



Article Original

Facteurs Influençant l'Utilisation des Tests de Diagnostic Rapides du Paludisme dans les Analyses Moléculaires au Burkina Faso

Factors Influencing the Use of Rapid Diagnostic Tests for Malaria in Molecular Analyses in Burkina Faso

Koudraogo Bienvenue Y¹, Akoua E¹, Franck Adama Y¹, Rakiswendé Serge Y^{1,2}

Affiliations

- Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) Bobo-Dioulasso, Burkina Faso
- Institut des Sciences et Techniques, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Auteur correspondant

Dr Koudraogo Bienvenue Yaméogo

Tel: +22671706405

Email: yamkbienvenue@yahoo.fr

Mots clés : Tests de Diagnostic rapides, Plasmodium spp. ADN, PCR

Key words: Rapid Diagnostic Tests, Plasmodium, DNA, PCR

RÉSUMÉ

Introduction. L'ADN extrait des cassettes des tests de diagnostics rapides (TDRs) peut être utilisé dans les analyses moléculaires. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet du temps, du mode de conservation et de la densité parasitaire sur l'ADN de *Plasmodium* extrait des TDRs **Méthodologie.** L'étude a été conduite dans 8 villages du district sanitaire de Dandé avec des TDRs confectionnés à partir de gouttes épaisses positives de 19 enfants âgés de 5 à 12 ans, puis conservés à température ambiante avec ou sans gel de silice. L'ADN a été extrait une semaine, deux semaines, un mois et deux mois plus tard. La quantité et la qualité de l'ADN ont été mesurées au nanodrop, suivie d'une PCR classique. **Résultats.** Nous avons réalisés 121 TDRs chez nos 19 participants. Aucun des paramètres étudiés n'a eu un effet significatif sur la quantité et la qualité de l'ADN ni individuellement ni mis ensemble (F=2, P=0,80). Les quantités d'ADN les plus élevées ont été observées après une semaine de conservation, et avec les fortes densités parasitaires. **Conclusion.** La qualité et la quantité de l'ADN extrait semblent liées au temps de conservation et à la densité parasitaire.

ABSTRACT

Introduction. DNA extracted from rapid diagnostic test (RDT) cassettes can be used in molecular analysis. The objective of this study is to evaluate the effect of time, storage mode, and parasite density on Plasmodium DNA extracted from RDTs. **Methodology.** The study was conducted in 8 villages in the Dandé health district using RDTs made from positive thick blood smears of 19 children aged 5 to 12 years, then stored at room temperature with or without silica gel. DNA was extracted one week, two weeks, one month, and two months later. The quantity and quality of the DNA were measured using a nanodrop, followed by a standard PCR. **Results.** We performed 121 RDTs on our 19 participants. None of the parameters studied had a significant effect on the quantity and quality of the DNA, either individually or combined (F=2, P=0.80). The highest quantities of DNA were observed after one week of storage and with high parasite densities. **Conclusion.** The quality and quantity of the extracted DNA appear to be related to the storage time and parasite density.

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* demeure une priorité sanitaire dans plusieurs pays notamment en Afrique [1, 2]. Le diagnostic précis du paludisme permet une prise en charge rapide ce qui favorise la réduction de la mortalité de la maladie. La méthode classique de diagnostic du paludisme est l'observation microscopique de parasites dans une préparation de goutte épaisse ou d'un frottis minces sanguins. Dans les zones reculées, la microscopie optique n'est pas disponible, et la prise en charge des cas de paludisme repose principalement sur le diagnostic de *Plasmodium* à l'aide de Tests de Diagnostic Rapides (TDRs) dont l'usage ne requiert ni équipement électrique, ni aménagements de laboratoire. Les autres avantages des TDRs sont leur facilité d'utilisation, la facilité

d'interprétation des résultats, leur faible coût. Les TDRs dans le cadre du diagnostic du paludisme, détectent la présence d'antigènes spécifiques du parasite, soit la protéine riche en histidine 2 spécifique de *Plasmodium falciparum* (PfHRP-2), soit la lactate déshydrogénase de *Plasmodium* (pLDH) ou l'aldolase [3, 4]. En outre, plusieurs études ont démontré que l'ADN parasitaire extrait des cassettes des TDRs peut être utilisé comme sources d'ADN dans le cadre des études génétiques [5, 6].



POUR LES LECTEURS PRESSÉS**Ce qui est connu du sujet**

L'ADN extrait des cassettes des tests de diagnostics rapides (TDRs) peut être utilisé dans les analyses moléculaires.

