ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 55

1980

N° 1

© Masson, Paris, 1980.

Annales de Parasitologie (Paris)
1980, t. 55, n° 1, pp. 1-11.

MÉMOIRES ORIGINAUX

Etude critique comparée des antigènes de deux clones d'une même souche d'un Flagellé parasite (*Trichomonas vaginalis*)

par D. DELACHAMBRE

Laboratoire de Biologie comparée des Protistes,
associé au C.N.R.S., B.P. 45, F 63170 Aubière.

Résumé

L'analyse antigénique de *Trichomonas vaginalis*, par les techniques de diffusion en gel et d'immunoélectrophorèse, semble révéler qu'il existe une différence qualitative entre 2 clones (A_2 , A_3) d'une même souche, aussi bien qu'entre un clone « jeune » et un clone « vieux », c'est-à-dire en culture depuis 12 mois, provenant d'un même clone initial. Les absorptions croisées réduisent le phénomène à une différence quantitative, ce qui remet en question les variations antigéniques signalées chez *Trichomonas*.

Summary

Critical comparative study of antigens of two clones from the same strain of a parasitic Flagellate (*Trichomonas vaginalis*).

Antigenic analysis of *Trichomonas vaginalis* by gel diffusion and immuno-electrophoretic technics released indications that there seemed to be a qualitative difference between 2 clones (A_2 , A_3) of the same strain, as well as between a young clone A_2 and an old one (the latter having been in culture for 12 months) both of them originating from the same initial clone. Such differences are reduced to quantitative level by the results of cross absorptions. Antigenic variations mentioned by the previous authors are to be questioned.

Accepté le 2 janvier 1980.

Annales de Parasitologie humaine et comparée (Paris), t. 55, n° 1.

1

Introduction

De nombreux travaux ont été réalisés pour tenter d'analyser les facteurs déterminant la pathogénicité des *Trichomonas* (voir mise au point d'Honigberg, 1973).

Une analyse des souches pathogènes et non pathogènes de *Histomonas meleagridis* et de *Trichomonas gallinae* par les techniques d'immunofluorescence et de diffusion en gel a apporté quelques éclaircissements sur l'interdépendance antigénicité-pathogénicité (Honigberg et Goldman, 1968 ; Dwyer, 1971 ; Dwyer et Honigberg, 1972 ; Stepkowski et Honigberg, 1972). Les souches avirulentes de *Trichomonas gallinae* sont plus riches en antigènes et capables de provoquer une réponse immune plus forte chez des Lapins. La souche virulente a une capacité à stimuler la production d'anticorps chez le Lapin plus limitée que les souches primitivement ou secondairement avirulentes (par culture prolongée). *In vitro*, l'évolution de la culture va de pair avec un accroissement progressivement quantitatif et apparemment qualitatif dans la constitution antigénique de *Histomonas meleagridis* (Dwyer, 1974).

Donc, chez *Histomonas meleagridis* et chez *Trichomonas gallinae*, Honigberg et coll. pensent, d'une part, faire la démonstration que des souches maintenues en culture ont plus d'antigènes que la souche parentale, d'autre part, que cette évolution antigénique va de pair avec une perte de la virulence. Or, les auteurs ont travaillé sur des clones de souches différentes et n'ont pas utilisé toutes les possibilités de l'absorption croisée dans les techniques de diffusion en gel. Appliquée à d'autres modèles parasitaires ou libres, l'analyse immuno-chimique a permis une meilleure connaissance des Amibes libres du genre *Naegleria* (Willaert *et al.*, 1972) et des structures antigéniques des Trypanosomes hétéroxènes (Le Ray, 1975 ; Afchain, 1976).

Dans l'étude des relations possibles antigénicité-pathogénicité, il était donc intéressant de commencer par comparer, grâce à l'analyse immuno-chimique, les antigènes de deux clones d'une même souche de *Trichomonas vaginalis* et de suivre cette évolution antigénique avec l'âge des cultures.

Matériel et méthodes

Culture de *Trichomonas vaginalis*.

Une souche (A) de *Trichomonas vaginalis*, provenant d'une femme atteinte de vaginite, est isolée sur milieu de Brewer (Difco), additionné de sérum de Poulain [10 % (w/v)] et d'antibiotiques (spécilline + streptomycine). Elle est purifiée par 3 traitements à la kanamycine (2 500 µg/ml) (Kulda *et al.*, 1970) et éventuellement à la nystatine (300 U./ml) si elle est contaminée par des levures ou des champignons. Elle est entretenue par repiquages toutes les 48 heures sur milieu de Brewer et cultivée en masse sur milieu TYM (trypticase + yeast extract + maltose) (Diamond, 1957).

La souche A est clonée par culture sur plaques de milieu gélosé (Cavier *et al.*,

1964) avec un inoculum de 500 à 1 000 Flagellés par ml. En 5 à 6 jours, les colonies s'observent à tous les niveaux de la couche supérieure.

La cryoconservation permet le maintien des clones (A_1 , A_2 , A_3 ,...). Nous utilisons une variante de la technique de Ressler *et al.* (1965) : l'emploi d'un agent cryoprotecteur (1 volume d'une solution de DMSO à 20 % en eau physiologique stérile + 3 volumes d'une culture de *Trichomonas vaginalis*), une congélation lente, la conservation à -196°C , la décongélation rapide préservent au mieux la viabilité cellulaire.

Préparation des extraits antigéniques hydrosolubles.

Nous utilisons les techniques mises au point par Biguet *et al.* (1965 b) et Capron *et al.* (1968) pour les extraits antigéniques hydrosolubles des Champignons et des Helminthes, appliquées aux *Trypanosomatidae* par Afchain et Capron (1969) et décrites en détail par Le Ray (1975). Les cultures massives de *Trichomonas vaginalis* sont centrifugées à 175 g pendant 3 mn, lavées quatre fois en eau physiologique ; les culots de centrifugation sont mis en suspension dans NaCl à 1‰ (10 ml de cette solution pour 1 g de Flagellés) (poids humide). La suspension est congelée, broyée au mortier. Cinq opérations « mortier-glace » sont nécessaires pour rompre les cellules. Après ultracentrifugation à 23 000 g pendant 60 mn, à $+4^{\circ}\text{C}$, le surnageant est dialysé, à $+4^{\circ}\text{C}$, pendant 20 heures, contre de l'eau distillée (100 vol. d'eau pour 1 vol. de solution à dialyser), lyophilisé en flacons pénicilline, bouché sous vide, conservé entre -20°C et -30°C .

Dosage d'azote.

Afin d'apprécier la quantité de protéines des extraits antigéniques des *Trichomonas vaginalis* étudiés, des lyophilisats de *Trichomonas vaginalis* A_2 et A_3 ont été examinés par dosage de l'azote total. Le dosage de l'azote total a été effectué par la méthode de Dumas appliquée à l'appareil Coleman (Nitrogen Analyzer, modèle 29).

La teneur en azote est variable d'un lot à l'autre de lyophilisat. Elle est en moyenne de 14,3 (en mg d'azote pour 100 mg de lyophilisat) et varie de 13 à 15,6. Ces différences s'expliqueraient par une variation du taux d'humidité résiduelle dans les produits lyophilisés. Ceux-ci sont en effet très hydrophiles.

Préparation des immun sérums.

Des Lapins Fauve de Bourgogne, pesant au moins 3 kg, sont immunisés par voie intradermique, selon la méthode de Vaitukaitis *et al.* (1971) avec 2 mg d'antigène solubilisés dans 1 ml d'eau physiologique, additionnés de 2 ml d'adjuvant de Freund incomplet et de 5 mg de *Mycobacterium butyricum*. Le même jour, nous faisons une injection intra-musculaire d'1 ml de vaccin coquelucheux adsorbé dans la cuisse de la patte postérieure du Lapin. Nous effectuons des injections de rappel, par voie trans-musculaire, dans l'espace sous-scapulaire, avec 2 mg d'antigène dissous dans 0,5 ml d'eau physiologique et émulsionnés dans 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet.

Les Lapins ont été immunisés par 2 injections intradermiques suivies de 8 à 10 saignées hebdomadaires, puis par 7 injections de rappel, toutes les 3 semaines, précédées d'une saignée chaque fois.

Absorption par les antigènes du milieu de culture.

