

BIOLOGIE CLINIQUE

Analyse comparative de deux méthodes diagnostiques de la loase humaine : sérologie IgG4 et PCR nichée.

F. S. Touré (1), E. Mavoungou (1), P. Deloron (1) & T. G. Egwang (2)

(1) Centre international de recherches médicales de Franceville (CIRMF), BP 769, Franceville, Gabon. Tél: (241) 67 70 92, Fax : (241) 67 72 95/59, E-mail : ftoure@cirmf.sci.ga

(2) Med Biotech Laboratories P.O Box 9364 Kampala, Uganda.

Manuscrit n° 2034. "Biologie clinique". Reçu le 9 février 1999. Accepté le 27 mai 1999.

Summary: Comparative Analysis of Two Diagnostic Methods of Human Loaiosis: IgG4 Serology and Nested-PCR Assay.

By evaluating the diagnostic methods developed in our laboratory, the prevalence of loaiosis was estimated among 201 individuals from the province of Haut Ogooué in Gabon using IgG4 serology and nested-PCR. The study showed that the prevalence of loaiosis was higher than that described using standard microscopy. IgG4-based ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) using crude extract of *Loa loa* microfilariae showed that 80% (35/44) of microfilaraemic individuals (MF) and 56% (88/157) of amicrofilaraemics (AMF) presented antibodies. By contrast, *L. loa* specific DNA amplified by nested-PCR was detected in all MF and in 68% (106/157) of AMF. Among the 201 samples tested, 95 (47%) gave positive results in both tests. These results indicate that the presence of IgG4 antibodies directed against crude extract of *L. loa* microfilariae is not linked to the positivity of nested-PCR assay (χ^2 for paired data = 8.78; $P < 0,02$). We conclude that the PCR assay is more sensitive than the detection of IgG4 antibodies (directed against crude extract of *L. loa* microfilariae) in detecting loaiosis, and particularly occult loaiosis (infection without circulating microfilariae).

Résumé :

Afin de comparer les méthodes diagnostiques développées par notre laboratoire, la prévalence de la loase a été étudiée sur 201 sujets habitant la province du Haut Ogooué au Gabon par dosage des IgG4 sériques et par amplification in vitro de l'ADN (PCR). Cette étude a révélé que la prévalence de la loase est plus élevée dans cette localité que celle précédemment décrite à partir des examens microscopiques. Le dosage par ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) des IgG4 dirigées contre les antigènes de microfilaries *Loa loa* a permis d'estimer la séroprévalence à 80 % (35/44) pour les sujets microfilarémiques (MF) et à 56 % (88/157) pour les sujets amicrofilarémiques (AMF). L'ADN spécifique de *L. loa* amplifié par PCR nichée a été détecté chez tous les MF et chez 68 % (106/157) d'AMF. Au total, 95 sujets (35 MF et 60 AMF) sont positifs aux deux tests sur les 201 sujets testés, soit 47 %. Ces résultats montrent que la présence d'anticorps IgG4 dirigés contre les antigènes de microfilaries de *L. loa* n'est pas équivalente à la positivité de la PCR (χ^2 sur données appariées = 8,78; $P < 0,02$). En conclusion, la PCR est plus sensible que le dosage des IgG4 dirigées contre les antigènes bruts de microfilaries pour la détection de la loase en général et en particulier celle des formes occultes (infection non accompagnée de microfilaries sanguines).

Key-words: Occult filariasis - Loaiosis - Diagnosis - IgG4 Serology - PCR - Comparison - Haut Ogooué - Gabon - Sub-Saharan Africa

Mots-clés : Filariose occulte - Loase - Diagnostic - Sérologie IgG4 - PCR - Comparaison - Haut Ogooué - Gabon - Afrique intertropicale