La question abordée dans cette étude

Effet du temps, du mode de conservation et de la densité parasitaire sur l'ADN de *Plasmodium* extrait des TDRs

Ce que cette étude apporte de nouveau

Les quantités d'ADN les plus élevées ont été observées après une semaine de conservation, et avec les fortes densités parasitaires.

Les implications pour la pratique, les politiques ou les recherches futures.

Des études ultérieures pourraient être menées pour mieux cerner l'effet de ces paramètres.

Les cassettes des TDRs pourraient remplacer ainsi les spots de sang ou les échantillons de sang dont la collecte exige beaucoup d'investissement. Cependant, la quasi-totalité de ces études n'ont pas pu explorer tous les paramètres qui pourraient influencer la qualité et la quantité de l'ADN. De plus, pour déterminer la présence de *P.falciparum*, les techniques d'amplification très sensible de qPCR et de PCR nichée ont été utilisées [6-8]. Si la PCR sur les extraits des TDRs est utilisée comme méthode de référence pour le contrôle de la qualité des TDRs, la sensibilité élevée de cette technique pourrait être une autre limite à son utilisation.

Dans la présente étude, en utilisant une PCR classique nous évaluons l'effet du temps, du mode de conservation, et de la densité parasitaire sur l'ADN extrait des TDRs chez des enfants de 5 à 12 ans dans la région de l'Ouest du Burkina Faso.

PATIENTS ET MÉTHODES

L'étude a été conduite dans le district sanitaire de Dandé, localité située à 75 Km de Bobo-Dioulasso à l'ouest du Burkina Faso dans la région des Hauts-bassins. Elle a été menée dans huit villages du district sanitaire à savoir Séguéré, Zangoma, Padema, Kokoroba, Mossibougou, Koundougou, Dandé, Samandeni (Figure 1). La population estimée en 2020 était de 305 148 habitants et les cas de paludisme rapportés étaient de 8 419 cas avec une létalité de 0,2% [9, 10]. La population d'étude était composée des enfants de 5 à 12 ans des deux sexes vivant dans les villages sélectionnés et dont les parents ou tuteurs (tutrices) légaux ont donné leurs consentements. Étaient exclus de l'étude les enfants dont l'âge était inférieur à 5 ans, car d'une part ils sont très vulnérables et d'autre part ils étaient sous chimio-prévention du paludisme. Les enfants dont l'âge était supérieur à 12 ans étaient exclus car avec cette tranche d'âge les sujets peuvent manifester la maladie avec des parasitemies faibles.

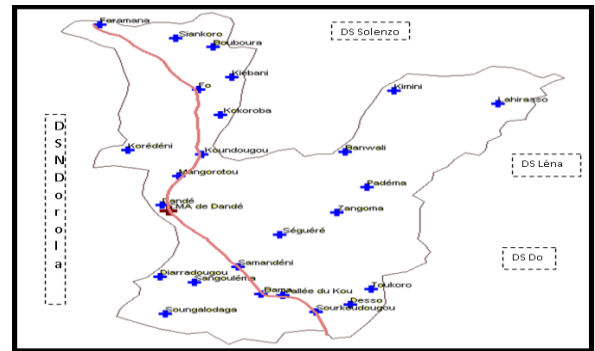


Figure 1. Carte du district sanitaire de Dandé (Source : protocole MMVC, 2017)

- **Réalisation des gouttes épaisses et des tests de diagnostics rapides**

Les gouttes épaisses (GE) de sang sur lames ont été réalisées pour effectuer la recherche de *Plasmodium*. Les GE ont été ensuite colorées au giemsa 10% pendant 10 minutes, séchées et lues à l'objectif 100X à immersion. Après la lecture des GE et l'estimation de la densité parasitaire, les enfants ayant une charge parasitaire comprise entre 1000 et 50000 parasites par μl de sang ont été sélectionnés pour la réalisation des TDRs.

Les TDRs utilisés dans cette étude sont des TDR mixtes spécifiques à *Plasmodium falciparum* et aux autres espèces (Malaria pLDH (Pf/PAN)). Les TDRs ont été réalisés suivant les instructions du fabricant.

- **Mode et temps de conservation**

Les TDR ont été séchés sur la palliasse pendant 24h à la température ambiante de la salle. Après 24 heures, soit le lendemain, ils ont été rangés individuellement dans des sachets de conditionnement et conservés dans un bocal avec du gel de silice et sans gel de silice.

