

Apport de la technique polymérase chain reaction dans le dépistage du paludisme en Tunisie.

Contribution of polymerase chain reaction for detection of malaria in Tunisia.

Emna Siala^{1,2}, Rym Essid², Marwa Smiri², Amira Doggui², Ines Ben Sghaier^{1,2}, Karim Aoun^{1,2}, Aida Bouratbine^{1,2}.

1-Université de Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis

2-Institut Pasteur de Tunis, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, LR11-IPT-06
Parasitologie Médicale Biotechnologie et Biomolécules

RÉSUMÉ

Prérequis : En Tunisie, le dépistage du paludisme repose sur l'examen microscopique de la goutte épaisse et du frottis sanguin. Cependant, la performance de ce diagnostic est étroitement liée à l'expérience du biologiste et à la parasitémie.

But : L'objectif de cette étude était d'évaluer l'apport de la PCR dans le cadre du dépistage du paludisme.

Méthodes : Cette étude prospective a concerné 260 étudiants originaires de zones d'endémie palustres et qui ont eu un dépistage du paludisme entre septembre 2011 et juin 2013. Chaque sujet a eu un prélèvement sanguin qui a fait l'objet d'une goutte épaisse, d'un frottis sanguin et d'une PCR nichée multiplex.

Résultats : La PCR a permis de détecter la présence du *Plasmodium* dans 13 prélèvements sanguins (5%). Alors que la microscopie n'était positive que dans 9 cas (3,5%). Les discordances concernaient cinq échantillons négatifs en microscopie et qui étaient positifs en PCR et un échantillon négatif en PCR et positif à la microscopie. Une infection mixte à *Plasmodium falciparum* et à *Plasmodium malariae* a été identifiée par PCR. Pour ce dernier cas, la microscopie n'a permis de diagnostiquer que l'espèce *Plasmodium falciparum*.

Conclusion : La PCR est plus performante que la microscopie dans la détection des parasitémies faibles ; particulièrement observées chez les sujets asymptomatiques. Son introduction permet de diminuer le portage asymptomatique du *Plasmodium* et de réduire le risque d'une reprise de la transmission de cette parasitose dans notre pays.

Mots-clés

Paludisme, dépistage, frottis sanguin, goutte épaisse, PCR, Tunisie.

SUMMARY

Background: In Tunisia, detection of *Plasmodium* in asymptomatic individuals from endemic countries is a critical measure in national program of malaria eradication. The screening is based on microscopic examination of thick and thin blood smears. However, the performance of this diagnosis is closely related to the experience of biologist and the parasitaemia.

Aim : The objective of this study was to evaluate the contribution of the PCR in the screening of malaria.

Methods : This prospective study involved 260 students from malaria endemic areas who were screened for malaria between september 2011 and june 2013. Each subject had a blood sample which was examined for malaria by microscopy and nested multiplex PCR.

Results : PCR detected the presence of *Plasmodium* in 13 blood samples (5%). While microscopy was positive only in nine cases (3.5%). The discordances involved five negative samples at microscopy and which were positive in PCR and a negative sample in PCR which was positive at microscopy. A mixed infection with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* was identified by PCR. For this case, microscopy diagnosed only *Plasmodium falciparum* specie.

Conclusion : PCR is more efficient than microscopy in detecting low parasitaemia ; particularly observed in asymptomatic subjects. This technique allows to reduce asymptomatic carriage of *Plasmodium* and reduce the risk of a resumption of transmission of malaria in our country.

Key- words

Malaria, screening, thin blood smear, thick blood smear, PCR, Tunisia.

Malgré son élimination de la Tunisie en 1979, le paludisme reste l'un des soucis majeurs de santé publique dans notre pays à cause de la persistance de l'anophélisme et de la présence des cas importés [1,2]. Depuis les années 80, un programme national de dépistage du paludisme a été mis en place afin d'assurer la détection rapide de tout portage de *Plasmodium (P)* qui serait un point de départ à toute transmission autochtone [3]. Actuellement, ce dépistage repose sur la goutte épaisse (GE) et le frottis sanguin (FS) qui représentent les techniques de référence du diagnostic du paludisme [4]. Cependant, ces deux techniques nécessitent un personnel expérimenté et un temps de lecture relativement long. De plus, leur sensibilité pour la détection des faibles parasitemies est limitée [5]. Cette situation de pauciparasitisme se rencontre principalement dans le cadre du dépistage du paludisme chez les sujets originaires de zones d'endémie. D'où l'intérêt des techniques d'amplification géniques par biologie moléculaire [6]. Notre étude avait pour objectif l'évaluation de l'apport de la PCR par rapport aux techniques microscopiques dans le cadre du dépistage du paludisme.