Tout extrait antigénique d'un Protozoaire cultivé *in vitro* dans un milieu immunogène, contient, malgré les lavages répétés, des protéines du milieu de culture. Le nombre de 4 lavages pratiqué sur les Trypanosomes (Afchain, 1976) a été appliqué aussi aux cultures de *Trichomonas vaginalis*. Le milieu TYM contient des substances autoclavées à + 120 °C qui ne présentent pas d'activité antigénique. Le sérum de Poulain ajouté après la stérilisation est le seul constituant immunogène du milieu (Pl. I, fig. A et C). Sur différents immunosérums anti-*Trichomonas*, des essais d'absorption ont été réalisés avec des doses allant de 1 mg à 30 mg de lyophilisat de sérum de Poulain (SP) par ml d'immunosérum. La dose de 15 mg de SP par ml d'immunosérum convient pour l'épuisement (Pl. I, fig. B, Pl. II, fig. A, C, Pl. III, fig. A, C). Les immunosérums ont été systématiquement absorbés par du SP, par incubation du mélange à + 37 °C pendant 2 heures, à + 4 °C pendant 12 heures, et par élimination des précipités par centrifugation à 1 800 g pendant 20 mm.

Absorption croisée.

Les épreuves d'absorption croisée sont menées par solubilisation d'un lyophilisat de l'extraî hétérologue (30, 40, 50 à 100 mg/ml d'immunosérum) dans l'immunosérum à absorber selon la technique décrite ci-dessus. Il est vérifié que dans nos conditions expérimentales n'interviennent pas de phénomènes de coprécipitation ni d'adsorption.

Précipitation en gel.

Nous effectuons les réactions en gel d'agarose (solution d'indubiose à 1 % dans tampon véronal à pH 8,2) :

- en macro-double diffusion en gel, selon la technique d'Ouchterlony (1958) : 0,25 ml d'immunosérum au 1/2 sont déposés dans des puits de 12 mm, 2 à 4 mg d'antigène dans des puits de 30 µl ;
- en immunoélectrophorèse, selon la technique de Grabar et Williams modifiée (1955), 2 mg d'antigène dans des puits de 15 µl, et dans les gouttières 0,1 ml d'immunosérum au 1/6.

Après précipitation pendant 48 à 72 heures suivant les lames, ces dernières sont plongées 3 à 5 heures dans une solution de citrate trisodique à 5 % dans l'eau distillée, pour redissoudre les éventuels arcs de floculation dus à la substance C-protéine C-réactive (Biguet *et al.*, 1965 a). Les lames sont lavées pendant 3 jours dans de l'eau physiologique tamponnée, déminéralisées sur papier Whatman n° 1, colorées au Noir Amido 10 B pendant 4 à 5 minutes, décolorées dans 3 bains successifs d'une solution à 2 % d'acide acétique pur.

Résultats

I. Comparaison antigénique de deux clones A_2 et A_3 d'une même souche parentale A de *Trichomonas vaginalis*.

1. Structure antigénique parasitaire.

Les analyses sont réalisées à l'aide d'extraits antigéniques solubles de *Trichomonas vaginalis* obtenus à partir des clones A_2 et A_3 , opposés à des immunosérums homologues. Après chaque saignée, nous étudions l'immunosérum en macro-double diffusion en gel (Pl. I, fig. B).

Nous effectuons des immunoélectrophorèses avec les meilleurs immunosérums ; cette analyse révèle 15 à 20 composants antigéniques parasitaires. A l'examen direct, le profil immunoélectrophorétique est différent entre deux clones A_2 et A_3 par rapport à un même sérum (Pl. I, fig. C). Un contrôle de l'absorption par le sérum de Poulain est systématiquement réalisé en macrodouble diffusion en gel.

2. Absorption croisée.

Dans nos conditions expérimentales, l'immunosérum anti- A_3 , absorbé par 15 mg de sérum de Poulain, puis par 45 mg d'extrait antigénique A_2 par ml d'immunosérum, révèle une ligne de précipitation vis-à-vis de A_3 (Pl. II, fig. A). Par contre, l'absorption du même immunosérum, ou d'un autre, par 60 mg d' A_2 s'avère négative en macro-double diffusion en gel et en immunoélectrophorèse (Pl. II, fig. B).

La réaction inverse, l'immunosérum anti- A_2 , absorbé par 45 ou 60 mg d'extrait antigénique A_3 , révèle en double diffusion en gel, une ou deux lignes de précipitation vis-à-vis de A_2 (Pl. II, fig. C). Avec une dose de 60 mg/ml, ces résultats ne sont pas constants (Pl. II, fig. D).