Introduction

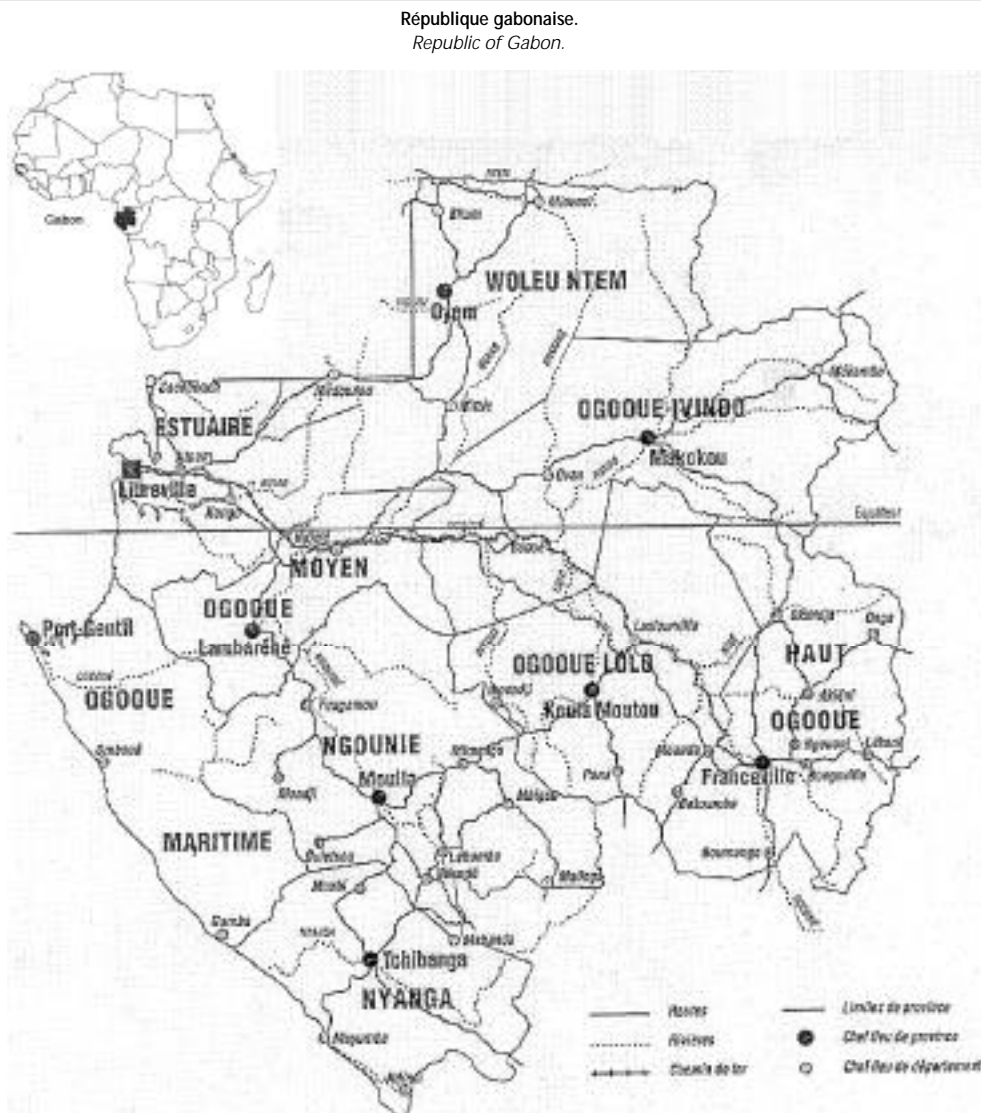
La loase est une helminthose cutanéodermique par la localisation des vers adultes et sanguine par celle des microfilaries. Les vers adultes vivent sous la peau et leur longévité peut dépasser quinze ans (7). Le vecteur, une "mouche rouge" ou taon, n'est trouvé que dans les forêts chaudes et humides de l'Afrique occidentale et centrale. Les tabanides responsables de la transmission sont essentiellement *Chrysops dimidiata* et *C. silacea*, deux espèces forestières souvent présentes dans un même foyer.

La filariose à *Loa loa* ou loase présente une distribution strictement africaine (12). Elle semble être limitée au bloc forestier de l'Afrique centrale et de l'Ouest : Bénin, Nigeria, Cameroun, République centrafricaine, Zaïre, Congo, Rwanda, Guinée équatoriale, Gabon, Angola. Dans ces pays, plus de 13 millions de personnes sont infectées (5, 6).

La loase présente une symptomatologie caractérisée par l'œdème de Calabar, les prurits et la migration sous-conjonctivale des vers adultes. Des complications méningo-encéphaliques surviennent au cours du traitement, par la diéthylcarbamazine, de sujets fortement microfilarémiques (3, 4).

