

Introduction

- Le paludisme est une maladie infectieuse tropicale responsable selon le rapport de l'OMS de 2022, d'environ 247 millions de cas et de 619000 décès en 2021.
- Cinq espèces de *Plasmodium* sont responsables de la majorité des infections humaines, à savoir *Plasmodium falciparum* (Pf), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium malariae* (Pm), *Plasmodium ovale* spp (Po spp) et *Plasmodium knowlesi* (Pk).
- Un diagnostic précis de cette parasitose est essentiel pour prescrire un traitement adapté. Dans ce contexte, les méthodes moléculaires de PCR en temps réel (qPCR) ont montré une meilleure sensibilité que les méthodes de diagnostic standards et celles-ci sont de plus en plus utilisées dans le diagnostic et la confirmation d'espèces.
- Deux nouveaux coffrets de qPCR sont commercialisés : **RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0** (Altona Diagnostics) et **VIASURE® Real Time PCR Detection Kit** (CerTest Biotec). Les performances de ces deux réactifs ont été évaluées au sein du laboratoire du CNR de paludisme par rapport à une autre qPCR commerciale, **Plasmodium Typage** (BioEvolution), et à une qPCR maison utilisée comme méthode de référence.

Matériel et méthodes

Echantillons cliniques

Au total 92 extraits d'ADN d'isolats reçus au CNR ont été inclus dans cette étude dont 3 négatifs et 89 positifs confirmés par la qPCR maison incluant 39 Pf, 17 Po, 10 Pm, 9 Pv, 1 Pk et 13 infections mixtes (Tableau 1). Les parasitémies étaient variables entre 8 p/μL et 878 000 p/μL toutes espèces confondues.

qPCR d'espèce maison (méthode de référence)

qPCR maison TaqMan adaptée de Schindler et al (Malaria Journal, 2019), qui permet de détecter simultanément les 4 espèces de *Plasmodium* les plus courantes grâce à 2 PCR multiplex : PlasQ (détection de Pf, Pssp et un contrôle d'extraction) et PlasID (détection de Po spp, Pm et Pv).

qPCR commerciales : Plasmodium Typage (BioEvolution), RealStar® Malaria Screen & Type (Altona Diagnostics) et VIASURE® (CerTest Biotec)

Ces trois qPCR TaqMan permettent la détection simultanée des 5 espèces de *Plasmodium* grâce à 2 mix : Mix 1 (détection de Pf, Pv) et Mix 2 (Po spp, Pm et Pk). Un contrôle interne pour évaluer la qualité de l'extraction et contrôler la réaction d'amplification est également inclus dans les coffrets.

Analyse statistique

Les Ct obtenus pour chaque cible et en fonction de la qPCR ont été comparés par le logiciel de statistiques GraphPad Prism.

Résultats

- Bonne spécificité : aucun faux positif obtenu avec les réactifs testés.
- Sensibilité de 94,6% (87/92) pour **RealStar® Malaria Screen & Type PCR** (Altona Diagnostics) et de 93,5% (86/92) pour **VIASURE® Real Time PCR Detection kit** (CerTest Biotec) contre 93,5% (86/92) pour la **Plasmodium Typage** (BioEvolution).

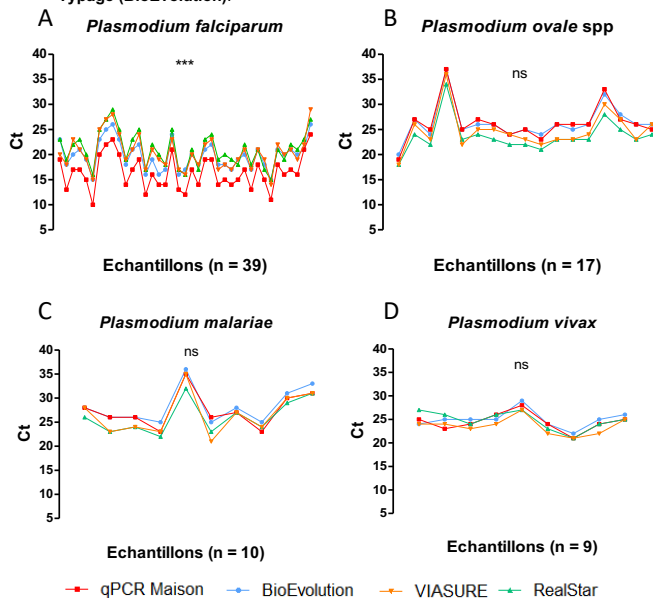


Figure 1 : Comparaison des Ct obtenus pour chaque échantillon en fonction de la cible et de la qPCR utilisée

- La comparaison des Ct montre que (Figure 1) :
 - Pour la cible Pf, la qPCR maison est la plus sensible ($P < 0.0001$).
 - Pour les autres cibles, il n'y a pas de différence significative.
- Sensibilités proches pour les trois qPCR commerciales évaluées.

Tableau 1 : Résultats positifs en fonction de la cible avec les différents réactifs testés par rapport à la qPCR maison

	qPCR Maison	BioEvolution	RealStar®	VIASURE®
Pf (n = 39)	39	39	39	39
Po (n = 17)	17	17	17	17
Pm (n = 10)	10	10	10	10
Pv (n = 9)	9	9	9	9
Pk (n = 1)	-	1	1	1
Pf/Pm (n = 2)	Pf 2 Pm 2	2 2	2 2	2 2
Pf/Po (n = 6)	Pf 6 Po 6	3 6	4 6	3 6
Pf/Pv (n = 2)	Pf 2 Pv 2	0 2	0 2	0 2
Po/Pm (n = 3)	Po 3 Pm 3	2 3	2 3	2 3

- Les infections monospécifiques ont toutes été détectées par les trois qPCR évaluées, malgré des parasitémies variables (Tableau 1).
- Pour les infections mixtes, **38%** (5/13) n'ont pas été détectées par la qPCR **RealStar®** (Altona) contre **46%** (6/13) pour les qPCR **BioEvolution** et **VIASURE®**.
- Dans les associations, l'espèce plasmodiale non détectée était celle avec de faibles charges parasitaires ($Ct > 30$), dont 5 Pf et 1 Po.

Discussion et conclusion

En termes de sensibilité :

- RealStar® Malaria Screen & Type PCR** (Altona Diagnostic) est la qPCR commerciale la plus sensible.
- Les réactifs évalués présentent des sensibilités proches pour les espèces autres que Pf, sensiblement mieux qu'avec la qPCR maison de référence (avec des Ct plus bas).
- La sensibilité de ces réactifs pour la cible Pf est moins bonne que la qPCR de référence.
- Des discordances ont été observées pour les associations d'espèces avec un défaut de détection de l'espèce minoritaire.

Pour conclure, les deux réactifs testés ont une bonne sensibilité et peuvent être intéressants pour le diagnostic moléculaire du paludisme.