

REVISIONES

ANTIGENOS EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS INMUNODIAGNOSTICAS PARA DETECTAR ANTICUERPOS DE MALARIA

R. L. BEAUDOIN,* J. M. RAMSEY,** N. D. PACHECO,*** C. A. ESPINAL****

La serología en malaria se emplea de rutina para: 1) evaluar las áreas maláricas en estudios epidemiológicos; 2) confirmar por laboratorio los casos sospechosos en los cuales no se ha podido definir un diagnóstico por el estudio de la gota gruesa y extendidos de sangre periférica, y 3) el control de potenciales donantes de sangre. Históricamente, en cada una de estas variables, las pruebas se han aplicado para detectar o estimar los anticuerpos maláricos que, cuando están presentes, se encuentran con frecuencia en relativos bajos niveles; por lo tanto, en el desarrollo de pruebas serológicas para malaria se ha hecho énfasis en el hallazgo de técnicas de alta sensibilidad, minimizando la atención puesta a la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo.

La siguiente revisión no incluye la evaluación de prueba alguna y se restringe a considerar las preparaciones antigénicas

empleadas como reactivos en la detección de anticuerpos antimaláricos. La especificidad alcanzada en cualquiera de las pruebas es función principal de los antígenos seleccionados y por ello, la discusión se centra en la factibilidad y aplicabilidad de las preparaciones antigénicas utilizadas en cada una de ellas. Las pruebas en sí mismas han sido discutidas recientemente por Voller y Houba (1) y descritas detalladamente en el memorando de WHO, "Serological Testing in Malaria" (2). No se incluyen discusiones sobre nuevas estrategias serológicas para detectar parásitos, antígenos circulantes ni complejos inmunes en la sangre.

1. *Técnicas de Anticuerpos por Fluorescencia Indirecta (IFA):*

Debido a que esta prueba emplea como antígeno el parásito intracelular, es actualmente la más especie-específica dentro de las que seleccionan como antígeno al pará-

* Jefe, Malaria Vaccine Program, Immunoparasitology Branch, Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland 20814 U. S. A.

** Microbióloga, Malaria Vaccine Program, Immunoparasitology Branch, Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland 20814 U. S. A.

*** Bióloga, Malaria Vaccine Program, Immunoparasitology Branch, Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland 20814 U. S. A.

**** Jefe de la Unidad de Inmunología de Malaria, Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

NOTA: Este trabajo fue auspiciado por el "Naval Medical Research and Development Command, Work Unit No. MF 58.524.009.0095". Las aseveraciones y opiniones aquí expresadas son privativas de los autores y no deben considerarse como oficiales o reflejo de los puntos de vista del "U. S. Navy Department" o del Servicio Naval en general.

sito homólogo. La técnica de IFA es considerada por lo general como el patrón de comparación cuando se valoran otras pruebas (3). El antígeno es colocado en forma de extendido o gota gruesa de sangre parasitada rica en esquizontes, el cual es el estadio más reactivo del parásito. La sangre infectada obtenida de un paciente con *Plasmodium falciparum* requiere de un período corto de incubación a partir de la sangría para alcanzar la maduración, por cuanto en la sangre periférica sólo circulan trofozoitos jóvenes (anillos).

Una de las fuentes obvias de parásitos para la preparación del antígeno es entonces un individuo infectado con las formas sanguíneas circulantes de una especie apropiada de *Plasmodium*. No obstante, esta fuente representa un serio problema para los laboratorios localizados en áreas de baja endemicidad por cuanto requiere del acceso a pacientes clínicamente enfermos. Como fuente sustitutiva pueden emplearse primates del género *Aotus trivirgatus* infectados con una cepa adaptada de cada una de las especies del parásito; sin embargo, los *Aotus* son demasiado costosos y difíciles de conseguir. Por otra parte, los cultivos *in vitro* de estadios eritrocíticos del parásito, constituyen una atractiva fuente alterna para los laboratorios que no tienen acceso a infecciones activas (4). Desafortunadamente, el desarrollo de este sistema está restringido en el presente al *P. falciparum*, aun cuando existe un informe preliminar sobre el cultivo de *P. vivax* (5).