Pour étudier l'impact du temps, sur l'ADN extrait des TDRs les différents délais de conservation pour l'ensemble des échantillons stockés ont été 7 jours, 14 jours 30 et 60 jours. La température et l'humidité ont été relevées tous les matins et soirs dans la salle de conservation.

- **Extraction et dosage de l'ADN**

L'ADN a été extrait pour la recherche du gène de *P.falciparum*, à partir de la bande de nitrocellulose provenant des cassettes de TDR.

Brièvement, à l'aide un scalpel, la cassette de TDR a été ouverte latéralement, puis avec une pince, la bande de nitrocellulose à l'intérieur de la cassette de TDR a été retirée et déposée sur du papier essuie tout propre. La bande a été découpée avec une paire de ciseaux stérile en 5 parties de 1 cm environ chacune. Entre chaque TDRs le matériel de découpage a été plongé dans de l'eau de javel 10% puis rincer dans de l'eau distillée pour éviter les contaminations.

Les 5 parties de la bande de nitrocellulose obtenue ont été placés dans un tube eppendorf 1,5 mL stérile pour la suite de l'extraction avec les Kits QIamp DNA miniKit (Qiagen, Germany) suivant les instructions du fabricant. Les ADN obtenus ont ensuite été dosés au NonoDrop (Thermo Scientific NanoDrop Lite) pour évaluer la qualité et la quantité avant l'amplification. Le Nano Drop utilisé dans notre étude a permis de réaliser des spectres

d'absorbance pour micro-volume sans cuvette ni capillaire. L'ADN a été considéré « pur » pour un ratio A260/A280 compris entre 1,8 à 2 et avec la concentration d'une valeur comprise entre 0,2 à 27500ng/μL.

Amplification moléculaire

Une PCR classique a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques de l'ADN mitochondrial du gène Cox 1 de *P. falciparum* : F 3'GGAATGTTATTGCTAACAC 5' et R 3' AATGAAGAGCTGTGTATC 5'. L'amplification a été réalisée avec le thermocycleur Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler selon le protocole de Morassin *et al* (2002) [11]. Les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. La révélation des fragments s'est faite au moyen d'un Trans illuminateur ultraviolet. La taille attendue pour *P. falciparum* a été de 422 paires bases. L'étude a obtenu l'avis favorable sous le numéro CRES-N°2018-9-118 du Comité d'Ethique pour la Recherche en Santé du Burkina Faso.

Les données collectées ont été saisies à l'aide du logiciel Microsoft Excel version 2013. Le traitement et l'analyse statistique de ces données ont été réalisés à l'aide du logiciel R version (3.6.0). Un modèle linéaire à effet mixte (glmm) a testé les effets du mode de conservation, du temps et de la densité parasitaire sur la quantité d'ADN. L'importance des variables a été établie à l'aide d'un test du rapport de vraisemblance (LRT), qui est distribué approximativement comme une distribution khi 2(x). Le test de Chi-carrée a été utilisé pour comparer les proportions avec un seuil de significativité de 5%.

RÉSULTATS

Nous avons obtenu un effectif total de 19 participants âgés de 5 à 12 ans positifs à *P. falciparum* sur la goutte épaisse. Nous avons réalisés 121 TDRs parmi lesquels 68 ont été conservés sans gel de silice et 53 conservés avec le gel de silice. La densité parasitaire moyenne était de 15278,02 parasites par microlitre (p/μL) avec une densité minimale de 1440p/μL et une maximale de 52608p/μL. La température moyenne de la salle de conservation était de 25,68±6,12°C et l'humidité moyenne était de 56,9±0,6%. La quantité moyenne d'ADN était de 3,98 ± 1,4ng/μL alors que l'absorbance moyenne était de 1,69±0,3. La relation entre le temps, le mode de conservation et la densité parasitaire sur l'ADN est présentée ci-dessous (**Tableau I**). Les analyses ne montrent pas d'effet statistiquement significatif du temps sur la quantité d'ADN extrait des TDRs (LRT $\chi^2 = 2,45$, F = 3 p=0,48) malgré des variations observées. La quantité d'ADN la plus élevée a été observée après sept jours de conservation tandis que la plus faible est obtenue à 14 jours de conservation. On a observé une baisse de la quantité d'ADN dans l'intervalle de temps entre 7 jours et 14 jours. Une hausse non significative a été observée entre le 14^{ème} jour et le 30^{ème} jour avant que la quantité d'ADN ne baisse au jour 60. La quantité d'ADN la plus élevée a été observée avec les densités parasitaires les plus grandes au jour 7. Cependant, de façon globale, la densité parasitaire n'a pas eu d'effet significatif sur la quantité d'ADN (LRT $\chi^2 = 0,96$, F = 1, p = 0,33).