L'existence dans la loase de nombreux cas d'amicrofilariémie symptomatique (c'est-à-dire présence des symptômes en l'absence de microfilaries sanguines chez les résidents des zones endémiques) rend nécessaire un test diagnostique spécifique et sensible. Plusieurs méthodes diagnostiques ont été développées, notamment le dosage des IgM, des IgG totales et des IgG4 spécifiques (1, 2, 8, 14, 17). Les enquêtes séroépidémiologiques ont montré que le dosage des IgG4 était beaucoup plus spécifique que les autres méthodes. Cependant, les tests sérologiques présentent deux inconvénients : d'une part, ils ne font pas la différence entre infection en cours et infection passée ; d'autre part, ils ne peuvent pas être utilisés pour évaluer l'efficacité thérapeutique des médicaments (11). Actuellement, la PCR est décrite comme étant l'outil le mieux indiqué pour la détection de l'infection active filarienne et pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des filaricides (11). Cette étude a pour objectif de réaliser une analyse comparative de la prévalence de la loase en utilisant d'une part le dosage des IgG4 dirigées contre les antigènes de microfilaries et d'autre part la PCR.

Figure 1.



Matériels et méthodes

La zone d'étude

Les échantillons de sang ont été prélevés chez les habitants d'Okoumbi, de N'djokaye et de Moyabi, trois groupes de villages situés dans un rayon de 50 km autour de Franceville, capitale provinciale du Haut Ogooué dans le sud-est du Gabon.

Leucoconcentration

Chaque échantillon de sang total a été examiné au microscope après leucoconcentration. Brièvement, 1 ml de sang est ajouté à 9 ml de PBS (phosphate buffered saline) contenant 2 % de saponine. Ce mélange est centrifugé après une incubation de 15 minutes à température ambiante et le culot examiné au microscope pour la présence de microfilaries.

Extraction d'antigènes de microfilaries de *Loa loa* et ELISA

Les réactions d'ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) sont effectuées en plaques de microtitration en utilisant la concentration de 0,25 µg/ml d'antigènes. Après soni-

cation des microfilaries de *Loa loa*, les antigènes bruts ont été extraits dans du tampon PBS contenant 1 % de Triton X-100, 1 % de déoxycholate (DOC), 2 mM de phénylméthylsulfoxyde (PMSF) et 10 mM d'éthylène diamine tétraacétique (EDTA). Ont été testés 201 sérums collectés au Gabon. Neuf sérums provenant de Gambie (région d'endémie de *Mansonella pers-tans*) ont été utilisés pour la détermination du niveau de spécificité et des réactions croisées entre *L. loa* et *M. perstans* et 5 sérums d'Européens ont servi de témoins négatifs. La détection des IgG4 a été faite avec un anticorps monoclonal de souris RJ4 (Immunotech, S.A. Luminycase, Marseille France) anti-IgG4 humaines et un anticorps de chèvre (Sigma, Saint Quentin Fallavier) anti-IgG de souris FC spécifique marqué à la phosphatase alcaline.

Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait à partir de 100 µl de sang total de chaque échantillon comme précédemment décrit (13, 15, 16). La région répétée 3 du gène codant la polyprotéine 15 kDa de *L. loa* a été la séquence cible de la PCR.

PCR

Amorces initiales :

sens 5' AATCAGGCAAATAATGGCACAAAA3' ;

antisens 5' GCGTTTTTCTTCTCACCAGCTGTCT 3'.

Les réactions de PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Perkin-Elmer Cetus en utilisant 2 µl de chaque matrice d'ADN. Le mélange réactionnel de 50 µl de volume contient 1 unité de Taq DNA Polymerase (Amersham France S.A. Les Ulis Cedex France), 1X du tampon de PCR (Amersham), 200 µM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP et 1 µM de chaque amorce. Les amplifications se font aux températures de 94 °C/1min. (dénaturation), 65 °C/1min. (hybridation), 72 °C/2min. (élongation) pendant 30 cycles.

PCR nichée

Elle consiste à amplifier le premier produit de PCR en utilisant un couple d'amorces internes de la séquence cible.

Amorces nichées :

sens 5'GGCACAAAACACTGCAGCAGTCCT 3' ;

antisens CAGCTGTCTCAAATCGAAGATTCT 3'.

