

LA CARACTERISATION GENETIQUE DE TOXOPLASMA GONDII CHEZ LES PATIENTS DU SERVICE DE BIOLOGIE DE L'HOPITAL DERMATOLOGIQUE DE BAMAKO (EX CNAM)

GENETIC CHARACTERIZATION OF TOXOPLASMA GONDII IN PATIENTS OF THE BIOLOGY DEPARTMENT OF THE BAMAKO DERMATOLOGICAL HOSPITAL (EX CNAM)

LASSINE DOUMBIA², YACOUBA KOUMARE², SIDI DIALLO²,
DJENEBA SY¹, OUSMANE KOÏTA³, SOMITA KEÏTA³

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) / Unité de zoonoses,

²Faculté des Sciences et Techniques / USTTB, Colline de Badalabougou, Bamako

³Hôpital dermatologique de Bamako, Mali (ex CNAM)

Auteur correspondant : Dr Djeneba Sy, Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) / Unité de zoonoses, syllasyd@yahoo.fr

Résumé

Toxoplasma gondii, appartient au règne des Protistes (Protozoaires) en général transmis de manière directe des mains à la bouche puis avalé, suite au contact d'un animal infecté. Les symptômes sont des adénopathies et dans la forme congénitale une calcification intracrânienne suite à une infection du fœtus par voie transplacentaire entre le 4^{ème} et 9^{ème} mois de la grossesse (2), une dilatation ventriculaire, des perturbations neurologiques (convulsions, hypotonie) et des anomalies oculaires graves ("choriorétinite toxoplasmiques"), les cas graves entraînent la mort du fœtus. Suite à des sondages sur la toxoplasmose en zone tropicale Africaine (Centrafrique, Mali, Niger, Burkina F. et Togo), les tests qui ont été effectués chez les humains pour détecter la prévalence d'anticorps, ont donné des taux de 40% dans les villages nord de Centrafrique et le taux le plus élevé a été obtenu au Mali avec 70%. (3). La présente étude préliminaire transversale a pour objectif de déterminer la prévalence sérologique de la toxoplasmose chez les patients consultants des Services de Biologie du CNAM, afin de faire l'état des lieux en ce qui concerne cette zoonose majeure. Les résultats obtenus par le test de TOXO screen DA, ont donné sur un total de 280 échantillons de sérum, 99 sérums positifs avec les pourcentages de 32,32 et 67,67 chez les femmes et les hommes respectivement. Les résultats de la RT – PCR montrent des bandes positives à *Toxoplasma gondii*, avec 200 Pb. Sur un total de 9 échantillons testés, 7 sont positifs, démontrant une infection des patients testés, avec une prédominance hommes chez le 4/7. La prévalence élevée de 36,36% de positifs est indicative d'une source d'infection géographique commune et étendue, qui n'est pas isolée.

Mots clés: Toxoplasmose, patients consultants, test Toxo Screen DA/ PCR, Hôpital Dermatologique (CNAM).

Abstract

Toxoplasma gondii, belongs to the Kingdom of Protists (Protozoa) generally transmitted directly from the hands to the mouth and then swallowed, following contact with an infected animal. The symptoms are lymphadenopathy and in the congenital form intracranial calcification following infection of the fetus by the transplacental route between the 4th and 9th month of pregnancy (2), ventricular dilation, neurological disturbances (convulsions, hypotonia) and anomalies severe ocular ("toxoplasma chorioretinitis"), severe cases lead to the death of the fetus. Following surveys on toxoplasmosis in the African tropical zone (Central Africa, Mali, Niger, Burkina F. and Togo), the tests which were carried out in humans to detect the prevalence of antibodies, gave rates of 40% in the northern villages of the Central African Republic and the highest rate was obtained in Mali with 70%. (3). This preliminary cross-sectional study aims to determine the serological prevalence of toxoplasmosis in patients consulting the Biology Services of the CNAM, in order to take stock of the situation regarding this major zoonosis. The results obtained by the TOXO screen DA test, gave on a total of 280 serum samples, 99 positive sera with the percentages of 32.32 and 67.67 in women and men respectively. The RT-PCR results show positive bands for *Toxoplasma gondii*, with 200 Pb. Out of a total of 9 samples tested, 7 are positive, demonstrating an infection of the patients tested, with a male predominance in 4/7. The high prevalence of 36.36% positives is indicative of a common and widespread geographic source of infection, which is not isolated.

Keywords: Toxoplasmosis, consulting patients, Toxo Screen DA/ PCR test, Dermatological Hospital (CNAM).

1. Introduction

Aujourd'hui les agents pathogènes sont transportés dans le monde plus vite que la période d'incubation moyenne de la plupart des maladies. Le nombre des facteurs de risque influençant l'émergence des agents pathogènes s'est considérablement accru au cours des dernières décennies (réchauffement climatique de certaines régions du monde, modification des pratiques d'élevage, du comportement humain et la multiplication de nouveaux vecteurs potentiels).

Au Mali l'ampleur des zoonoses et leur diversité sur le plan de la santé publique pourraient évoluer défavorablement si les mesures nécessaires ne sont pas prises. L'objectif général de cette étude est de déterminer la prévalence sérologique de la toxoplasmose chez les patients consultants des Services de Biologie du CNAM, afin de faire l'état des lieux en ce qui concerne cette zoonose majeure. L'objectif spécifique est de déterminer la prévalence sérologique de cette zoonose en utilisant les techniques d'analyses de laboratoire simples et rapides et pour la caractérisation du germe par la technique de biologie moléculaire.

2. Matériel et Méthode

L'étude a été faite dans la commune IV du District de Bamako, au niveau du Centre National d'appui à la lutte contre la Maladie. Etude prospective transversale, qui s'est étalée sur une période de 6 mois.

Ont été inclus dans cette étude, les tous venants pour les analyses au niveau du laboratoire des Services de Biologie, après leur consentement éclairé et pour les moins de 18 ans et les personnes âgées l'assentiment éclairé, sans spécificité de tranche d'âge, de sexe, d'ethnie, de profession et de religion. Sont exclus de cette étude les patients non consentants et les parents et accompagnants n'acceptant pas de signer l'assentiment.

Suite à une enquête prospective menée sur la brucellose dans la ville de Ségou, une prévalence de 5,14% a été obtenue chez les personnes ayant participés à cette enquête (4), ce pourcentage a été utilisé pour le calcul de l'échantillonnage.

Pour ce modèle d'enquête fondé sur un échantillonnage aléatoire simple, on a calculé la taille d'échantillons requise en appliquant la formule suivante de Schwartz,

Formule :

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2}$$

Explication :

n = taille d'échantillon requise

t = niveau de confiance à 95% (valeur type de 1,96)

p = prévalence estimative de la brucellose (5,14%)

m = marge d'erreur à 5% (valeur type de 0,05)

$$n = \frac{1.96^2 \times .5,14(1-.5,14)}{.05^2}$$

$$n = 326.99 \sim 327$$

Avec cette formule, la taille de l'échantillon est d'environ 327 patients. Durant 3 mois au moins 16 patients seront enquêtés par jour (du lundi au vendredi) au niveau des Services de Biologie.

Les sérums seront collectés au niveau du laboratoire, et seront diagnostiqués par le kit de **Toxo Screen DA kit** (IgG). Sérodiagnostic de la toxoplasmose par agglutination de particules sensibilisées (technique sur plaques de micro titration) est un test qualitatif pour la recherche des IgG. La technique nécessite une pré-dilution des contrôles de sérum positifs et négatifs au 1/20 et de l'antigène dilué au 1/5. Les sérums contrôlent et à tester sont distribués au préalable et la suspension d'antigènes est par la suite rajoutée, la plaque est recouverte d'une feuille autocollante et laissée à la température ambiante pour une incubation de 5 à 18h suivie de la lecture.

PCR à Temps Réel :

Séparation des cellules mononuclées du sang périphérique

En vue d'extraire l'ADN de *Toxoplasma* qui est un parasite intracellulaire, nous avons procédé d'abord à la séparation des cellules mononuclées du sang périphérique en mélangeant bien le sang dans le tube EDTA. Environ 3 ml de Ficoll ont été mis dans un tube de 15 ml (tube Falcon) ensuite 3 ml de sang total ont été ajoutés doucement aux 3 ml du Ficoll. Le mélange a été centrifugé à 2000 tours/minute pendant 23 minutes (Centrifugeuse de type Eppendorf). A l'aide d'une pipette de transfert, la couche cellulaire entre le plasma et le culot globulaire a été prélevée. La couche leucocytaire est mise dans un tube de 15 ml de type Falcon et ensuite une série de lavage est faite avec du PBS (1X) en centrifugeant à 2000 tours/mn et cela 2 fois. A la fin, le culot leucocytaire est suspendu avec 500 µl du PBS 1x et ensuite conservé à -20°C. Pour vérifier le rendement de la séparation, nous avons compté le nombre de cellule obtenu en utilisant 10 µl de la suspension avec ajout de 10µl du trypan bleu et le comptage a été fait avec la cellule de Mallasse.

Extraction de l'ADN de *Toxoplasma* à partir des cellules mononuclées du sang périphérique

Nous avons utilisé le Kit QIAGEN, Maryland, USA) en utilisant le protocole d'extraction du sang total. Le culot leucocytaire est ramené à la température ambiante (25°C). Avec 20 µl de protéinase K dans un tube de 1,5 ml (Fourni par le kit), nous avons ajouté de 200 µl du culot leucocytaire (5×10^6 cellules) et mélangé le contenu dans le tube de micro centrifuge. Ensuite 200 µl de la solution tampon sont ajoutés au mélange contenu du tube de micro centrifuge ensuite incubé à 56°C pendant 10 minutes. Brièvement, nous avons centrifugé le mélange afin de récupérer les gouttelettes résiduelles au niveau du couvercle du tube. Ensuite, nous avons ajouté 200 µl d'Ethanol (96-100%) au mélange avant de le remuer pendant 15 secondes. Dans la colonne fournie par le Kit, nous avons fait passer le mélange et ensuite centrifuger à 8000 tours pendant 1 minute. La colonne est ensuite placée dans un tube de collecte de 2 ml et le filtrat a été rejeté. Environ 500 µl de solution tampon AW1 ont été ajoutés dans la colonne, fermée le tube de couvercle et centrifuger à 8000 tours pour une minute. Rejeter le tube

contenant le filtrat avant de placer la colonne dans un nouveau tube de collection de 2 ml (fourni par le kit). Un autre volume de 500µl de solution tampon AW2 est ajouté à la colonne, elle est fermée par le couvercle et centrifugée à pleine vitesse (14.000 tours pendant 3 minutes) après le filtrat est rejeté. Et enfin nous avons ajouté 200µl de solution tampon AE ou de l'eau distillée pure, incubé à la température ambiante pendant 1 minute et enfin centrifugé à 8000 tours pour 1 minute. Le filtrat contient donc l'ADN qui pourra être conservé à -20°C avant la PCR.

Réalisation de la PCR

La PCR a été conduite suivant le protocole modifié de Khan & col (2005) en utilisant les réactifs de la compagnie Invitrogen (USA). Un volume total de 25µl a été utilisé avec 25 mM de MgCl₂, 10 mM de di nucléotide triphosphate (dNTPs), des 2 paires d'amorces des gènes de surface de *Toxoplasma gondii* SAG2.F4 (5' GCT-ACC-TCG-AAC-AGG-AAC-AC 3'), SAG2.R4 (5' GCA-TCA-ACA-GTC-TTC-GTT-GC 3') et SAG2.F3 (5' TCT-GTT-CTC-CGA-AGT-GAC-TCC 3'), SAG2.R3 (5' TCA-AAG-CGT-GCA-TTA-TCG-C 3') et 5U de Taq polymérase (Invitrogen, USA). Le programme d'amplification a été fait à l'aide du thermocycleur (PTC-200 de MJ Research, Inc., USA), comprenait une dénaturation initiale des brins d'ADN à 94°C pour 5 minutes suivie d'un cycle qui incluait une dénaturation (94,0 °C, 30 secondes), un appariement des amorces (55°C ; 1 min) et une extension de la copie du brin d'ADN (72°C; 1min 15 secondes), ce cycle était répété 39 fois. Enfin, les échantillons pouvaient rester sur le thermocycleur à 4°C indéfiniment.

3. Résultats

Les différents résultats obtenus sont donnés dans les tableaux qui suivent. Les résultats donnent 36,36% de positivité à la Toxoplasmose tous patients confondus, pour un nombre total de 112 femmes et de 168 hommes. Les résultats positifs ont été obtenus avec les dilutions variant de 1/40 à 1/4000 des sérums collectés, dilution de travail 1/20 à 1/4000.

Tableau 1 : Résultat sérologique général de la Toxoplasmose des patients consultants du CNAM

Nombre d'échantillons recueillis	total	Nombre d'échantillons positifs	Pourcentage (%) de positivité	Taux de morbidité En %	Provenance des patients
280		99	36,36	2,82	Bamako, Kayes, Koulikoro, Sikasso, Ségou, Mopti, