J.A. RAMANAMIRIJA, M.D. ANDRIAMANGATIANA-RASON, P. COULANGES : Données récentes sur l'épidémiologie du paludisme et sur la répartition des espèces plasmodiales à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1987, 54, 1.
5. J.P. LEPERS, J.A. RAMANAMIRIJA, M.D. ANDRIAMANGATIANA-RASON, P. COULANGES : Le paludisme dans un village des Hauts Plateaux malgaches en 1987. Etat actuel de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine. Etude *in vitro*. Quelques données épidémiologiques. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1987, 54, 1.
6. A.J. SULZER, Marianna WILSON and Elmer C. HALL : Indirect fluorescent antibody for parasitic diseases. *Am. Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1969, vol. 18, n° 2, 199-205.
7. P. DRUILHE : Intérêt des nouveaux tests immunologiques appliqués à l'étude de l'épidémiologie du paludisme humain. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 1985, 65, suppl. 2, 223-233.
8. Rapport Institut Pasteur de Madagascar, N° 9 du 05/01/87 — n° 555 du 18/03/87. Rapport au Ministère de la Santé.

TABLEAU I

Répartition des sujets prélevés par âge

	NORD-IVATO	MANARINTSOA	TOTAL
0 à 23 mois	31	0	31
2 à 7 ans	161	20	181
8 à 9 ans	123	47	170
10 ans et plus	116	141	257
TOTAL	431	208	639

TABLEAU II

Résultats sérologies – Population globale

	0 à 23 mois	2 à 7 ans	8 à 9 ans	10 à 15 ans	TOTAL
SEROLOGIES NEGATIVES	18	43	19	47	127
1/64	6	44	36	39	125
1/256	4	30	32	44	110
1/1024	2	30	41	52	125
1/4096	1	34	42	75	152
TOTAL	31	181	170	257	639
GMRT	9	104	284	223	164

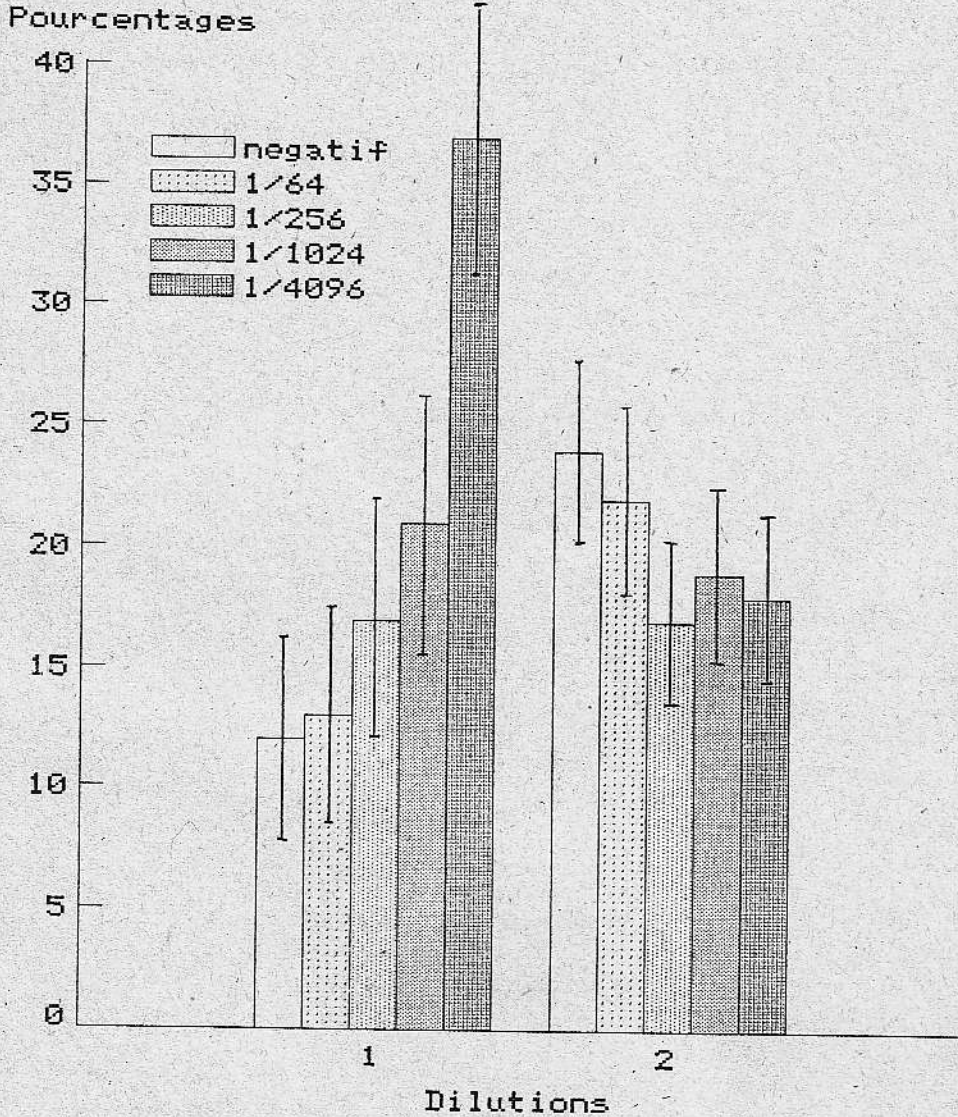
TABLEAU III

Nombre et pourcentage des sérums positifs  
en fonction des tranches d'âge

	NEGATIF	POSITIF	% POSITIF
0 à 23 mois	18	13	42%
2 à 7 ans	43	138	76%
8 à 9 ans	19	151	89%
10 à 15 ans	47	210	82%
TOTAL	127	512	80%

GRAPHIQUE 4

HISTOGRAMMES COMPARATIFS  
SEROLOGIES DE MANARINTSOA ET IVATO



1/ MANARINTSOA

2/ IVATO