

# Apport de la PCR nichée dans le diagnostic du paludisme d'importation dans le Sud algérien

## Contribution of nested PCR in the diagnosis of imported malaria in southern Algeria

L. Bouiba · B. Gassen · M. Gasmî · D. Hammadi · Z. Harrat

Reçu le 6 mars 2016 ; accepté le 2 août 2016  
© Société de pathologie exotique et Lavoisier SAS 2016

**Résumé** La PCR nichée a été utilisée pour évaluer son apport et ses limites dans le diagnostic du paludisme et pour évaluer la performance des microscopistes dans la surveillance de la maladie dans le Sud de l'Algérie. Durant la période de 2010-2015, 112 patients dont 93 fébriles et 19 asymptomatiques originaires d'Afrique subsaharienne ont été adressés au laboratoire de l'hôpital de la wilaya de Tamanrasset pour le diagnostic du paludisme. Une partie du sang prélevé à la pulpe du doigt a servi pour la confection de frottis et de goutte épaisse et l'autre partie a été absorbée dans du papier filtre pour le diagnostic moléculaire. La PCR nichée a permis de détecter le parasite dans 63 échantillons contre 53 à l'examen microscopique, de mettre en évidence 11 infections mixtes et de diagnostiquer 6 cas positifs non détectés à la microscopie. Deux échantillons négatifs à la PCR nichée avaient été déclarés positifs à l'examen direct. La PCR nichée est plus sensible que l'examen direct dans la détection des parasitemies infra microscopiques et les infections mixtes.

**Mots clés** Paludisme d'importation · Infections mixtes · Frottis mince et goutte épaisse · PCR nichée · Tamanrasset · Algérie · Afrique subsaharienne

**Abstract** The nested PCR was used to estimate its inputs in malaria diagnosis and in the performance of the microscope

---

L. Bouiba (✉) · Z. Harrat  
Laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations. Institut Pasteur d'Algérie, Route du petit Staoueli, Dely-Ibrahim Alger, Algérie  
e-mail : lazhari\_bouiba@hotmail.com

B. Gassen  
Service d'épidémiologie et de médecine préventive, établissement public hospitalier de Tamanrasset, Algérie

M. Gasmî · D. Hammadi  
Laboratoire de référence national du paludisme, Institut national de santé publique

operators involved in the surveillance of malaria in remote areas of South Algeria. For the period 2010 to 2015, 112 patients (93 febrile and 19 asymptomatic) coming from sub-Saharan Africa were tested for malaria in the hospital of Tamanrasset. One part of the blood taken from fingertip was used for blood smears and the second part was absorbed in filter paper for molecular diagnosis. Overall, the infection was detected by nested PCR in 63 samples versus 53 by direct examination. In addition, 11 mixed infections and 6 positive asymptomatic cases not detected by microscopy were diagnosed by PCR. Moreover, two negative samples in nested PCR were tested positive by direct examination. The molecular tool is more sensitive than the direct examination in detecting infra-microscopic parasitaemia and mixed infections...

**Keywords** Imported malaria · Mixed infections · Thin and thick smear · Nested PCR · Tamanrasset · Algeria · Sub-Saharan Africa

## Introduction

En Algérie, au nord du pays, la campagne d'éradication du paludisme lancée en 1968 a abouti à l'arrêt de la transmission et à l'absence de notification de cas de *P. falciparum* dès 1975. Le dernier foyer à *P. vivax* a été signalé en 1991 [10]. Depuis, aucune transmission locale du paludisme n'a été signalée. Dans les wilayas (départements) du sud du pays, non concernées par l'éradication, l'apparition récurrente des cas de paludisme à *P. vivax* dans les oasis de Ouargla, Ghardaïa et Djanet et à *P. falciparum* à Tamanrasset montrent la vulnérabilité et la réceptivité des agglomérations situées le long de la route transsaharienne, qui devrait lier Alger à Lagos [8,17].

L'intensification des échanges commerciaux et du flux transfrontalier de personnes, le programme de développement économique des régions du sud, les effets de la variabilité climatique et la présence de vecteurs efficaces tels

*Anopheles sergentii* et *An. multicolor* [20], constituent un enjeu important et un défi pour l'élimination du paludisme dans le Sud algérien. En Algérie, le diagnostic du paludisme dans les hôpitaux des wilayas du sud du pays repose principalement sur le frottis et goutte épaisse (FGE). Le test de diagnostic rapide a été introduit récemment grâce au concours de l'OMS. Le contrôle de toutes les lames positives et de 10 % des lames négatives est effectué au niveau du laboratoire central d'élimination du paludisme à l'Institut national de santé publique (INSP). Notre travail consiste à faire une mise au point de la technique PCR nichée pour le diagnostic du paludisme et l'identification des espèces en cause dans le but de l'introduire dans le système de contrôle de qualité et d'améliorer la performance des microscopistes.