L'absorption croisée avec une dose importante d'extrait hétérologue (45 mg par ml) révèle une ligne de précipitation et, à première vue, les clones A_2 et A_3 semblent antigéniquement différents. Un antigène spécifique de clone aurait été mis en évidence. Avec une dose plus importante (60 mg par ml), cette ligne de précipitation devient très faible ou disparaît même. L'expérience a été refaite sur plusieurs saignées différentes, cet arc n'a été visible que dans quelques cas. Il s'agit vraisemblablement d'un phénomène quantitatif et les deux clones de la même souche doivent avoir la même composition antigénique.

II. Stabilité antigénique d'un clone maintenu en culture *in vitro* durant un an.

Le clone A_2 a été conservé en culture *in vitro*, par repiquage chaque deux jours, pendant 12 mois, avec deux brèves stabilisations dans l'azote.

Planche I.

A. Immunsérum anti-A₂ opposé d'une part à l'extrait antigénique homologue et d'autre part à du sérum de Poulain, seul constituant immunogène du milieu de culture.

B. Immunsérums anti-A₂, absorbés par du sérum de Poulain (15 mg/ml d'immunsérum) opposés aux extraits antigéniques homologues.

C. Analyse immunoélectrophorétique des immunsérums anti-A₂ (5 s₆, 5 s₁₀, 7 s₆, 7 s₁₀) vis-à-vis du sérum de Poulain et des extraits antigéniques A₂ et A₃.

Planche II. Absorption croisée entre A_2 et A_3 (voir texte)

A partir de ce clone A_2 « vieux », un extrait antgénique a été préparé, des Lapins ont été immunisés selon la technique décrite ci-dessus.

1. Structure antigénique de A_2 « vieux ».

Nous analysons la structure antigénique de A_2 « vieux » avec un immunosérum anti- A_2 « vieux » opposé à l'extrait antigénique soluble homologue. En double diffusion en gel apparaissent 12 lignes de précipitation ; l'analyse immunoelectrophorétique révèle au moins 15 composants antigéniques. Suivant les saignées, un ou deux arcs épais supplémentaires sont obtenus avec A_2 « vieux ».

2. Absorption croisée.

Nous absorbons les meilleurs immunosérums anti- A_2 « vieux » par 15 mg de sérum de Poulain et ensuite par de l'antigène hétérologue A_2 « jeune », aux doses de 45, 60 et 100 mg/ml d'immunosérum. Le contrôle d'épuisement en macro-double diffusion

en gel révèle une ligne de précipitation vis-à-vis de A_2 « vieux » et ceci même avec une dose d'absorption de 100 mg/ml d'immunsérum (Pl. III, fig. A). Un arc très fin, spécifique de A_2 « vieux », apparaît lors de l'immunoélectrophorèse d'un immunsérum anti- A_2 « vieux », absorbé par A_2 « jeune », à la dose de 60 mg/ml (Pl. III, fig. B).

Nous réalisons l'expérience inverse, à savoir l'absorption d'un immunsérum anti- A_2 « jeune », par de l'antigène hétérologue A_2 « vieux ». Avec une dose de 60 mg/ml d'immunsérum, elle révèle une ligne de précipitation, en double diffusion en gel, vis-à-vis de A_2 « jeune » (Pl. III, fig. C), mais par contre l'immunoélectrophorèse s'avère négative (Pl. III, fig. D).

Planche III. Absorption croisée entre A_2 « jeune » et A_2 « vieux » (voir texte).

De nombreuses saignées ont été expérimentées. Cet arc fin n'est pas retrouvé dans tous les cas. S'agit-il d'une spécificité antigénique entre A_2 « jeune » et A_2 « vieux » ou d'un phénomène quantitatif ?

Discussion

Dans notre travail, nous comparons des clones différents d'une même souche de *Trichomonas vaginalis*, et non des clones de plusieurs souches, comme les autres auteurs.

L'obtention d'extraits antigéniques solubles de bonne qualité est une condition importante à la réalisation de ce travail. Une limite de cette technique peut être de ne donner accès qu'aux antigènes solubles, qui représentent néanmoins une partie significative de l'organisme.

D'autre part, on peut objecter que cette analyse de précipitation en gel est une méthode essentiellement qualitative, qui ne permet d'établir que des différences absolues de spécificité antigénique.