Toutes ces amorces utilisées lors de la PCR et la PCR nichée ont été synthétisées par GENSET S.A. Paris, France.

Au cours de cette PCR nichée, on a utilisé 1 µl du produit de la première PCR comme matrice d'ADN et les réactions se déroulent dans les mêmes conditions.

Analyse des produits de PCR

Après la PCR nichée, 10 µl de chaque produit sont migrés dans un gel d'agarose 1,5 % puis colorés au bromure d'éthidium. Les fragments amplifiés sont visualisés et photographiés sous ultraviolet.

Résultats

Parasitologie

Sur les 201 sujets examinés, 44 présentaient des microfaires de *L. loa* à la leucoconcentration (1000 à 80000 mf/ml), soit une prévalence de 22 %. Parmi les 157 amicrofilarémiques *L. loa* (AMF), 73 % (114) présentaient des microfaires de *Man-sonella perstans* (1000 à 3400 mf/ml). Aucune autre espèce de filaire n'a été constatée chez ces habitants.

Sérologie

Le seuil de positivité de ce test a été déterminé par la densité optique moyenne des sérums de contrôle de Gambie plus un écart type ou déviation standard ($X + 1 SD$), soit 0,44 ; 0,45 et 0,32 respectivement pour les trois séries d'expériences effectuées pour tester les 201 sérums. Sur la base de ces données, 80 % (35/44) des MF et 56 % (88/157) des AMF ont été positifs. Tous les sérums témoins européens ont été négatifs. Par contre, deux sérums gambiens ont été positifs dans chaque expérience, ce qui permet d'estimer la spécificité du test par rapport au témoin *M. perstans* à 78 %, tandis que la sensibilité par rapport aux MF est estimée à 80 %. La figure 2 représente le profil de la réponse IgG4 exprimée en densité optique (DO) dans les différents groupes endémiques du village d'Okoumbi. A N'djokaye et à Moyabi, on observe un profil similaire à celui d'Okoumbi.

Tableau I.

	Séroprévalence et positivité PCR. PCR seroprevalence and positivity.				total
	MF		AMF		
	PCR+	PCR-	PCR+	PCR-	
IgG4+	35	0	60	28	123
IgG4-	9	0	46	23	78
total	44	0	106	51	201

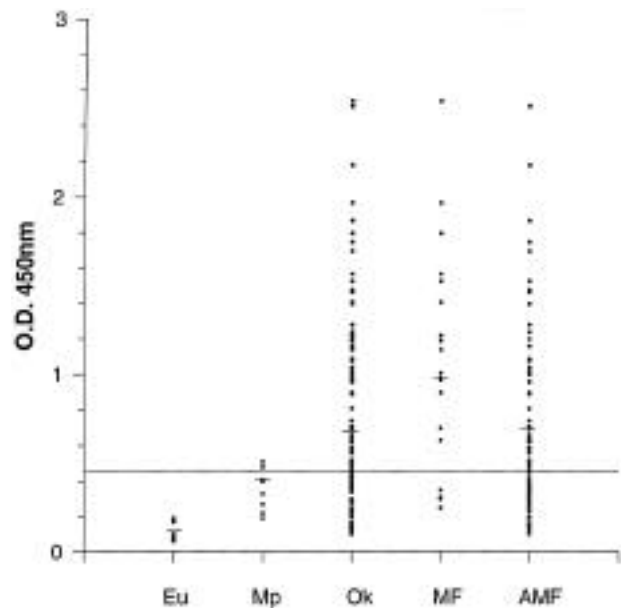
MF :microfilarémiques *Loa loa*

AMF :amicrofilarémiques *L.loa*

Figure 2.

Profil représentatif de la réponse IgG4 exprimée en densité optique (OD) dans différents groupes endémiques et non endémiques.

Representative profile of the IgG4 response expressed in optic density (OD) in different endemic and non endemic groups.



Eu :sérums européens (n = 5)

Mp :sérums témoins *M.perstans* de Gambie (n = 9)

Ok :sérums provenant du village d'Okoumbi (n = 90)

MF :microfilarémiques (n = 20)

AMF :amicrofilarémiques (n = 70).