El mantenimiento del cultivo *in vitro* del *P. falciparum* y la producción continua de formas maduras del parásito es un procedimiento sencillo pero laborioso y en ocasiones costoso, limitando su utilización a laboratorios especializados de investigación. Además, no pueden ignorarse las posibilidades de cambios antigénicos en los parásitos mantenidos en cultivos por largos períodos de tiempo. Langreth y sus colaboradores (6) demostraron como algunas cepas mantenidas en cultivo por tiempo prolongado perdían gradualmente el antígeno "knob", presente en las membranas de los glóbulos rojos infectados con trofozoitos maduros o segmentos de *Plasmodium falciparum*.

En ausencia de una fuente conveniente de parásitos humanos, estos se han sustituido con algún éxito por parásitos de simios estrechamente relacionados. Como ejemplos de este tipo de sustitución están *P. fieldi* o *P. cynomolgi bastianelli*, para *P. falciparum* (7, 8); *P. brasilianum* o *P. fieldi*, para *P. malariae* (7) y *P. cynomolgi*, para *P. vivax* (9). Recientemente se ha sugerido (10) la sustitución de *P. falciparum* por *P. berghei*, parásito del ratón, pero esta elección puede ser cuestionable en razón de las considerables diferencias que pueden presentarse en los antígenos de estas dos diferentes especies. No obstante como se ha demostrado en pacientes con múltiples infecciones previas (7), por los datos de tasas de transmisión en malaria (11) y por estudios de evaluación de la sensibilidad de la prueba IFA (12), la sustitución del antígeno homólogo por un heterólogo provee una información valedera aun cuando existe una disminución de la especificidad de especie y de la sensibilidad de la prueba. Además, el empleo de antígenos heterólogos en estudios seroepidemiológicos puede causar dificultades en la interpretación, cuando en un área malarica esta presente más de una especie del parásito.

Con la prueba IFA pueden ocurrir reacciones cruzadas, necesiándose múltiples evaluaciones con preparaciones de cada especie del parásito para definir la especificidad de la reacción. Para reducir estas pruebas múltiples se ha empleado la preparación de un antígeno único, producto de una mezcla de células infectadas con especies diferentes del parásito (13).

En resumen, la principal ventaja de la prueba IFA radica en la especificidad de especie y sensibilidad, ya que se emplea como antígeno al parásito intraeritrocítico intacto. Este tipo de antígeno proporciona los puntos de enlace naturales para inducir los anticuerpos, lo cual lo hace superior a los antígenos preparados con extractos solubles crudos.

Desde el punto de vista técnico, la principal dificultad de la prueba reside en la obtención de una fuente adecuada de antígeno. Tal dificultad puede obviarse, en el

caso de *P. falciparum*, estableciendo una unidad central que produzca el antígeno a partir del cultivo *in vitro*, para distribuirlo a los laboratorios que no cuenten con un sistema apropiado.

Las láminas portaobjeto con las preparaciones de sangre parasitada, pueden secarse al aire y almacenarse durante varias semanas a temperatura ambiente con un desecante, facilitando así su transporte (2). También pueden congelarse y mantenerse almacenados hasta por 12 meses a -70°C (12).

Para otras especies diferentes al *P. falciparum* es imperioso contar con una unidad que tenga acceso a los Aotus, para producir antígeno con destino a los laboratorios dedicados al trabajo de serología en malaria. La centralización de la producción de estas especies es una medida importante para la conservación de los primates, mientras se desarrollan los métodos de cultivo adecuados.

2. Técnica de Hemaglutinación Indirecta (IHA)

En esta prueba la preparación antigénica consiste en eritrocitos adsorbidos con extractos solubles, crudos, de malaria.

