

## Présence d'antigène *Sm28GST* urinaire chez des patients malgaches atteints de bilharziose à *Schistosoma mansoni*

Raobelison A<sup>1</sup>, Neyrinck JL<sup>2</sup>, Capron A<sup>2</sup>, Esterre Ph<sup>1</sup>

**RESUME :** Nous avons dosé, par une technique immunoenzymatique (ELISA), le niveau urinaire de la glutathion S-transférase de 28 kDa (*Sm28GST*), spécifique de *Schistosoma mansoni*, chez 13 patients malgaches. La présence de *Sm28GST* a été démontrée pour la première fois chez 8 patients (69%). Aucune corrélation significative n'a pu être démontrée entre le niveau d'antigène et la charge parasitaire dans les selles. L'utilisation d'une méthode d'immunocapture plus performante sur un échantillon plus large sera nécessaire pour vérifier l'hypothèse selon laquelle la détection de l'antigène *Sm28GST* urinaire pourrait constituer un test quantitatif et fiable pour le diagnostic ou le suivi des malades atteints de la bilharziose à *Schistosoma mansoni*.

**Mots-clés :** Schistosomiase - *Schistosoma mansoni* - *Sm28GST* - Antigène urinaire - MADAGASCAR.

**ABSTRACT :** "Presence of the urinary *Sm28GST* from malagasy patients infected with *Schistosoma mansoni*" : Using an ELISA method, we quantitated the level of glutathion S-transferase 28 kDa (*Sm28GST*), specific of *Schistosoma mansoni*, in the urine of 13 malagasy patients. The presence of *Sm28GST* antigen has been demonstrated for the first time, in 8 patients (69%). No significant correlation could be found between antigen level and the parasitological burden in the feces. The use of an immunocapture ELISA technic on a larger number of samples will be necessary to assess if this test could be quantitative and reliable enough for the diagnosis or the follow up of patients infected with *Schistosoma mansoni*.

**Key-Words :** Schistosomiasis - *Schistosoma mansoni* - *Sm28GST* - Urinary antigen - MADAGASCAR.

### INTRODUCTION

Les recherches et leurs applications pour la mise en place d'une vaccination anti-schistosome ont permis de caractériser diverses molécules antigéniques protectrices parmi lesquelles une protéine de 28 kDa, identifiée comme une glutathion-S-transférase et dénommée *Sm28GST* [1, 2, 3].

Cette enzyme, associée à la larve infestante, au ver adulte mais aussi à l'oeuf du parasite, est dosée dans des urines de sujets atteints de schistosomose à *Schistosoma mansoni*.

### MATERIELS ET METHODES

#### Patients testés

Les urines de 13 patients infectés par *S. mansoni* (>1000 epg), 4 témoins négatifs vivant en zone d'endémie (4 examens de selles négatifs) et 2 témoins négatifs de zone non endémique ont été testées. Les urines ont été conservées à -80°C, sans aucun traitement préalable ni conservateur.

#### Examen parasitologique des selles

Deux lames par sujet ont été examinées sur place selon la méthode de Kato, préconisée par l'OMS pour la recherche et le comptage des oeufs de *S. mansoni* dans les selles. Les examens ont été réalisés par une équipe de laboratoire expérimentée. Les résultats sont exprimés en oeufs par gramme (epg) de selles.

#### Détection de la *Sm28GST* urinaire

100 µl de chaque échantillon urinaire, préalablement dilués au 1/2 dans du tampon phosphate PBS 0,1M contenant 1% de sérum albumine bovine (SAB) et 0,05% de Tween 20, sont déposés et incubés une nuit à +4°C dans les puits d'une plaque de microtitration (Immulon 2™, Dynatech Lab., Chantilly, USA). Ces puits sont alors saturés par addition de PBS contenant 5% de SAB pendant deux heures à température ambiante. Après un lavage de la solution saturante par du tampon PBS 0,1M-Tween 20 à 0,05%, un premier anticorps de lapin anti-*Sm28GST* purifié par chromatographie d'affinité est incubé à la concentration de 2 µg/ml une nuit à +4°C. Après une série de 5 lavages, un second anticorps anti-immunoglobuline de lapin biotinylé à 0,18 µg/ml de concentration est ajouté pour une nouvelle incubation à température ambiante pendant 1 heure et demi. Une autre série de 5 lavages est suivie par la révélation de la réaction en utilisant un conjugué Avidine Peroxydase (kit ABC Vectastain™, Vector lab., Burlingame, USA). La plaque est lavée une dernière fois avant addition du substrat constitué d'orthophénylène diamine dilué dans du tampon citrate phosphate 0,1M pH 5 additionné d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est stoppée par du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N. L'absorbance de chaque puits est lue à 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan Plus™, Labsystems, Helsinki, Finlande).

#### Courbe standard

La courbe standard est obtenue en utilisant une gamme de dilution d'antigène *Sm28GST* recombinant (de 0,78 à 50 ng/ml) diluée dans le même tampon que les urines. Une densité optique de 0,298 représente le

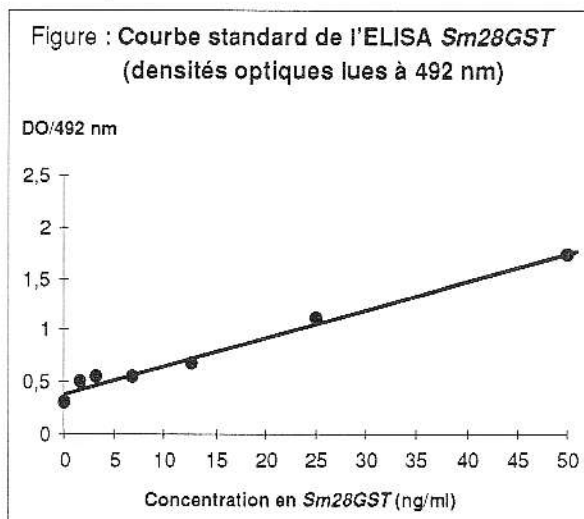
<sup>1</sup> Unité de Parasitologie, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar

<sup>2</sup> INSERM U 167, Institut Pasteur de Lille, Lille - France

seuil de positivité de la réaction et correspond à une concentration de *Sm28GST* supérieure à 0 ng/ml.