Les barres représentent les moyennes des DO

PCR nichée

Sur 201 échantillons testés, 150 (44 MF et 106 AMF) ont été positifs. Un fragment d'ADN de 366 paires de base a été détecté dans ces échantillons après électrophorèse et coloration au bromure d'éthidium des produits de PCR.

Relations entre séroprévalence IgG4 et PCR

Au total, 95 échantillons étaient positifs aux deux tests sur les 201, soit 47 %, incluant 80 % (35/44) des MF et 38 % (60/157) d'AMF. Par ailleurs, 57% (60/106) des échantillons AMF positifs en PCR et 55 % (28/51) d'AMF négatifs en PCR ont produit des IgG4 (tableau I).

Discussion

Dans le but de comparer la sérologie IgG4 et la PCR, nous avons déterminé la prévalence de la loase chez 201 sujets vivant en zone endémique en utilisant ces deux méthodes. L'étude a montré que 56 % (88/157) des AMF et 80 % (35/44) des MF produisent des IgG4 dirigées contre les antigènes de microfaires. La PCR nichée, basée sur l'amplification de la région répétée 3 du gène codant la polyprotéine 15 kDa de *L. loa*, a été positive pour tous les MF et pour 68 % (106/157) des AMF. Ce test PCR nichée ne détecte que la filaire *L. loa* (14, 16). Considérant que la détection de l'ADN filarien est un marqueur d'infection active, tous les AMF PCR-positifs doivent être considérés comme des sujets faisant une infection occulte (hébergeant les vers adultes de *L. loa*) (13, 16). Chez ces patients, l'ADN circulant, provenant probablement de la destruction des microfaires et/ou des vers adultes, peut être détecté grâce à la sensibilité de la technique PCR. La prédominance des IgG4 dans les affections filariennes a été rapportée dans les filarioses lymphatiques (9), l'onchocercose

(10, 18) et la loase (1, 2). Dans la loase, cette sous-classe d'immunoglobulines reconnaît spécifiquement les antigènes de faible poids moléculaire 15-30 kDa (2). Puisque la synthèse d'IgG4 nécessite la stimulation chronique et la persistance de l'antigène (6), il est probable, en zones d'endémie loasique, que les résidents présentant une infection active (microfilariémiques et occultes) produisent des IgG4. Cependant, celles-ci ne sont présentes ici que chez 63 % (95/150) de tels sujets (44 MF et 106 AMF positifs en PCR), ce qui indique la faible sensibilité de cette technique sérologique. Un problème existe également au niveau de la spécificité, puisque les IgG4 sont présentes chez 55 % (28/51) de sujets négatifs en PCR, donc considérés comme non infectés. S'agit-il de véritables réactions croisées non spécifiques avec d'autres helminthoses, comme celles observées ici avec *M. perstans*? S'agit-il de "cicatrices sérologiques" de sujets guéris? S'agit-il enfin de réactions témoignant du contact des sujets résidents en zone d'endémie avec des larves L3 mais ne développant pas l'affection? Dans ce dernier cas, la sérologie pourrait ainsi être considérée, non plus simplement comme un marqueur de l'infection active mais également comme un marqueur de l'exposition, élément précieux dans les études épidémiologiques. Une étude antérieure réalisée dans des conditions comparables sur deux groupes de patients (13 microfilariémiques et 13 infectés occultes) en utilisant les antigènes de ver adulte de *L. loa*, a montré une bonne sensibilité avec 12/13 MF + et 10/13 occultes produisant des IgG4 et une spécificité de 94 % par rapport à *M. perstans* (2). Ces différences observées entre cette étude et la nôtre, tant en terme de sensibilité que de spécificité peuvent être dues à la taille des échantillons mais aussi à la nature des antigènes utilisés : extraits bruts de microfilaire dans l'une, vers adultes dans l'autre. Ces résultats ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle les IgG4 sont marqueurs de l'infection active de la loase. Toutefois, les tests sérologiques utilisant des antigènes définis (peptides et/ou antigènes purifiés) offrent une meilleure spécificité que ceux qui utilisent les antigènes bruts. Lorsque ces molécules définies seront disponibles pour la loase, les méthodes immuno-enzymatiques telles que le dosage des IgG4 auront des niveaux de spécificité et de sensibilité acceptable, permettant leur validation.