Pour de faibles quantités d'antigène, la double diffusion en gel s'avère plus sensible que l'immunoélectrophorèse, donc il n'est pas surprenant que cette dernière nous ait donné certains résultats négatifs.

L'analyse antigénique des clones A_2 et A_3 semblait montrer des différences. A l'examen direct, le profil immunoélectrophorétique n'est pas le même entre ces 2 clones par rapport à un même sérum. Les mêmes constatations sont faites entre A_2 initial (A_{2j}) et A_2 cultivé *in vitro* durant un an (A_{2v}).

Mais, en plus de l'analyse antigénique directe, nous réalisons des absorptions croisées avec des extraits antigéniques hétérologues. Par des tests complémentaires, nous avons tenu à vérifier que seuls sont bien en cause les phénomènes d'absorption. Pour ce faire, nous constatons, d'une part, qu'en saturant progressivement l'immunsérum avec du sérum de Poulain jusqu'à 100 mg/ml, les anticorps contre *Trichomonas vaginalis* ne disparaissent pas, ce qui permet d'écarter la mise en cause d'un phénomène de coprécipitation.

D'autre part, nous absorbons des immunsérums avec 15 mg/ml de sérum de Poulain, et nous les saturons avec un antigène strictement hétérologue (*Aspergillus fumigatus*, antigène somatique), progressivement, jusqu'à 100 mg/ml. Les lignes de précipitation vis-à-vis de l'antigène homologue restent bien visibles ; il ne s'agissait donc pas d'adsorption. Dans nos conditions expérimentales, en limitant nos absorptions à 100 mg/ml (dose très importante), nous obtenons une disparition progressive des arcs de précipitation. Tout porte à croire qu'il s'agit bien là d'un phénomène quantitatif et qu'il y a une constance antigénique, comme on l'a signalé aussi chez les Amibes et les Trypanosomes. La stabilité antigénique en culture serait un caractère général des *Trypanosomatidae*. Dans des conditions normalisées, trois souches de *Trypanosoma cruzi* d'origine géographique et parasitaire distincte ont présenté un profil immunoélectrophorétique identique. Deux souches de *Trypanosoma cruzi* cultivées respectivement pendant 15 ans et pendant 4 mois se montrent semblables au niveau des 30 composants immunoélectrophorétiques qui ont pu être « objectivés » (Afchain *et al.*, 1974). Une conclusion similaire a été rapportée par Bray (1969) à propos du genre *Leishmania*.

L'exemple le plus frappant de la constance antigénique de l'espèce est fourni par les Amibes libres du genre *Naegleria*. L'espèce parasite facultative *Naegleria fowleri* Carter, 1970, a une distribution cosmopolite (Willaert, 1974 b). La comparaison de populations isolées à l'état parasitaire et à l'état libre en Australie, en Amérique du Nord et en Europe, démontre leur identité immunoélectrophorétique (Willaert *et al.*, 1972 ; Willaert, 1974 a).

Nous avons testé par ailleurs la virulence des clones A₃, A₂ « jeune » et A₂ « vieux » gardé en culture, sur des Souris Swiss et des Souris Balb/c, par voie sous-cutanée, selon la méthode décrite par Honigberg (1961) et par voie intrapéritonéale. Les résultats acquis après plusieurs expériences ne nous permettent pas encore de conclure, mais ils feront l'objet d'une prochaine publication.

Conclusion

Dans la comparaison antigénique de deux clones d'une même souche de *Trichomonas vaginalis*, il ressort qu'une conclusion hâtive d'un antigène spécifique de clone peut être faite, mais que l'emploi de l'absorption croisée avec des doses très importantes d'extraits hétérologues ramène à un phénomène quantitatif ce qui pourrait être pris pour une différence qualitative.

Dans la comparaison d'un clone jeune et du même clone après culture prolongée *in vitro*, nous pensons qu'il s'agit aussi d'un phénomène quantitatif plutôt que d'une spécificité antigénique. Il y aurait stabilité antigénique en culture. La relation antigénicité-virulence avancée par certains auteurs pourrait être remise en cause. Pour le démontrer, nous avons donc à aborder l'évolution de la virulence de nos clones en culture.

