



Evaluation du kit Ampliflash® Malaria dans le diagnostic moléculaire du paludisme d'importation

Azza Bouzayene^{1,2}, David Iragena¹, Rizwana Zaffaroullah¹, Véronique Sarrasin^{1,2}, Sandrine Houzé^{1,2}
1. CNR du Paludisme, APHP, Hôpital Bichat Claude-Bernard, Paris; 2. MERIT UMR 261 Université Paris Cité, Paris, France.



Introduction

- Le paludisme est une maladie infectieuse tropicale causée par un parasite du genre *Plasmodium* et transmise par la pique d'un moustique anophèle femelle.
- Cinq espèces de *Plasmodium* sont pathogènes chez l'homme à savoir *Plasmodium falciparum* (Pf), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium malariae* (Pm), *Plasmodium ovale* spp (Po spp) et *Plasmodium knowlesi* (Pk).
- Le diagnostic standard repose sur l'examen microscopique des frottis sanguins et gouttes épaisses colorés permettant l'identification de l'espèce en cause et l'estimation de la charge parasitaire.
- Les tests de diagnostic rapide (TDR) du paludisme peuvent être un complément au diagnostic microscopique du paludisme pour les personnels non expérimentés, particulièrement pour le diagnostic de Pf mais ils peuvent être en défaut pour les autres espèces.
- Dans ce contexte, les méthodes de détection moléculaire trouvent leur intérêt grâce à leur sensibilité et spécificité supérieures aux méthodes conventionnelles.
- Un nouveau kit d'amplification d'ADN rapide, Ampliflash® Malaria, est commercialisé par la société Biosynex. Les performances de ce réactif ont été évaluées au sein du laboratoire du CNR du Paludisme de l'Hôpital Bichat Claude-Bernard par rapport à la méthode de référence Alethia® Malaria (Meridian Bioscience).

Matériel et méthodes

Echantillons cliniques

Des prélèvements de sang total reçus au CNR réalisés sur des patients suspects de paludisme au retour d'une zone d'endémie ainsi que des prélèvements de patients pour le suivi de l'efficacité thérapeutique après traitement ont été inclus.

Confirmation microscopique

Le diagnostic microscopique sur frottis et goutte épaisse colorés a été confirmé au sein du CNR du Paludisme.

Les prélèvements étaient considérés négatifs si aucun parasite n'était observé après la lecture de 100 champs microscopiques sur la goutte épaisse et positifs si au moins une forme asexuée de *Plasmodium* était observée.

Alethia Malaria (LAMP)

Tous les prélèvements inclus ont été testés par la méthode d'amplification rapide, Alethia® Malaria (Meridian Bioscience) suivant les recommandations du fournisseur avec une prise d'essai de 50 µl de sang total et un temps d'obtention de résultats de 40 minutes.

Ampliflash® Malaria

La cohorte de prélèvements inclus a été testée avec le réactif Ampliflash® Malaria selon les recommandations du fournisseur avec une prise d'essai de 5 µl de sang total et un temps d'obtention de résultats de 25 minutes (Figure 1).

qPCR d'espèce maison

Une PCR en temps réel détectant les 5 espèces de *Plasmodium* a été réalisée sur tous les échantillons de cette étude pour la confirmation du diagnostic et l'identification de l'espèce plasmodiale selon un protocole développé au CNR du Paludisme.

PROCEDURE EN 3 ETAPES



Figure 1: Mode opératoire du Biosynex Ampliflash® Malaria

Résultats

- Au total, 71 prélèvements de J0 et 41 prélèvements de suivi thérapeutique ont été inclus dans cette étude (N_{total}=112).
- La répartition des J0 était la suivante : 39 positifs à Pf, 11 à Po, 4 à Pm, 3 à Pv, 2 à Pk, 2 co-infection Pf/Pm et 10 négatifs.
- Les parasitémies pour les prélèvements positifs étaient comprises entre 0,2 p/µl et 382 500 p/µl.
- Spécificité de **100%** : aucun faux positif obtenu par rapport à la qPCR.
- Sensibilité de **98,3%** et **96,7%** par rapport à l'Alethia® Malaria et à la qPCR respectivement.
- L'étude des prélèvements de suivis thérapeutiques (J3, J7, J14 et J28) a montré une persistance d'ADN plasmodiale concordante avec la qPCR, bien que la sensibilité était moins bonne pour les J tardifs.

Tableau 1: Performance du réactif Ampliflash® Malaria par rapport à la LAMP et la qPCR dans le cadre du diagnostic (J0)

| | qPCR TaqMan maison | Alethia® Malaria (Meridian Bioscience) | Ampliflash® Malaria (Biosynex) |
|------------------------|--------------------|--|--------------------------------|
| Pf (n= 39) | 39 | 39 | 38 |
| Po (n=11) | 11 | 10 | 10 |
| Pm (n=4) | 4 | 4 | 4 |
| Pv (n=3) | 3 | 3 | 3 |
| Pk (n=2) | 2 | 2 | 2 |
| Pf+Pm (n=2) | 2 | 2 | 2 |
| Négatifs (n=10) | 10 | 10 | 10 |

Tableau 2: Performance du réactif Ampliflash® Malaria par rapport à la LAMP et la qPCR dans le cadre du suivi de l'efficacité thérapeutique

| Suivis | qPCR TaqMan maison | | Alethia®Malaria (Meridian Bioscience) | | Apmliflash®Malaria (Biosynex) | |
|------------------|--------------------|-----|---------------------------------------|----------|-------------------------------|----------|
| | POS | NEG | POS | NEG | POS | NEG |
| J3 (n=19) | 19 | - | 19 | - | 19 | - |
| J7 (n=12) | 12 | - | 11 | 1 | 10 | 2 |
| J14 (n=2) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| J28 (n=8) | 7 | 1 | 4 | 4 | 5 | 3 |

Discussion et Conclusion

- Le test Ampliflash® Malaria a présenté d'excellentes performances dans le contexte d'un diagnostic initial de paludisme permettant d'exclure un accès palustre pour la totalité des prélèvements négatifs inclus et de confirmer le diagnostic d'accès palustre quelle que soit l'espèce responsable de l'accès.
- Ces performances sont proches de celles de l'Alethia® Malaria, utilisé en routine dans un grand nombre de laboratoires de biologie médicale en France.
- La procédure est simple et rapide avec un temps de manipulations d'environ 5 minutes et un temps d'amplification de 25 minutes.
- La prise d'essai de 5 µl assure la réalisation de ce test même sur des petits volumes d'échantillons.
- La réalisation de la totalité de la réaction en tube fermé évite les risques de contamination.
- Ce test présente l'avantage d'identifier précisément la présence de *P. falciparum* en plus de la détection de *Plasmodium spp.*
- Il y a un contrôle interne pour valider l'étape d'extraction et d'amplification des échantillons.
- Le système de lecture permet de visualiser les courbes d'amplification en temps réel grâce aux sondes fluorescentes présentes dans le mélange réactionnel.
- La persistance d'un résultat positif dû à la détection d'ADN plasmodial au cours des traitements des accès à *P. falciparum* a déjà été montré avec des méthodes de PCR, et peut être due à la présence de gamétocytes qui peuvent persister au moins 3 semaines malgré un traitement antipaludique.
- Ampliflash® Malaria a montré une bonne sensibilité et spécificité et peut être considéré comme un outil rapide et sûr pour le diagnostic moléculaire du paludisme.