PATIENTS ET MÉTHODES

1. Population de l'étude

Il s'agissait d'une étude prospective qui a concerné 260 étudiants non résidents permanents en Tunisie originaires de zones d'endémie palustre et qui sont inscrits dans des établissements universitaires à Tunis. Tous ces étudiants ont bénéficié d'un dépistage systématique du paludisme dans le cadre du contrôle des maladies infectieuses et parasitaires dans notre pays entre septembre 2011 et juin 2013. Chaque étudiant a eu un interrogatoire précisant le nom, l'âge, le sexe, l'origine géographique et la présence ou non d'une symptomatologie clinique. Les individus symptomatiques ou ayant eu un accès palustre dans les deux mois précédents ont été exclus de l'étude.

2. Méthodes

Chaque sujet a bénéficié d'un prélèvement de sang qui a fait l'objet d'une GE, d'un FS et d'une PCR nichée multiplex. Les parasitemies ont été exprimées pour l'espèce *P. falciparum* en pourcentage des globules rouges infectés après lecture d'au moins 100 champs sur le frottis sanguin [7]. La PCR a été réalisée sur un aliquot de sang qui a été conservé à - 20°C. L'extraction d'ADN a été pratiquée en utilisant le kit QIA amp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. Pour la PCR nichée multiplex, nous avons utilisé les amorces qui ont été décrites par Snounou et al ciblant le gène de la sous-unité 18S de l'ARN ribosomale [8]. La première PCR permet la détection du genre *Plasmodium* en utilisant les amorces rPLU5 (CCTGTTGTTGCCTTAACTCC) et rPLU6 (TTAAAATTGTTGCAGTTAAACG). La deuxième PCR permet la différenciation des 4 espèces de *Plasmodium* en une seule étape en utilisant 4 couples d'amorces internes spécifiques des espèces plasmodiales et dont les séquences sont représentées dans le tableau 1. La mise au point et l'évaluation de la sensibilité de la PCR nichée multiplex a été entreprise pour l'espèce *P. falciparum*. Cette technique a une très bonne sensibilité avec une limite de détection à 0,5 parasite/µl de sang.

La première PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 20µl composé des désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dUTP) à

200µM de concentration finale, 0,25 µmol de chacune des deux amorces, 1 unité de Taq Polymerase et 1µl d'ADN extrait des échantillons à analyser. La PCR a été réalisée dans le thermocycleur Biometra-TProfessional. Elle a commencé par une étape de dénaturation à 95°C d'une durée de 5 min suivie de 30 cycles composés d'une étape de dénaturation de 1 min à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces sur l'ADN de 2 min à 58°C et d'une étape d'élongation de 2 min à 72°C. Ces cycles sont suivis d'une élongation finale de 5 min à 72°C et d'un refroidissement à 4°C.

Pour la deuxième PCR spécifique de l'espèce plasmodiale, la composition du MIX a été la même que celle de la première PCR sauf la concentration finale des amorces qui était de 0,4µM. Dans chaque tube PCR, 2µl d'ADN amplifié issu de la première PCR ont été mélangés avec le milieu réactionnel. Le programme d'amplification était le même sauf que la température d'hybridation a été optimisée et fixée à 52°C. Un témoin d'inhibition a été systématiquement utilisé pour tous les échantillons de notre étude. Pour chaque PCR, un témoin négatif (eau distillée à la place de l'ADN) a permis de s'assurer de l'absence de contamination. Les produits d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

RÉSULTATS

Les étudiants originaires de zones d'endémie palustre ont un âge moyen de 23,04 ± 4ans, avec des extrêmes allant de 16 à 35 ans. Ils sont majoritairement de genre masculin (58,9%) avec un sex-ratio égal à 1,43. Ils sont originaires de divers pays d'Afrique subsahariennes ; principalement du Cameroun (26,7%), du Côte d'Ivoire (21,1%) et du Congo (14,4%). Tous ces étudiants étaient asymptomatiques au moment du prélèvement.

Neuf prélèvements sanguins ont été positifs en microscopie soit 3,5%. Tous correspondaient à l'espèce *P. falciparum*. Des gamétocytes ont été mis en évidence chez un patient soit 0,4% des étudiants. Les parasitemies étaient faibles ne dépassant pas 1% et inférieures à 0,01% dans trois prélèvements soit 33,3% des cas (tableau 2). Le diagnostic d'espèce a été établi en présence de formes caractéristiques de trophozoïtes de *P. falciparum* dans deux cas et de gamétocytes dans le troisième prélèvement. Treize prélèvements étaient positifs en PCR nichée multiplex (5%) (Figure 1). Il s'agissait de dix infections à *P. falciparum*, deux infections à *P. ovale* et un cas d'infection mixte à *P. falciparum* et à *P. malariae*. Pour ce dernier cas, la microscopie n'a permis de diagnostiquer que l'espèce *P. falciparum*. La répartition des cas positifs selon le pays d'origine, les résultats de la microscopie et de la PCR est rapportée dans le tableau 2.

Les discordances de la PCR et de la microscopie concernaient cinq échantillons négatifs en microscopie et qui étaient positifs en PCR et un échantillon négatif en PCR et positif à l'examen microscopique. Les résultats de la PCR comparés à ceux de la microscopie sont rapportés dans le tableau 3.

Les cinq prélèvements sanguins qui étaient positifs en PCR et négatifs à la microscopie correspondaient à trois infections à *P. falciparum* et deux infections à *P. ovale*.

Figure 1 : Profil de l'amplification des espèces plasmodiales sur un gel d'agarose à 2% après PCR nichée multiplex

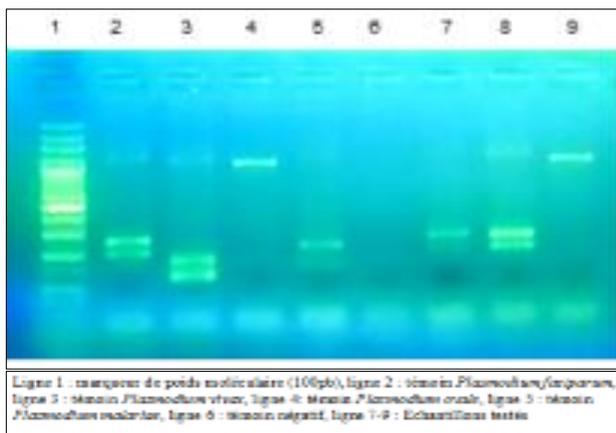


Tableau 1: Séquences des amorces utilisées pour la PCR spécifique des espèces plasmodiales

Amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Taille de l'amplicon
<i>P. falciparum</i>	rFAL1 TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	205 pb
	rFAL2 ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	
<i>P. malariae</i>	rMAL1 ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	144 pb
	rMAL2 AAAATCCCATGCATAAAAAATTATACAAA	
<i>P. vivax</i>	rVIV1 CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120 pb
	rVIV2 ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	
<i>P. ovale</i>	rOVA1 ATCTCTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA	800 pb
	rOVA2 GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG	

Tableau 2 : Résultats de la microscopie et de la PCR chez les paludéens originaires des zones d'endémie

Cas	Origine Géographique	Goutte épaisse	Frottis sanguin	Espèces identifiées	Parasitémie	PCR
1	Cameroun	positive	négatif	<i>P. falciparum</i>	< 0,01%	<i>P. falciparum</i>
2	Côte d'Ivoire	négative	négatif			<i>P. falciparum</i>
3	Congo	négative	négatif			<i>P. ovale</i>
4	Burkina Faso	positive	positif	<i>P. falciparum</i>	0,05%	<i>P. falciparum</i>
5	Côte d'Ivoire	positive	positif	<i>P. falciparum</i>	1%	<i>P. falciparum</i>
6	Cameroun	positive	négatif	<i>P. falciparum</i>	< 0,01%	<i>P. falciparum</i>
7	Côte d'Ivoire	positive	positif	<i>P. falciparum</i>	0,1%	<i>P. falciparum</i>
8	Congo	positive	positif	<i>P. falciparum</i>	0,1%	<i>P. falciparum</i>
9	Cameroun	négative	négatif			<i>P. ovale</i>
10	Côte d'Ivoire	positif	négatif	<i>P. falciparum</i>	< 0,01%	négative
11	Cameroun	négative	négatif			<i>P. falciparum</i>
12	Côte d'Ivoire	positive	positif	<i>P. falciparum</i>	0,5%	<i>P. falciparum</i> et <i>P. malariae</i>
13	Cameroun	positive	positif	<i>P. falciparum</i>	0,2%	<i>P. falciparum</i>
14	Cameroun	négative	négatif			<i>P. falciparum</i>

Tableau 3: Comparaison des résultats de la PCR nichée multiplex avec ceux de la microscopie dans la détection des *Plasmodium* chez les étudiants originaires des zones d'endémie