Bibliographie

- Afchain D. : Le caractère antigénique des Trypanosomatidae hétéroxènes parasites de l'Homme. Thèse Doctorat d'Etat, n° 359, Faculté des Sciences, 1976, Lille, 162 p.
- Afchain D., Capron A. : Etude préliminaire des antigènes solubles de *Trypanosoma cruzi*. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la Souris. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1969, D 269, 272-274.
- Afchain D., Le Ray D., Fruit J., Capron A. : Comparative antigenic analysis of Trypanosomes *Stercoraria*. Practical consequences. III^e Congr. Int. Parasitol., 1974, München, A 14, 216-217.
- Biguet J., Capron A., Tran Van Ky P., Rose F. : Présence de substances de type C dans les antigènes vermineux et de protéine anti-C au cours des helminthiases humaines ou expérimentales. I. Etude immunologique préliminaire et répercussions pratiques. *Rev. Immunol. (Paris)*, 1965 a, 29, 233-240.
- Biguet J., Rose F., Capron A., Tran Van Ky P. : Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoélectrophorèse. *Rev. Immunol. (Paris)*, 1965 b, 29, 5-30.

- Bray R.S.: Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. VI. Search for antigenic variation in single strains of *Leishmania* spp. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1969, 63, 378-382.
- Capron A., Biguet J., Vernes A., Afchain D.: Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol.*, 1968, 16, 121-138.
- Cavier R., Georges P., Savel J.: La culture de *Trichomonas vaginalis* sur plaques de milieu gélosé. *Exp. Parasitol.*, 1964, 15, 556-560.
- Diamond L.S.: The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.*, 1957, 43, 488-490.
- Dwyer D.M.: Immunologic analysis by gel diffusion of effects of prolonged cultivation on *Histomonas meleagridis* (Smith). *J. Protozool.*, 1971, 18, 372-377.
- Dwyer D.M.: Concomitant antigenic and pathogenicity changes in *Histomonas meleagridis*. III^e Congr. *Int. Parasit.*, 1974, München, F 6 (9), 1568.
- Dwyer D.M., Honigberg B.M.: Immunologic analysis by quantitative fluorescent antibody methods of the effects of prolonged cultivation on *Histomonas meleagridis* (Smith). *J. Parasitenk.*, 1972, 39, 39-52.
- Goldman M., Honigberg B.M.: Immunologic analysis by gel diffusion technics of the effects of prolonged cultivation on *Trichomonas gallinae*. *J. Protozool.*, 1968, 15, 350-352.
- Grabar P., Williams C.A.: Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Bioch. Biophys. Acta*, 1955, 17, 67-74.
- Honigberg B.M.: Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* to mice. I. Gross pathology, quantitative evaluation of virulence, and some factors affecting pathogenicity. *J. Parasitol.*, 1961, 47, section 1, 545-571.
- Honigberg B.M.: Mechanisms of pathogenicity among parasitic protozoa. In: Progress in Protozoology, *Fourth int. Congr. Protozool.*, 1973, De Puytorac et Grain Ed. Clermont-Ferrand, VIII-XXXIX.
- Honigberg B.M., Goldman M.: Immunologic analysis by quantitative fluorescent antibody methods of the effects of prolonged cultivation on *Trichomonas gallinae*. *J. Protozool.*, 1968, 15, 176-184.
- Kulda J., Honigberg B.M., Frost J.K., Hollander D.H.: Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*: a clinical and biologic study. *Am. J. Obst. Gyn.*, 1970, 108, 908-918.
- Le Ray D.: Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei* (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1975, 55, 129-311.
- Ouchterlony O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 1958, 5, 1-78.
- Ressler R., Le Ray D., Goedvriend J.: Conservation de Protozoaires, particulièrement en culture, à la température de l'azote liquide. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1965, 45, 665-678.
- Stepkowski S., Honigberg B.M.: Antigenic analysis of virulent and avirulent strains of *Trichomonas gallinae* by gel diffusion methods. *J. Protozool.*, 1972, 19, 306-316.
- Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag E., Ross T.G.: A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 1971, 33, 988-991.
- Willaert E.: Epidemiological and immunoelectrophoretic considerations on human and environmental strains of *Naegleria fowleri*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1974 a, 54, 109-118.
- Willaert E.: Primary amoebic meningo-encephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1974 b, 54, 205-216.
- Willaert E., Jadin J.-B., Le Ray D.: Structures immunochimiques comparées d'Amibes du genre *Naegleria*. *Protistologica*, 1972, 8, 497-504.