## Patients et méthodes

Cette étude porte sur un total de 112 patients adressés au laboratoire de l'hôpital de Tamanrasset pour suspicion de paludisme. Une fiche de renseignements établie pour chaque patient comporte son identification (nom prénom, âge, sexe, nationalité, adresse et fonction), les antécédents de paludisme, les signes cliniques (fièvre, céphalées, troubles digestifs, etc.) et la prise de médicaments antipaludiques. Un prélèvement de sang à la pulpe du doigt est effectué pour la confection du FGE et pour le recueil du sang sur papier filtre whatman (FTA® Elute microcard) pour le diagnostic moléculaire. Chaque papier portant le numéro d'identification du patient est conservé au réfrigérateur dans un sachet individuel en plastique. Le FGE est réalisé selon le protocole de l'OMS [13] et la lecture faite par deux microscopistes ayant plus de 15 ans d'expérience. Les lames positives à l'examen direct sont contrôlées par le laboratoire de référence du paludisme à l'INSP.

L'ADN est extrait à l'aide d'un kit (Pure Link Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen réf : K1820-02) selon le protocole du fabricant. Le cercle contenant le sang séché est imbibé dans 180 µl du tampon de digestion avec 20 µl de protéinase K, puis incubé à 55 °C pendant 2 heures. Le produit récupéré est mis en suspension avec 20 µl de RNase A et laissé à

température ambiante pendant 2 minutes, ensuite 200 µl du tampon de lyse et 200 µl d'éthanol sont ajoutés. Le lysat obtenu (620 µl) est récupéré dans la colonne fournie avec le kit, puis centrifugé à 10 000 g pendant 1 min ; suivi de deux lavages avec 500 µl de tampon et centrifugé pendant 3 min. À la fin, l'ADN extrait est remis en suspension dans 50-200 µl de tampon et conservé à +4 °C ou stocké à -20 °C.

Nous avons adapté et utilisé la méthode de diagnostic moléculaire « PCR nichée », mise au point par Snounou et al [25]. La PCR nichée se fait en deux temps. La première amplification (PCR1) est réalisée avec la paire d'amorces (rPLU5/rPLU6) ciblant le gène qui code pour l'ARNr 18S (Tableau 1). Ce dernier dispose de zones hautement conservées dans le genre *Plasmodium*, alternant avec des zones à séquences variables d'une espèce plasmodiale à une autre. Le protocole de la réaction PCR1 est effectué dans un volume total de 50 µl avec les concentrations finales des réactifs suivants : solution Q (Qiagen) 1X, paire d'amorces 1 µM, tampon de Taq 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, dNTP 1mM, 1.5U de Taq polymérase (Qiagen) et 5 µl d'ADN [23]. L'amplification est réalisée dans le thermocycleur de marque « Techne Genius » suivant le programme : un cycle de dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, suivi de 30 cycles 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 30 cycles sont suivis d'une élongation finale à 72 °C (4 min). Les produits d'amplification sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %, colorés au bromure d'éthidium (BET) et les bandes révélées sous ultraviolet. Pour la PCR 2 spécifique de l'espèce plasmodiale, deux paires d'amorces sont ajoutées à chaque réaction: (rFAL1/rFAL2 avec rVIV1/rVIV2) ou bien (rOVA1/rOVA2 avec rMAL1/rMAL2) (Tableau 1). Elles permettent d'amplifier une séquence bien spécifique à l'intérieur du produit d'amplification positif de la PCR1, identifiant ainsi l'espèce parasitaire en cause pour les échantillons positifs [25]. Le protocole et le programme d'amplification sont les mêmes que ceux de la première PCR1 sauf le volume de l'ADN qui se limite à 1 µl.

Un témoin positif, un témoin négatif et un témoin de contamination (eau distillée) de la PCR1 et PCR 2 sont

**Tableau 1** Nom et séquence nucléotidique des amorces utilisées pour la PCR nichée / Name and nucleotide sequence of the primers used for nested PCR.