La prueba es relativamente sencilla de aplicar aún en condiciones de campo, pero los procedimientos para preparar el antígeno y para adsorber los eritrocitos portadores son complicados y solo pueden ser realizados por laboratorios experimentados. Los detalles para estos procedimientos han sido descritos amplia y adecuadamente (14, 15, 16, 17, 18).

Debe anotarse, sin embargo, que la fuente de los eritrocitos portadores (cordero u hombre "O"), la manera como ellos son tratados (temperatura y tiempo de almacenamiento, tamizado y método de fijación), las especies de *Plasmodium* (*P. knowlesi*, *P. vivax* o *P. falciparum*), la fuente de las células infectadas (mono u hombre), así como el método de extracción del antígeno soluble, pueden afectar, todos, la sensibili-

dad o la especificidad de la prueba, lo que a su vez puede influir en su reproductibilidad. Por esta razón se deben preparar grandes lotes de antígeno que se almacenan liofilizados (19). Debido a que se requieren muy pocas cantidades de antígeno cuando la prueba se lleva a cabo en placas de microaglutinación, un lote de eritrocitos sensibilizados es suficiente, por lo general, para cubrir incluso amplios estudios seroepidemiológicos (20). Sin embargo, en algunos estudios longitudinales de larga duración, como el llevado a cabo durante diez años por Armstrong en Etiopia (21), se han encontrado fallas en la reproductibilidad, debidas a las diferencias de reactividad entre las distintas preparaciones antigénicas. No obstante, hay que resaltar que la relativa poca cantidad de material que se requiere por prueba y la posibilidad de preparar y almacenar grandes lotes, reducen la necesidad de contar con un acceso regular a sangres infectadas para preparar el antígeno, como es el caso de la prueba IFA.

El uso de cultivos eritrocíticos del *P. falciparum* y los métodos más eficientes de separación y aislamiento de parásitos (22, 23), podrán incrementar la uniformidad antigénica con el consecuente aumento en la sensibilidad y especificidad de la prueba. No ha sido investigado convenientemente el impacto que produzca sobre la especificidad de especie el empleo de antígenos heterólogos para la prueba IHA. En los estudios seroepidemiológicos la prueba IHA produce con frecuencia resultados falsos negativos en población infantil y en niños menores infectados, incluso cuando sus sueros reaccionan a altos títulos con la prueba IFA (26). En un esfuerzo para aclarar las razones de tal discrepancia, Bidwell y sus colaboradores (29), empleando el sistema *Plasmodium falciparum*-Aotus, demostraron que el antígeno soluble en la prueba IHA falló en la detección de los anticuerpos inducidos durante la parasitemia. Si estos anticuerpos desarrollados durante la fase inicial de la infección fueron ciertamente detectados por la prueba IFA, es probable que los antígenos empleados en las dos pruebas reaccionen con diferentes anticuerpos.

El empleo de antígenos homólogos, su purificación y la estandarización de los reactivos deben elevar, en forma ponderable, la calidad de la prueba IHA y la interpretación de los datos obtenidos en ella.

Técnicas Inmunoenzimáticas: ELISA
(Enzyme-linked immunosorbent Assay)

Auncuando la mayoría de los reactivos básicos que se requieren para la prueba se consiguen en el comercio, el antígeno debe ser preparado localmente. Brevemente, éste se obtiene preparando un extracto soluble de una sangre altamente infectada. Se sonica la sangre infectada y luego de centrifugarla se retira el sobrenadante, rico en antígeno, para con él cubrir los tubos de polipropileno o las placas de microtitulación (30, 31). La fuente de células parasitadas puede ser un animal infectado (*Aotus* para *P. falciparum* y *Rhesus* para *P. knowlesi*) o cultivos *in vitro* para *P. falciparum* (32). No se ha estudiado adecuadamente la especificidad de especie que tiene la prueba ELISA pero es de esperar que las preparaciones del antígeno soluble crudo no tengan mayor especificidad que la encontrada en la prueba IHA. Por otra parte, los procedimientos para la preparación del antígeno y para el cubrimiento de los tubos o las microplacas son menos complicados que los de la prueba IHA y por lo tanto están sujetos a menos variaciones. Los lotes del antígeno para ELISA pueden prepararse y almacenarse en alícuotas a -70°C, para su posterior empleo en el tamizado de los tubos o las placas. Tanto el ELISA como la técnica IHA requieren mínimas cantidades de antígeno, especialmente cuando se emplean las microplacas.