Technique	Microscopie		Total
	(+)	(-)	
PCR	(+)	8	13 (5%)
	(-)	1	247
	Total	9 (3,5%)	251

DISCUSSION

Parmi les 260 étudiants inclus dans cette étude et qui étaient asymptomatiques, neuf cas de paludisme ont été diagnostiqués par la microscopie (3,5%). Alors que la PCR a permis de détecter 13 infections palustres soit 5%. Cinq prélèvements sanguins étaient positifs à la PCR alors que la GE et le FS étaient négatifs. Ces discordances seraient liées à une sensibilité plus élevée de la PCR [8,9]. En effet, les techniques de biologie moléculaire ont été constamment trouvées plus sensibles que la microscopie [6]. Selon les études, les seuils de sensibilité des différentes PCR ciblant les gènes des *Plasmodium* varient de 0.001 à 30 parasites/ μ l [9-11]. Alors que la microscopie quand elle est réalisée correctement à un seuil de détection de 10 à 20 parasites/ μ l [4]. En plus, les performances du diagnostic microscopique sont étroitement liées à l'expérience du biologiste, au temps de la lecture et à la parasitémie [5]. Ainsi, l'examen microscopique, peut être négatif dans les formes pauciparasitaires ; particulièrement observées chez les ressortissants originaires des zones d'endémie [5]. D'ailleurs, les parasitémies étaient inférieures à 0,01% dans un tiers des cas positifs (33,3%). D'autre part, la microscopie peut se heurter à des difficultés d'identification de l'espèce plasmodiale observées surtout en cas de très faibles parasitémies. D'où l'intérêt des techniques de biologie moléculaire qui sont plus sensibles et plus spécifiques que les méthodes conventionnelles [12].

Un prélèvement sanguin positif en microscopie (positif à la GE et négatif au FS) s'est révélé négatif en PCR. Il faut signaler qu'un témoin d'inhibition a été systématiquement utilisé pour tous les échantillons de notre étude afin de détecter les résultats faussement négatifs par

la PCR. Ce résultat discordant serait donc probablement lié à une erreur d'identification de la microscopie surtout que la parasitémie était très faible. La PCR nichée multiplex a permis de mettre en évidence l'existence d'une infection mixte à *P. falciparum* et à *P. malariae* et dont la microscopie n'a permis de diagnostiquer que l'espèce *P. falciparum*. Dans ce sens, différentes études ont montré que la PCR était plus sensible et plus spécifique que l'examen microscopique pour la détection des infections mixtes [13]. Ceci pourrait s'expliquer par la tendance d'une espèce à dominer l'autre [10].

La PCR nichée multiplex utilisée permet un gain de temps et de réactifs en utilisant plusieurs couples d'amorces ; permettant la détection des 4 espèces plasmodiales en une seule d'étape. En plus, cette technique est adaptée à un grand nombre de prélèvements sanguins, ce qui permettrait de l'appliquer au dépistage du paludisme chez les sujets originaires des zones d'endémie ; surtout que ce diagnostic n'obéit pas à la règle d'urgence imposée chez les sujets symptomatiques et que les prélèvements peuvent être traités en série dans un laboratoire spécialisé. Néanmoins, même si l'introduction de la PCR dans le cadre du dépistage du paludisme s'avère intéressante, le coût de cette technique moléculaire reste élevé comparativement à l'examen microscopique qui représente la technique de référence. En plus, la PCR nécessite un équipement en matériel qui n'est disponible que dans certains laboratoires spécialisés.

La forte proportion de porteurs asymptomatiques de *plasmodium* chez les étudiants originaires des zones d'endémie palustres (5%) témoigne de l'intérêt du dépistage systématique pratiqué en Tunisie dans le cadre de la médecine scolaire et universitaire. Ce portage de parasite pourrait être à l'origine d'une circulation ignorée de gamétocytes parasites pouvant engendrer un cycle parasitaire autochtone [14]. D'ailleurs, 0,4% des étudiants étaient porteurs de gamétocytes ; constituant ainsi un réservoir potentiel du parasite. Ces