## RESULTATS

La courbe standard est représentée dans la figure suivante :



Les résultats obtenus avec les patients et les sujets témoins négatifs sont inscrits dans le tableau. Sur les 13 patients dont la charge parasitaire varie de 1 008 à 6 432 epg, 8 sont positifs en *Sm28GST* urinaire (1,5 à 53 ng/ml). Le taux d'antigène excrété n'est pas corrélé avec la charge parasitaire. Parmi les 6 sujets témoins négatifs, 3 individus sont positifs mais à un taux très faible (6,5 et 8 ng/ml).

Tableau : Résultats du dosage de *Sm28GST* urinaire

| N° | Sexe | Age | Degré d'infection (epg) | <i>Sm28GST</i> (ng/ml) |
|----|------|-----|-------------------------|------------------------|
| 1  | M    | 6   | 1008                    | 4                      |
| 2  | M    | 28  | 2400                    | 35,1                   |
| 3  | M    | 19  | 2400                    | 4,5                    |
| 4  | M    | 23  | 1296                    | 13,75                  |
| 5  | F    | 18  | 1536                    | 53                     |
| 6  | M    | 35  | 6432                    | 0                      |
| 7  | M    | 7   | 1056                    | 23                     |
| 8  | F    | 23  | 2088                    | 1,5                    |
| 9  | M    | 28  | 1584                    | 0                      |
| 10 | M    | 12  | 3672                    | 0                      |
| 11 | M    | 12  | 1032                    | 0                      |
| 12 | F    | 11  | 1056                    | 2                      |
| 13 | M    | 19  | 2232                    | >50                    |
| 14 | F    | 5   | 0                       | 6,5                    |
| 15 | F    | 7   | 0                       | 8,1                    |
| 16 | F    | 5   | 0                       | 0                      |
| 17 | M    | 11  | 0                       | 0                      |
| 18 | M    | 40  | 0                       | 8,1                    |
| 19 | F    | 40  | 0                       | 0                      |

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Plusieurs essais de détection d'antigènes circulants dans les infections à schistosomes chez l'homme ont été décrits [4, 5, 6, 7]. Parmi ces antigènes, l'antigène anodique circulant (CAA) et l'antigène cathodique circulant (CCA), sont des glycoprotéines associées à l'épithélium intestinal des schistosomes.

Cette étude préliminaire montre, pour la première fois, la présence et la quantification possible d'un autre antigène dans les urines des patients, l'antigène *Sm28GST* (28 kDa), précédemment décrit comme une protéine présente à tous les stades du parasite, dans le cadre de l'infection humaine à *S. mansoni*. Le taux d'antigène excrété ne semble pas lié à l'excrétion des œufs dans les selles. L'utilisation d'une méthode ELISA immunocapture permettra d'augmenter la spécificité et la sensibilité du test. Ceci pour essayer de mieux comprendre et d'appréhender les suivis rigoureux d'une chimiothérapie et/ou un contrôle de l'efficacité réelle d'une immunité transférée chez l'homme en utilisant cet antigène, précédemment décrit comme protecteur dans les infections expérimentales chez les animaux [8,9].

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier l'équipe "Bilharziose" du Ministère de la Santé (Ravaoalimalala VE et coll., DLMT), qui leur a fourni les urines de référence et les données parasitologiques correspondantes, ainsi que Grzych JM (INSERM U167, Institut Pasteur de Lille) pour sa critique du manuscrit.

## REFERENCES

- 1- Balloul JM, Pierce RJ, Grzych JM, Capron A. *In vitro* synthesis of 28 kDa antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 17 : 105.
- 2- Capron A, Dessaint JP, Capron M, Ouma A, Butterworth A. Immunity to schistosome : progress toward vaccine. *Science* 1987; 238 : 1065.
- 3- Capron A. Un vaccin contre la bilharziose : stratégies et perspectives. *Rev Prat* 1993; 43 : 467.
- 4- Berggren W, Weller TH. Immunoelectrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1967; 16 : 606.
- 5- Gold R, Rosen FS, Weller TH. A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. Detection of antigens in serum and urine, correlation between antigenic concentration and worm burden. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18 : 545.
- 6- Nash TE, Prescott B, Neva FA. The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *J Immunol* 1974; 112 : 1500.
- 7- Deelder AM, Klappe HTM, Van der Aerdweg GJ, Van Meerkebo EHEM. *Schistosoma mansoni* : demonstration of two circulating antigens in schistosomiasis. *Exp Parasitol* 1976; 40 : 189.
- 8- Boulanger D, Reid GD, Sturrok RF, Wolowczuck I, Balloul JM, Grezel D, Otieno MF, Guerret S, Grimaud JA, Butterworth AE, Capron A. Immunization of mice and baboons with the recombinant *Sm28GST* affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasit Immunol* 1991; 13 : 473.
- 9- Grzych JM, De Bont J, Liu JL, Neyrinck JL, Fontaine J, Vercruyse J, Capron A. Recombinant *Schistosoma bovis* glutathione-S-transferase protects cattle against natural *Schistosoma mattheei* infection : immune parameters (1996, soumis pour publication).