Conclusion

Ce travail montre que la sérologie et la PCR ne sont pas équivalentes (χ^2 sur données appariées = 8,78; $P < 0,02$), la PCR étant plus sensible. Le diagnostic de l'infection loasique par PCR est plus sensible que le diagnostic microscopique et le dosage des IgG4 dirigées contre les antigènes bruts de microfilaire.

Références bibliographiques

- AKUE JP, DEVANEY E, EGWANG TG, VINCENT J & HOMMEL M - Analysis of specific IgG subclasses in a population naturally exposed to *Loa loa*. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, **49** (suppl), 209.
- AKUE JP, EGWANG TG & DEVANEY E - High levels of parasite-specific IgG4 in the absence of microfilaremia in *Loa loa* infection. *Trop Med Parasitol*, 1994, **45**, 246-248.
- CARME B, EBIKILI B, MBITSI A & COPIN N - Essai thérapeutique de l'ivermectine au cours de la loase à moyenne et à forte microfilariémie. *Ann Soc Belge Med Trop*, 1991, **71**, 47-50.
- CAUCHIE R, RUTSAERT J, THYS O, BONNYNS M & PERIER O - Encéphalite à *Loa loa* traitée par l'association de cortisone et de carbamazépine. *Rev Belge Pathol Méd Exp*, 1965, **31**, 232-244.
- FAIN A - Les problèmes actuels de la loase. *Bull Org Mond Santé*, 1978, **56**, 155-167.
- FAIN A - Epidémiologie et pathologie de la loase. *Ann SocBelg Med Trop*, 1981, **61**, 277-285.
- GENTILINI M & DUFLO B - Filarioses. In : *Médecine Tropicale* - Paris. Flammarion, 1982, 173-195.
- GOUSSARD B, IVANOFF B, FROST E, GARIN Y & BOUDERIOU C - Age of appearance of IgG, IgGM and IgE antibodies specific for *Loa loa* in Gabonese children. *Microbiol Immunol*, 1984, **28**, 787-792.
- LAL RB & OTTESEN EA - Enhanced diagnostic specificity in human filariasis by IgG4 antibody assessment. *J Infect Dis*, 1983, **158**, 1034.
- LUCIUS R, KERN A, SEEBER F, POGONKA T, WILLENBUCHER J *et al.* - Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33Kd *Onchocerca volvulus* protein (OV33). *Trop Med Parasitol*, 1992, **43**, 139-145.
- NUTMAN T B, ZIMMERMAN PA, KUBOFCIK J & KOSTYU DD - A universally applicable diagnostic approach to filarial and other infections. *Parasitol Today*, 1994, **10**, 239-243.
- RODHAIN F - A propos de la distribution géographique de la loase. *Méd Mal Infect*, 1973, **3**, 429-436.
- TOURE FS, BAIN O, NERRIENET E, MILLET P, WAHL G *et al.* - Detection of *Loa loa* specific DNA in blood from occult-infected individuals. *Exp Parasitol*, 1997, **86**, 163-170.
- TOURE FS, EGWANG TG, MILLET P, BAIN O, GEORGES AJ & WAHL G - IgG4 serology of loiasis in three endemic villages in south-eastern Gabon. *Trop Med Inter Health*, 1998, **3**, 313-317.
- TOURE FS, EGWANG TG, WAHL G, MILLET P, BAIN O & GEORGES AJ - Species-specific sequence in the repeat 3 region of the gene encoding a putative *Loa loa* allergen: a diagnostic tool for occult loiasis. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **56**, 57-60.
- TOURE FS, KASSAMBARA L, WILLIAMS T, BAIN O, MILLET P *et al.* - Human occult loiasis: Improvement in diagnostic sensitivity by the use of polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **59**, 144-149.
- VAN HOEGAERDEN M, CHABAUD B, AKUE JP & IVANOFF B - Filariasis due to *Loa loa* and *Mansonella perstans*: distribution in the region of Okondja, Haut Ogooué Province, Gabon, with parasitological and serological follow-up over one year. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987, **81**, 441-446.
- WEIL GJ, OGUNRINADE AF, CHANDRASHEKER R & KALE OO - IgG4 subclass antibody serology for onchocerciasis. *J Infect Dis*, 1990, **161**, 549-554.