individus peuvent donner lieu à une transmission locale du fait de l'existence de l'anophélisme en Tunisie. En effet, les anophèles ont représenté 1 à 3% des larves de moustiques capturés dans les agglomérations urbanisées [15]. Par ailleurs, même si l'évaluation in vitro montre la non réceptivité génétique d'*Anopheles labranchiae* aux souches tropicales de *P. falciparum*, cette espèce serait capable selon une étude de Bouattour *et al* de transmettre *P. vivax* [16]. D'autre part, l'augmentation des températures observées ces dernières années dans notre pays pourrait être favorable à l'installation d'espèces anophéliennes vectrices, importées par les moyens de transport qui assurent de plus en plus de liaisons avec les pays tropicaux. Une telle situation a été observée dans plusieurs pays comme les Etats-Unis, l'Allemagne et l'Italie où on a noté une réintroduction temporaire du paludisme et ce suite à l'importation d'Anophèles vecteurs [17-19]. En dépit de ses avantages dans le dépistage du paludisme, la PCR ne peut remplacer les méthodes classiques de diagnostic de cette parasitose chez les sujets symptomatiques, en raison du temps de réalisation relativement long ; non compatible avec l'urgence diagnostique. Néanmoins, cette technique peut être indiquée pour la détection des faibles parasitémies en cas de forte suspicion et de négativité de l'examen microscopique, particulièrement chez les voyageurs sous chimioprophylaxie et en cas de difficultés dans l'identification des espèces plasmodiales [20].

CONCLUSION

Cette étude montre une meilleure sensibilité de la PCR dans le cadre du dépistage du paludisme. L'utilisation de cet outil moléculaire permet la détection des porteurs du parasite et la réduction du réservoir du *Plasmodium* qui peut être à l'origine d'un cycle parasitaire autochtone.

Références

1. Chadli A, Kennoun MF, Kooli J. Le paludisme en Tunisie: Historique et état actuel. Bull Soc Pathol Exot 1985; 78:844-51.
2. Chahed MK, Bouratbine A, Krida G, Ben Hamida A. Réceptivité de la Tunisie au paludisme après son éradication: analyse de la situation pour une adéquation de la surveillance. Bull Soc Pathol Exot 2001; 94:271-6.
3. Bouratbine A, Chahed Mk, Aoun K, Krida G, Ayari S, Ben Ismail R. Imported malaria in Tunisia. Bull Soc Pathol Exot 1998; 3:203-7.
4. Delaunay P, Estran-Pomares C, Marty P. Diagnostic du paludisme : frottis sanguin, goutte épaisse et tests antigéniques. Med et Mal Infect 2008; 38:121-3.
5. De Gentile L, Geneviève F. Le paludisme d'importation: diagnostic au laboratoire. Rev Fr Lab 2000; 321:25-9.
6. Berry A, Iriat X, Magnaval JF. Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. Rev Franc Lab 2009; 416:65-70.
7. OMS. Basic malaria microscopy: Part I Learner' guide; Part II tutor's guide. World Health Organization, Geneva 1991.
8. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61:315-20.
9. Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval JF. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. Med Trop 2005; 65:176-83.
10. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections undetected by conventional microscopy. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86:609-12.
11. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. Methods Mol Biol 1996; 50:263-91.
12. Proux S, Suwanarusk R, Barends M, et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. Malar J 2011; 10:323.
13. Vivek J, Muralidhar V, Sudha V, Alvin M. Comparison of the clinical profile and complications of mixed Malarial infections of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* versus *Plasmodium falciparum* mono-infection. Sultan Qaboos Univ Med J 2001; 11(3):377-82.
14. Aoun K, Siala E, Tchibkere D, et al. Paludisme d'importation en

E. Siala - Technique polymérase chain réaction dans le dépistage du paludisme

- Tunisie: conséquences sur le risque de réintroduction de la maladie. *Med Trop* 2010; 70:33-7.
15. Ghazi K, Rhaïem A, Bouattour A. Effet de la qualité des eaux sur l'expression du potentiel biotique du moustique *Culex pipiens* dans la région de Ben Arous. *Bulletin de la société entomologique de France* 1997; 102:143-50.
 16. Bouattour A, Rhaïem A, Bach Hamda D. Etude de la capacité vectorielle d'anophèles labranchiae dans la région de Nefza. Rapport du programme de recherche de l'Institut Pasteur de Tunis, soutenu par la coopération française et Agence National de la protection de l'environnement 1993; 1:54-60.
 17. Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, et al. Malaria in Maremma, Italy. *Lancet* 1998; 351:1246-7.
 18. Maldonado Y A, Nahlen BL, Roberto RR, et al. Transmission of *Plasmodium vivax* malaria in San Diego County, California, 1986. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42(1):3-9.
 19. Mantel CF, Klose C, Scheurer S, Vogel R, Wesirou AL, Bienzle U. *Plasmodium falciparum* malaria acquired in Berlin, Germany. *Lancet* 1995; 346:320-1.
 20. Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis F. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J Clin Microbiol* 1999; 37:35-8. Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR spécifique des espèces plasmodiales