Tableau I. Relation entre les différents paramètres et la quantité d'ADN

Variables	χ^2	F	P
Densité	0,96	1	0,33
Mode de conservation (mc)	0,04	1	0,85
Temps	2,45	3	0,48

Les interactions de ces paramètres n'ont également pas eu d'effet statistiquement significatif sur la quantité d'ADN (**Tableau II, Figure 2**).

Tableau II. Interaction entre les différents paramètres de la quantité d'ADN.

Variables	χ^2	F	P- value
Densité*Mc	2,09	1	0,15
Densité* Temps	2,06	3	0,56
Mc*Temps	5,20	3	0,16
Densité*Mc*Temps	0,47	2	0,80

Au jour 7 et jour 60 la quantité d'ADN a été la plus élevée, lorsque les TDRs ont été conservés sans gel de silice. Par contre au cours de la même période, les TDRs conservés dans du gel de silice ont eu une quantité d'ADN plus élevée.

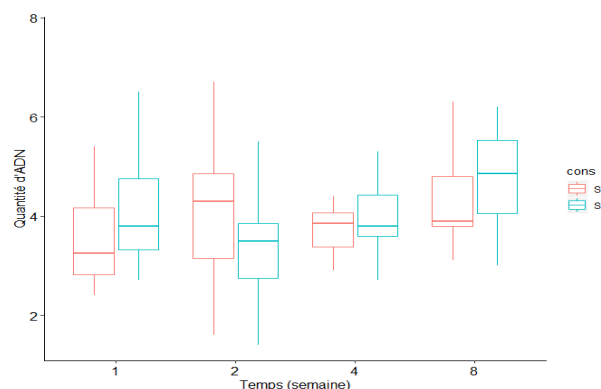


Figure 2. Effet du mode de conservation sur la quantité d'ADN en fonction du temps.

S⁺ : Conservation avec du gel de silice

S⁻ : Conservation sans gel de silice

L'amplification par PCR a donné une proportion de 99,2% (120/121) résultats positifs (Figure 3). Seul un échantillon conservé pendant 60 jours sans gel de silice n'a pas donné de bande après amplification même après deux reprises.

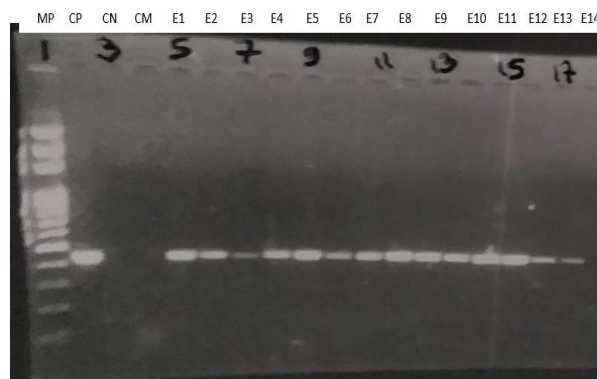


Figure 3. Photo d'un gel d'agarose montrant les bandes d'ADN après électrophorèse

Laboratoire de biologie moléculaire IRSS, MP=marqueur de poids (100bp), CP=contrôle positif, CN=contrôle négatif extraction, CM=contrôle Mix, E1-E15=échantillons.

DISCUSSION

Durant la L'utilisation des tests de diagnostic rapide basée sur la détection d'antigène de *Plasmodium* est un élément essentiel de la prise en charge des cas de paludisme. Dans cette étude notre objectif était d'identifier l'effet d'un certain nombre de facteurs sur l'ADN extrait des cassettes de TDR. L'intérêt étant de fournir les meilleures conditions pour l'utilisation directe des TDRs dans les analyses moléculaires.

De façon globale, aucun des paramètres étudiés n'a eu un effet négatif sur l'ADN extrait. Des variations cependant ont été observées. Le temps de conservation semble avoir un effet sur la quantité. En effet, la plus grande quantité d'ADN a été extrait lorsque le temps de conservation était plus court (7jours). Au-delà de 14 jours de conservation, la quantité d'ADN n'a pas connu une variation linéaire. Ce qui suggère qu'une utilisation des TDRs comme source d'ADN est optimale lorsque le temps de conservation est le plus court possible. Malgré ces variations, l'amplification par PCR classique a permis de détecter la présence de *Plasmodium falciparum*. Ce résultat corrobore ceux d'autres études [5, 6], qui en utilisant d'autres techniques d'extraction et une PCR quantitative ont montré que les cassettes de TDRs peuvent être de bonne sources d'ADN même après un temps de conservation respectif de 36 et 14 mois. Ces études ont utilisé soit la qpcr comme technique d'amplification qui est plus sensible, capable d'amplifier des ADN de faible teneur, ou et d'autres techniques d'extraction. Or dans notre cas nous avons utilisé une PCR classique moins sensible. La densité parasitaire n'a pas eu d'effet ni sur la quantité, ni sur la qualité de l'ADN extrait. La forte densité parasitaire (supérieure à 1000p/uL) utilisée dans notre étude pourrait expliquer ce résultat même si dans leurs travaux, plusieurs auteurs ont montré qu'une densité parasitaire inférieure à la nôtre permettaient l'obtention d'ADN de bonne qualité [3].

Le stockage des TDR pendant 60 jours avec ou sans gel de silice n'a pas affecté la qualité de l'ADN extrait selon la limite de détection de la PCR dans les échantillons même si un échantillon conservé pendant 60 jours sans gel de silice n'a pas pu être amplifié. En combinaison, les facteurs temps de conservation, mode de conservation, et densité parasitaire, aucun effet sur la quantité de l'ADN extrait ni sur l'amplification. Ce qui traduirait que les conditions définies dans notre étude mises ensemble sont bonnes pour avoir de l'ADN de qualité provenant des TDRs.

Un inconvénient de notre étude est qu'elle s'est limitée seulement à 60 jours et tous les TDRs ont été conservés au laboratoire alors que dans la pratique, ils sont exposés dans des conditions plus drastiques de température et d'humidité. Des études ultérieures devraient être menées au-delà de ce temps et de mode conservation.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons démontrés que l'ADN extrait des cassettes de TDRs est de quantité et de qualité suffisante pour les analyses moléculaires de *Plasmodium* en utilisant une PCR classique. Ainsi, l'utilisation des TDRs comme source d'ADN, est une opportunité à saisir pour réduire les investissements liés à la collecte d'échantillons de sang pour les analyses moléculaires. Une seconde vie des TDRs de par les bandes de nitrocellulose contenues dans les cassettes pourrait donc être envisagée pour optimiser les analyses de suivi de la résistance des *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques.

CONFLIT D'INTERET

Cette étude n'est sujet à aucun conflit d'intérêt, ses résultats sont authentiques et n'ont jamais été publiés auparavant.

RÉFÉRENCES

1. OMS (2022) Rapport paludisme 2022. Geneva <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-UCN-GMP-2022.07>
2. Mbono R, Eposse C, Kamo H, et al (2023) Aspects Thérapeutiques et Évolutifs du Paludisme Grave de l'Enfant dans Trois Hôpitaux de Référence au Cameroun Management and Outcome of Severe Childhood Malaria in Three Reference Hospitals of Cameroon. Heal Sciences Dis 24:32–36. <http://www.hsd-fmsb.org/index.php/hsd>
3. Ishengoma DS, Lwitiho S, Madebe RA, et al (2011) Using rapid diagnostic tests as source of malaria parasite DNA for molecular analyses in the era of declining malaria prevalence. Malar J 10:6. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-6>
4. Natama HM, Traoré TE, Rouamba T, et al (2023) Performance of PfHRP2-RDT for malaria diagnosis during the first year of life in a high malaria transmission area in Burkina Faso. J Parasit Dis 47:280–289. <https://doi.org/10.1007/s12639-023-01566-x>
5. Veron V, Carme B (2006) Short report: recovery and use of *Plasmodium* DNA from malaria rapid diagnostic tests. 74:941–943. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.941>
6. Nabet C, Doumbo S, Jeddi F, et al (2016) Analyzing Deoxyribose Nucleic Acid from Malaria Rapid Diagnostic Tests to Study *Plasmodium falciparum* Genetic Diversity in Mali. 94:1259–1265. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0832>
7. Cnops L, Boderie M, Gillet P, et al (2011) Rapid diagnostic tests as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-67>
8. Robinson A, Busula AO, Muwanguzi JK, et al (2019) Molecular quantification of *Plasmodium* parasite density from the blood retained in used RDTs. Sci Rep 1–8. <https://doi.org/http://10.1038/s41598-019-41438-0>
9. Ministère de la santé du Burkina Faso (2021) Annuaire statistique 2020. Ouagadougou
10. Ministère de l'économie des finances et de la prosective du Burkina Faso (2022) Annuaire statistique 2021
11. Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF (2002) One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. Am J Trop Med Hyg 66:503–508. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.503>