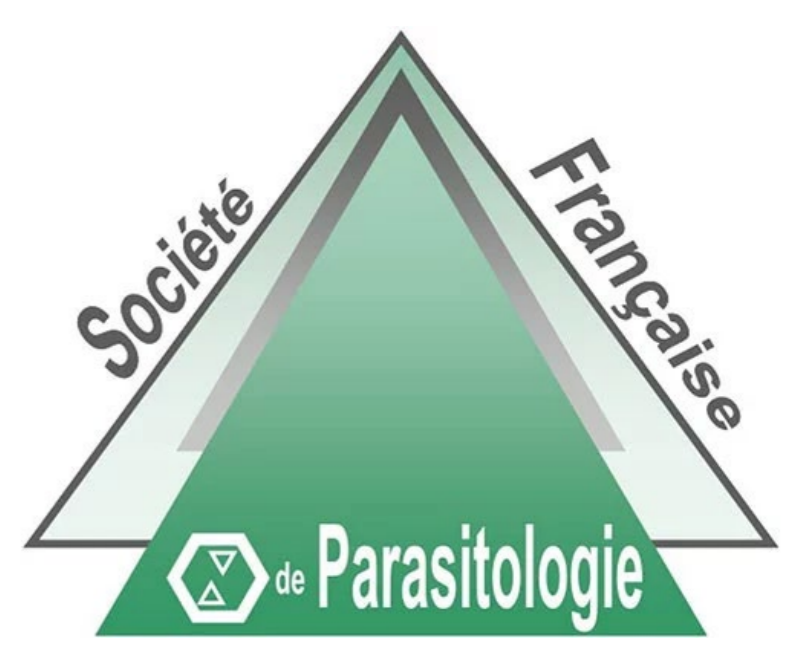




Evaluation du kit EasyNAT® Malaria dans le diagnostic moléculaire du paludisme d'importation

Azza Bouzayene^{1,2}, David Iragena¹, Rizwana Zaffaroullah¹, Véronique Sarrasin^{1,2}, Sandrine Houzé^{1,2}
¹CNR du Paludisme, APHP, Hôpital Bichat Claude-Bernard, Paris; ²MERIT, 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 piqûre d'une 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, l'EasyNAT® Malaria, est commercialisé par la société Appolon Biotech (Chaponnay, France). 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 Alethia® Malaria (Meridian Bioscience).

MATERIEL ET METHODES

Echantillons cliniques

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

Confirmation microscopique

Une confirmation du diagnostic par observation microscopique (frottis et goutte épaisse) a été réalisée au 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 analysés 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.

EasyNAT® Malaria

La cohorte de prélèvements inclus a été analysée parallèlement avec le réactif EasyNAT® Malaria selon les recommandations du fournisseur avec une prise d'essai de 50 µL de sang total et un temps d'obtention de résultats de 49 minutes (Figure 1).

qPCR d'espèces 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 par le CNR du Paludisme. Les résultats de cette méthode ont été considérés comme de référence.