Amorce sens 3'- 5'	Amorce sens 3'- 5'
rPLU5 3'CTTCAAATTCGGTTGTTGTCC5'	rVIV1 3'CATAGTCAATACACCTAATTCGATCTTCGC5'
rPLU6 3'GCAAAATGACGTTGTTAAAATT5'	rVIV2 3'ATTCCTGAAAGAAACGAAGCC-GAACCTTCAS'
rFAL1 3'TTATATAACCAAAAGGGTTTGGTCAAATT5'	rMAL1 3'AAACATATTAATAAATACGTACCCTTAAAA5'
rFAL2 3'CTGCCATCAGTACTAAGTAACACAS5'	rMAL2 3'TAATCCTATGTTAATTACACAGGAAAAGGG5'
rOVA1 3'AGAGGTTATGATTTTTATCGTTTTCTCTA5'	rOVA2 3'TAATCCTATGTTAATTACACAGGAAAAGGG5'

inclus à chaque test. Les échantillons négatifs sont contrôlés trois fois avant la notification du résultat. La PCR nichée avec des amorces spécifiques (Tableau 1) a été mise au point avec des échantillons positifs et négatifs confirmés par le laboratoire de référence du paludisme à l'INSP et adaptée pour le sang séché sur papier whatman.

## Résultats

Les cas proviennent du Niger (32 cas), Mali (22 cas), Côte d'Ivoire (2 cas), Burkina Faso (1 cas), Nigeria (1 cas) et non déterminé (7 cas). Les patients positifs sont majoritairement de nationalité algérienne (46/65 soit 70 %), le plus souvent des commerçants. Aucun décès n'a été enregistré.

Pour les 112 échantillons examinés, la PCR nichée a permis de détecter le parasite dans 63 cas (56 %) contre 49 cas (43 %) à l'examen microscopique ainsi que la détection de 11 infections mixtes non révélées par l'examen direct.

Dans trois cas positifs, l'espèce identifiée n'était pas concordante entre les deux méthodes de diagnostic (examen direct et moléculaire). Pour les 65 cas positifs, en additionnant les résultats des deux techniques, *P. falciparum* est pré-

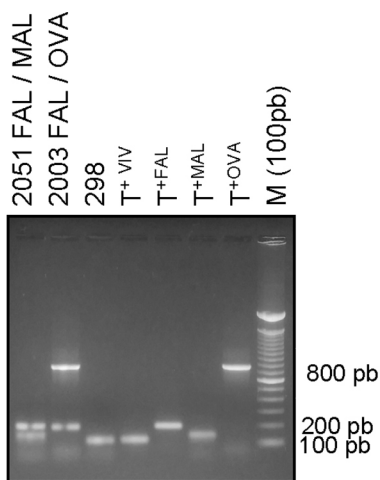
sent dans 70 % des échantillons, suivi de *P. malariae* avec 26 %, puis *P. vivax* avec 10 % et enfin *P. ovale* avec 7 % (Tableau 2).

Parmi les 19 sujets asymptomatiques, 6 étaient positifs uniquement à la PCR nichée, dont un avec une infection mixte (*P. falciparum* et *P. malariae*). Onze infections mixtes à *P. falciparum*/*P. malariae* (7), *P. falciparum*/*P. ovale* (3), et *P. falciparum*/*P. vivax* (1), non détectées à l'examen direct ont été révélées à la PCR nichée (Fig. 1). La microscopie a permis de déceler des stades sexués (gamétocytes) chez trois patients. Enfin, 2 échantillons négatifs en PCR avaient été déclarés positifs à l'examen direct.

## Discussion

En Algérie, la wilaya de Tamanrasset, carrefour important d'échanges commerciaux avec les pays subsahariens d'Afrique de l'Ouest, se développe et bénéficie d'un accès à l'eau de l'aquifère du Sahara. Avant 1990, les enquêtes séro-épidémiologiques effectuées dans cette wilaya montraient l'inexistence, ou une très faible transmission, du paludisme [2]. À partir des années 1990 et suite à l'ouverture de

Espèces identifiée	PCR nichée positive	Taille de la bande obtenue (PCR nichée)	Examen direct positif (FGE)
<i>Plasmodium falciparum</i>	46 (dont 11 infections mixtes)	205pb	33
<i>Plasmodium malariae</i>	17 (dont 8 infections mixtes)	145pb	6
<i>Plasmodium vivax</i>	7 (dont 1 infection mixte)	120pb	9
<i>Plasmodium ovale</i>	5 (dont 3 infections mixtes)	787pb	1



8

2051 : patient à infection mixte falciparum/malariae.  
 2003 : patient à infection mixte falciparum/ovale.  
 298 : présence d'une bande de 205pb, *P. vivax* ;  
 T<sup>+VIV</sup>: patient témoin positif *P. vivax*  
 T<sup>+FAL</sup>: patient témoin positif *P. falciparum*.  
 T<sup>+MAL</sup>: patient témoin positif *P. malariae*.  
 T<sup>+OVA</sup>: patient témoin positif *P. ovale*  
 M : marqueur de taille 100pb (0.9µg).  
 Gel d'agarose 1.5%

**Fig. 1** Résultats de PCR nichée des infections mixtes / *Results of nested PCR mixed infections*

la route transsaharienne, Tamanrasset est devenue la wilaya où est notifié le plus grand nombre de cas de paludisme d'importation venant principalement du Niger et du Mali [9]. Selon le relevé épidémiologique mensuel de l'INSP, durant la période de 2000 à 2014, 3 697 cas de paludisme dont 3 601 cas importés et 96 indigènes, ont été déclarés. La majorité des cas sont dus à *P. falciparum*. Au Sud de Tamanrasset, dans la localité de Tinzaouatine, située en bordure de la frontière avec le Mali, le vecteur identifié est *An. coluzzi* du complexe *gambiae* [3].

L'OMS considère la microscopie comme la technique de référence pour le diagnostic du paludisme [14]. Les tests rapides ciblant les antigènes spécifiques à l'espèce (PfHRP2), sont maintenant largement utilisés et sont aussi spécifiques que la microscopie de routine dans le diagnostic du paludisme à *P. falciparum* [13]. Au cours de la dernière décennie, des techniques d'amplification d'acide nucléique hautement sensibles et spécifiques (PCR nichée, PCR Multiplex RT-PCR, PCR en temps réel) ont été développées pour le diagnostic du paludisme [16,19]. Cependant, ces tests nécessitent souvent des équipements sophistiqués et sont nettement plus chers que la microscopie et les TDR. Il faut garder à l'esprit que les symptômes cliniques n'apparaissent qu'à partir d'une certaine parasitémie (seuil pyrogénique), qui varie selon le statut immunitaire, l'âge de l'individu et son état général. Le résultat du test biologique n'est pas obligatoirement corrélé avec la symptomatologie [18]. Les premières méthodes moléculaires pour le diagnostic du paludisme ont été publiées au cours des années 1980. Elles reposaient en majorité sur l'hybridation de sondes spécifiques à des motifs hautement répétés dans le génome de *P. falciparum* [1,8]. Une autre méthode permettait d'identifier les quatre espèces humaines grâce à la détection de séquences spécifiques dans l'ARN ribosomal 18S (ARNr 18S), une molécule très abondante dans le cytoplasme du parasite [26]. Le gène de cet ARNr 18S a ensuite été la cible d'une nouvelle méthode de diagnostic par PCR nichée capable de distinguer les quatre espèces infectant l'homme [21,22,24]. Dans notre étude, parmi les 112 sujets examinés, la PCR nichée a dépisté 63 cas de paludisme (56 %) alors que la microscopie n'a permis de confirmer que 49 cas (43 %). Cette différence des résultats est liée à une sensibilité de détection plus élevée de la PCR qui peut atteindre une densité <1 parasites/ $\mu$ l alors qu'une microscopie de qualité ne peut détecter une parasitémie inférieure à 50 parasites/ $\mu$ l [24]. L'amplification moléculaire de la petite sous-unité 18S de l'ARN ribosomal décrite par Snounou et al [24] complétée par une PCR avec amorces spécifique d'espèce [25] est actuellement la plus utilisée dans les centres de référence du paludisme pour le dépistage des infections sub-cliniques, les infections mixtes et la surveillance épidémiologique [23,25]. Les techniques d'amplification génique sont devenues indispensables pour les études épidémiologiques sur le

paludisme [15], l'analyse de la parasitémie dans les essais contrôlés et la recherche sur la résistance aux antipaludiques [4,6], car elles sont plus sensibles et plus spécifiques que la microscopie et les TDR. Les sujets asymptomatiques négatifs en microscopie, mais positifs en PCR, peuvent être classés comme des porteurs de parasites indétectables par la microscopie. Les porteurs sains, notamment des formes sexuées, représentent un risque pour la population lorsque les conditions écologiques de transmission et de réceptivité du parasite sont réunies [11]. La positivité de la PCR n'est pas nécessairement un indicateur de la présence de parasites au stade érythrocytaire, car l'ADN peut provenir de parasites au stade pré-érythrocytaire. Dans notre étude, les deux cas positifs en microscopie et négatifs en PCR nichée concernent des échantillons datant de 5 ans. Le temps de conservation pourrait être un facteur limitant la performance. La PCR nichée a mis en évidence l'existence de 11 infections mixtes non détectées à l'examen direct. Ceci rejoint les différentes observations qui ont montré que la PCR nichée était plus sensible et plus spécifique que l'examen microscopique pour la détection des infections mixtes [5,7]. Parmi les infections mixtes, l'association *P. falciparum*/*P. malariae* est la plus fréquente.

## Conclusion

La microscopie et les TDR sont largement utilisés pour le diagnostic du paludisme dans les centres de santé et ils gardent toute leur place pour le diagnostic du paludisme dans les situations d'urgence. Néanmoins, ces méthodes ne sont pas adaptées pour la détection des très faibles parasitémies et des infections mixtes. Parmi les rares cas de paludisme observés dans le Sud algérien, la technique de PCR nichée confirme la qualité du travail des microscopistes. Elle est utile pour la recherche des parasitémies très basses qui pourraient être à l'origine d'une transmission.

**Remerciements** Nous remercions vivement le personnel du laboratoire de l'hôpital de Tamanrasset, en particulier Hama Boudjemaa et Daoudi Abdelkader pour leur précieuse contribution dans ce travail. Ce travail a bénéficié d'un financement partiel du projet ACIP A-02-2014.

Liens d'intérêts : les auteurs n'ont pas précisé leurs éventuels liens d'intérêts.

## Références

1. Barker RH Jr, Suebsaeng L, Rooney W, et al (1986) Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. Science 231(4744):1434-6

2. Benzerroug EH, Janssens PG (1985) La surveillance du paludisme au Sahara algérien. Bull Soc Pathol Exot 78(5 Pt 2):859–67
3. Boubidi SC, Gassen I, Khechache Y, et al (2010) *Plasmodium falciparum* malaria, Southern Algeria, 2007. Emerg Infect Dis 16(2):301–3.
4. Bousema T, Okell L, Shekalaghe S, et al (2010) Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. Malar J 9:136
5. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK (1992) Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections undetected by conventional microscopy. Trans R Soc Trop Med Hyg 86(6):609–12
6. Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M (1999) Development of a Plasmodium PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. J Clin Microbiol 37(1):35–8
7. Fontecha GA, Mendoza M, Banegas E, et al (2012) Comparison of molecular tests for the diagnosis of malaria in Honduras. Malar J 11:119–123
8. Franzén L, Westin G, Shabo R, et al (1984) Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. A novel approach to malaria diagnosis. Lancet 1(8376):525–8
9. Hammadi D, Boubidi SC, Chaïb SE, et al (2009) Le paludisme au Sahara algérien. Bull Soc Pathol Exot 102(3):185–92 [http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T102-3-3356-8p.pdf]
10. Kabrane A (1995) Paludisme en Algérie : situation épidémiologique. J Prat 12:60–64
11. Marangi M, Di Tullio R, Mens PF, et al (2009) Prevalence of *Plasmodium* spp. in malaria asymptomatic African migrants assessed by nucleic acid sequence based amplification. Malar J 8:12
12. OMS (2012) Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme : manuel pratique. Genève. 165 p
13. OMS (2014) Techniques de bases pour le diagnostic microscopique du paludisme. Partie I. Guide du stagiaire. 2<sup>e</sup> Edition. 85 p
14. OMS (2015) Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs (2014-2015). Geneva. 141 p
15. Padley D, Moody AH, Chiodini PL, Saldanha J (2003) Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. Ann Trop Med Parasitol. 97(2):131–7
16. Peipei Li, Zhenjun Zhao, Ying Wang, et al (2014) Nested PCR detection of malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological surveys. Malaria J 13:175
17. Ramsdale CD, de Zulueta J (1983) Anophelism in the Algerian Sahara and some implications of the construction of a trans-Saharan highway. J Trop Med Hyg 86(2):51–8
18. Roper C, Elhassan IM, Hviid L, et al (1996) Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. Am J Trop Med Hyg 54(4):325–31
19. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al (2004) Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol 42(12):5636–43
20. Senevet G, Andarelli L (1956) Les anophèles de l'Afrique du Nord et du Bassin Méditerranéen. Encyclopédie Entomologique, Edition Paul Lechevallier. Paris VI. (France). 290 p
21. Siala E, Essid R, Smiri M, et al (2015) Apport de la technique PCR dans le dépistage du paludisme en Tunisie. La Tunisie Médicale 12(93):766–70
22. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, et al (1999) A genus and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies Am J Trop Med Hyg 60(4):687–92
23. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, et al (1993) Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 58(2):283–92
24. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP; et al (1993) High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 61(2):315–20
25. Snounou G, Singh B (2002) Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. Methods Mol Med 72:189–203
26. Waters AP, McCutchan TF (1989) Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. Lancet 1(8651):1343–6