Ambrose Thomas y sus colaboradores (33), demostraron que los exo-antígenos solubles presentes en el sobrenadante de cultivos de seis horas de merozoitos de *P. falciparum*, pueden ser empleados para preparar las placas para la prueba de ELISA e incluso, que se puede aumentar la especificidad cuando se emplean para detectar las infecciones por esta especie; sin embargo, no se ha determinado la posibilidad de emplear estos exo-antígenos en estudios epidemiológicos. Debe anotarse que la pre-

paración de antígenos específicos de merozoitos requiere excesivas manipulaciones de los cultivos, lo cual puede complicar considerablemente esta tarea. Aún más, es posible que este sistema, por su misma naturaleza, reduzca la sensibilidad de la técnica por que restringe el antígeno reactivo solo a aquellos exo-antígenos liberados por un solo estadio del parásito, en una infección sincrónica.

Técnicas de Difusión en Gel (GDT)

Los antígenos empleados en las pruebas de precipitinas para la serología en malaria, son de origen humano y consisten en dos tipos principales: 1) antígenos placentarios, también utilizados en la IFA, obtenidos por lo general en el momento del parto a partir de placentas altamente parasitadas, (34). 2) antígenos solubles, que circulan libremente en la sangre de personas altamente infectadas (35).

El antígeno placentario, rico en parásitos maduros, se prepara como un filtrado del extracto acuoso, crudo, de placentas maceradas. Por otra parte, el gran número de antígenos solubles que se encuentran libres en el plasma se pueden catalogar claramente en 3 grupos principales: Los antígenos "L", que son termolábiles, destruyéndose a 56°C; los antígenos "R", que son termoresistentes, resisten temperaturas de 56°C pero se destruyen a 100°C y los antígenos "S", que son completamente termoestables, no siendo destruidos a 100°C. Cada uno de estos grupos puede a su vez subdividirse; han sido identificados cuando menos 20 antígenos "S" serológicamente diferentes (35).

Como los antígenos requeridos para la aplicación de la prueba de difusión en gel se obtienen de individuos altamente infectados, en el momento actual su uso está restringido a los laboratorios que tienen acceso a población con infecciones clínicas. Aún más, estos antígenos sólo son empleados para detectar infecciones por *P. falciparum*.

Quando se emplean antígenos solubles plasmáticos, se agrava el problema de un posible exceso de especificidad en la reacción. No todos los antígenos se encuentran a

un mismo tiempo y al parecer pueden presentarse seriadamente según el período de la infección, con inducción de anticuerpos de poca afinidad. Por lo tanto, en la actualidad parece improbable el que se puedan vencer todas las dificultades en la estandarización para establecer el empleo de la prueba en forma general y rutinaria. No obstante, los antígenos "S" podrían usarse para serotipificar las infecciones por *P. falciparum* en diferentes localidades geográficas (36). La comunicación de que pueden obtenerse antígenos solubles de *P. falciparum*, en Aotus infectados (37), hace preveer que se tenga una fuente alterna más conveniente. Sin embargo, esta alternativa de emplear los Aotus para la obtención de antígenos continuará siendo un problema por largo tiempo, dado su costo y dificultad de consecución, como fue enfáticamente discutido el tratar la prueba IFA. El aislamiento de exo-antígenos solubles, detectables por la prueba de ELISA y producidos por cultivo de parásitos (33), sugiere que puede ser viable la producción *in vitro* de los antígenos empleados en las pruebas de precipitación, como la GDT y por lo tanto merecen un estudio más amplio.

Los antígenos placentarios empleados en la prueba GDT pueden prepararse en relativos grandes lotes y son fácilmente almacenables en estado de liofilización (3, 4). También los antígenos solubles "S" son muy estables (38) y fácilmente se congelan y almacenan indefinidamente a -70°C .

Las pruebas de precipitación, son considerablemente menos sensibles que las otras pruebas tratadas. La GDT requiere, por otra parte, soluciones de reactivos más concentrados para obtener el punto final de reacción. Esta prueba es prácticamente descartable por la limitación en los recursos de antígeno y antisueros.

Técnicas de Radioinmunoensayo (RIA)

Las pruebas RIA no han sido empleadas hasta ahora para fines sero-epidemiológicos o sero-diagnósticos, sin embargo, se han comunicado resultados sobre los métodos indirectos, empleando antígenos de malaria adsorbidos en eritrocitos de cordero (39), o en placas de microtitulación (40). Los anti-

genos se preparan como extracto soluble de sangre parasitada y están sujetos a las mismas ventajas y desventajas discutidas para la prueba de ELISA. Como es de esperar, la sensibilidad es alta, pero su especificidad, que depende de la pureza del antígeno, no es mayor que la obtenida con ELISA.

Otras Pruebas

Han sido descritas otras pruebas para detectar anticuerpos contra los parásitos de la malaria; por ejemplo, la aglutinación de células infectadas por esquizontes, así como una variedad de pruebas de crecimiento *in vitro* e inhibición de la reinvasión. Estas fueron desarrolladas para satisfacer requisitos experimentales específicos y no han sido adaptados aún para llenar las necesidades comunes en aplicaciones sero-epidemiológicas o sero-diagnósticas. En su estado actual no son aplicables o son impracticables para un trabajo serológico de rutina.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Los antígenos empleados en las pruebas serológicas para detectar los anticuerpos inducidos por los parásitos de la malaria, se agrupan en dos amplias categorías: 1) parásitos intactos y 2) extractos solubles preparados, bien de homogeneizados de parásitos o bien de productos (exo-antígenos), liberados por el parásito, en el curso de una infección o cultivo. Las mayores fuentes para la preparación de estos antígenos están en los humanos o en los primates no humanos infectados con las apropiadas especies humanas del parásito. La factibilidad de los cultivos de *P. falciparum* y más recientemente de *P. vivax*, están reduciendo considerablemente la dependencia de las infecciones activas en mamíferos, con el fin de proveer los antígenos necesarios para las pruebas serológicas.

Es incuestionable que el primer requisito que debe cumplir una prueba serológica para detectar los anticuerpos en un individuo infectado por parásitos de la malaria es su sensibilidad, porque estos anticuerpos se presentan a menudo en relativos bajos niveles, dentro de la población de individuos

sometidos a estudio. Por otra parte, la especificidad reviste considerable importancia, ya que es ampliamente reconocido que los parásitos de la malaria comparten antígenos con otros agentes infecciosos (V.g. espiroquetas) y, más importante aún entre ellos mismos. Hay cuatro especies diferentes del parásito responsables de la enfermedad clínica en el hombre que requieren de una identificación específica. Como la especificidad de cualquier prueba serológica para detectar anticuerpos no puede ser mayor que la del antígeno usado, se hace imperativo extremar los cuidados para su selección, procesamiento y estandarización. Dentro de las preparaciones antigénicas de uso más corriente, están los eritrocitos intactos parasitados, empleados para la prueba de fluorescencia indirecta, los que pueden dar un alto grado de especificidad de especie con los parásitos humanos homólogos. De igual manera, la identificación de especies por cualquiera de los métodos serológicos no puede hacerse si se emplean antígenos heterólogos derivados de un parásito de simio. Por otra parte, podría emplearse una prueba con reactivos como los de los antígenos "S", que poseen una alta especificidad en su reactividad, pero cuya aplicación generalizada tiene severas limitaciones.

La factibilidad de un sistema para producir *P. falciparum* en cultivos de eritrocitos, provee una fuente de antígenos específicos para esta especie, al igual que la reciente comunicación preliminar sobre el éxito en el cultivo de *P. vivax* (5), parece brindar una adecuada fuente de suministro de este parásito para las pruebas serológicas en el futuro. Deben favorecerse los intentos de cultivar *P. malariae* y *P. ovale*. Una vez identificada una adecuada fuente de parásitos cultivados *in vitro*, queda aún la incognita de su purificación. En un amplio sentido, la purificación incluye el aislamiento del parásito, libre de antígenos extraños y separado por estadíos de evolución (22).

La purificación química de los antígenos específicos, incluida la identificación de los puntos de enlace con sus anticuerpos, parece ser ahora más viable con los nuevos sistemas disponibles, como el uso de los anticuerpos monoclonales (41).

Es indudable que la clave para incrementar la sensibilidad y la especificidad en las pruebas serológicas para detectar anticuerpos de la malaria, depende de la selección de antígenos mejor definidos, más altamente purificados y mejor estandarizados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la señorita Betty Leckey por su asesoría editorial en la preparación del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Voller A and Houba V. Malaria, In : Practical methods in clinical immunology, Vo. 2, Immunologic investigation of tropical parasitic diseases, Edinburgh U.K., Churchill Livingstone, Co. Ed. 19.
2. World Health Organization, Serological testing in malaria. Bulletin of the World Health Organization, 1974; 50: 527.
3. Spencer H C et al. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. II. Comparison with the malaria indirect fluorescent antibody test (IFA). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1979b; 28: 933.
4. Hall CH et al. Cultured Plasmodium falciparum used as antigen in a malaria indirect fluorescent antibody test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1978; 27: 849.
5. Larrouy G et al. A propos de l'obtention par culture *in vitro* de formes intraerythrocytaires de Plasmodium vivax. Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences Serie III: Sciences de la Vie, 1981; 292: 929.
6. Langreth S G et al. Plasmodium falciparum: Loss of knobs on the infected erythrocyte surface after long-term cultivation. Experimental Parasitology, 1979; 48 : 213.
7. Collins W E et al. Fluorescent antibody studies in human malaria IV. Cross-reactions between human and simian malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1966; 15 : 11.
8. Kuvin S F and Voller A. Malarial antibody titres of west Africans, British Medical Journal, 1963; 2 : 477.
9. Tobie J E et al. Fluorescent antibody studies on cross reactions between human and simian malaria in normal volunteers. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1962; 11 : 289.
10. Mier W A and Plekarski G. Zur serodiagnostik der malaria. Plasmodium berghei und P. falciparum als antigen fur den indirekten immunofluoreszenz-test. Immunitat und Infektion. 1979; 7 : 75.
11. Draper C C and Voller A. The epidemiological interpretation of serologic data in malaria. American Journal of Tropical Medical and Hygiene, 1972; 21 : 696.

12. Sulzer A J et al. Indirect fluorescent-antibody test for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1969; 18 : 199.
13. Sulzer A J et al. A multi-species malaria antigen for use in the indirect fluorescent antibody test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1973; 67 : 55.
14. Desowitz R S and Stein B A. A tanned red cell haemagglutination test, using *Plasmodium berghei* antigen and homologous antisera. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1962; 56 : 257.
15. Welde B T et al. An indirect hemagglutination test for malaria using antigen from the lysate of parasitized erythrocytes. *Military Medicine*, 1969; 134 : 1284.
16. Kagan L G. Evaluation of the indirect hemagglutination test as an epidemiologic technique for malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1972; 21 : 683.
17. Neuwissen J H T et al. Studies on various aspects of the indirect hemagglutination test for malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, 1972; 46 : 771.
18. Mathews H M et al. A seroepidemiological study of malaria in the republic of the Philippines by the indirect hemagglutination test. *American Journal of Epidemiology*, 1970; 92 : 376.
19. Neuwissen J H E and Leeuwenberg A D M. Indirect hemagglutination test for malaria with lyophilized cells. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1972; 66 : 666.
20. Farshy D C and Kagan I G. Use of stable sensitized cells in an improved indirect microhemagglutination test for malaria. *Infection and Immunity*, 1973; 7 : 680.
21. Armstrong J C. Evaluation of the results of an indirect hemagglutination test for malaria in an Ethiopian population. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 1972; 39 : 545.
22. Kreter J P. The isolation and fractionation of malaria-infected cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 1977; 55 : 317.
23. Heidrich H G et al. Free-flow electrophoresis isolation of intracellular parasites (*Plasmodium falciparum* from culture. Separation of the free parasites according to stages. *Journal of Parasitology*, (in press), 1981.
24. Mahoney D F et al. The preparation and serologic activity of plasmodial fractions. *Military Medicine*, 1966; 131 : 1141.
25. Rogers W A Jr et al. A modified, indirect microhemagglutination test for malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1968; 17 : 804.
26. Neuwissen J H E T et al. Application of the indirect haemagglutination test for malaria: reproducibility with *Plasmodium falciparum* sensitized cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 1973; 49 : 317.
27. Mathews H M et al. The indirect hemagglutination test for malaria. Evaluation of antigens prepared from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1975; 24 : 417.
28. Cortillebrogger R et al. Changing patterns in the humoral immune response to malaria before, during and after the application of control measures: a longitudinal study in west African savanna. *Bulletin of the World Health Organization*, 1978; 56 : 579.
29. Bidwell D et al. Application of indirect hemagglutination tests for malaria VI. Comparison of indirect hemagglutination and immunofluorescence tests for malaria antibody in *Plasmodium falciparum* infected owl monkeys. *WHO/MAL* 1974; 74 : 824.
30. Voller A et al. New serological test for malaria antibodies. *British Medical Journal* 1975; 1 : 659.
31. Voller A et al. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1976; 70 : 98.
32. Spencer H C et al. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. I. the use of in vitro cultured *Plasmodium falciparum* as antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1979; 28 : 927.
33. Ambrose Thomas P et al. Mise en évidence, par une microméthode immunoenzymologique (ELISA), d'antigènes métaboliques produits in vitro par *Plasmodium falciparum* en culture. *WHO/MAL* 1981; 81 : 930.
34. Mc Gregor I A et al. Demonstration of circulating antibodies to *Plasmodium falciparum* by gel-diffusion techniques. *Nature*, 1966; 210 : 1384.
35. Wilson R J et al. Occurrence of S-antigens in serum in *Plasmodium falciparum* infections in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1975; 69 : 453.
36. Wilson R J M. Methods for the biological characterization of malaria parasites: Characterization of *Plasmodium falciparum* with L and S-antigens, *WHO/MAL* 1981; 937 : 1.
37. Wilson R J and Voller A. A comparison of malarial antigens from human and Aotus monkeys blood infected with *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 1972; 64 : 191.
38. Wilson R J M et al. The stability and fractionation of malarial antigens from the bloods of Africans infected with *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology*, 1973; 3 : 511.
39. Stuz D R et al. Estimation of antimalarial antibody by radioimmunoassay. *Journal of Parasitology*, 1974; 60 : 539.
40. Voller A et al. A comparison of isotopic and enzyme immunoassays for tropical parasitic diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1977; 71 : 431.
41. Perrin L H et al. Antigenic characterization of plasmodia using monoclonal antibodies. *WHO/MAL* 1981; 938 : 1.