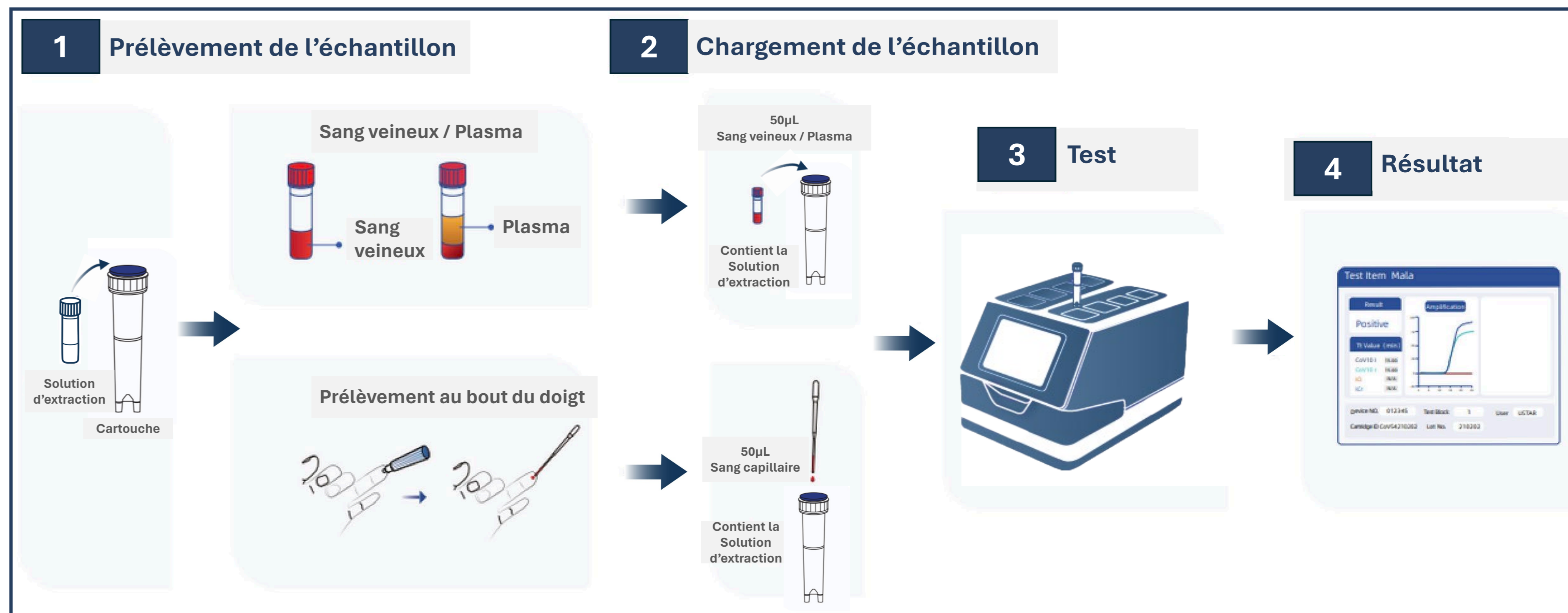


Figure 1: Mode opératoire de l'EasyNAT® Malaria Assay



Figure 2: Le réactif EasyNAT® Malaria et l'automate d'amplification EasyNAT® Ustar

RESULTATS

- Au total, 91 prélèvements diagnostiques J₀ et 55 prélèvements de suivi thérapeutique ont été inclus dans cette étude (N_{total}=146).
- La répartition des J₀ était la suivante : 48 positifs à Pf, 14 positifs à Po, 9 positifs à Pm, 4 positifs à Pv, 2 positifs à Pk, 3 co-infection Pf/Pm et 11 prélèvements négatifs (Tableau 1).
- Les parasitémiés pour les prélèvements positifs étaient comprises entre 0,02 p/µL et 382 500 p/µL.
- Spécificité (100%) : aucun faux positif n'a été obtenu par rapport à la qPCR.
- Sur les prélèvements de diagnostic, la sensibilité de la méthode EasyNAT® Malaria était de 97,5% et celle de l'Alethia® Malaria de 96,25% par rapport à la qPCR (Tableau 1) avec un échantillon négatif par la méthode Alethia® Malaria qui était positif par les techniques EasyNAT® et qPCR (Tableau 1).
- L'étude des prélèvements de suivis thérapeutiques (J3, J7, J14 et J28) chez des patients qui avaient tous présenté une guérison clinique et parasitologique a montré une persistance d'ADN plasmodiale concordante avec la qPCR mais avec une détection moins fréquemment positive avec la technique EasyNAT® par rapport à la qPCR surtout pour les J tardifs (Tableau 2).

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

	qPCR TaqMan maison	Alethia® Malaria (Meridian Bioscience)	EasyNAT® Malaria (Ustar Biotechnologies)
Pf (n= 48)	48	46	47
Po (n=14)	14	13	13
Pm (n=9)	9	9	9
Pv (n=4)	4	4	4
Pk (n=2)	2	2	2
Pf+Pm (n=3)	3	3	3
Négatifs (n=11)	11	11	11

Tableau 2 : Performance du réactif EasyNAT® 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)		EasyNAT® Malaria (Ustar Biotechnologies)	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
J3 (n=18)	18	-	18	-	18	-
J7 (n=13)	13	-	12	1	11	2
J14 (n=6)	6	-	5	1	5	1
J28 (n=18)	14	4	9	9	5	13

DISCUSSION ET CONCLUSION

- Le test EasyNAT® Malaria a présenté d'excellentes performances dans le contexte du 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 comparables à celles de l'Alethia® Malaria, utilisée en routine dans un grand nombre de laboratoires de biologie médicale en France.
- Cette méthode de biologie moléculaire ne nécessite pas de compétences particulières pour sa mise en œuvre, ou pour l'utilisation du matériel dédié. Ce test peut être effectué sur du sang total, du plasma, du sang du bout du doigt ainsi que sur du sang hémolysé.
- La procédure est très simple et rapide avec moins de manipulations par rapport aux autres techniques testées; la réalisation de la totalité de la réaction en tube fermé évite les risques de contamination.
- Ce test cible une région conservée du gène ARNr 18S de *Plasmodium* avec une limite de détection annoncée par le fournisseur à 6 copies/ µL.
- Un contrôle interne est inclus qui repose sur la détection de la séquence d'un gène humain pour contrôler l'étape d'extraction et d'amplification des échantillons.
- L'automate permet de visualiser les courbes d'amplification en temps réel grâce aux sondes fluorescentes présentes dans le mélange réactionnel.
- Ce test ne permet pas l'identification de l'espèce plasmodiale responsable de l'infection.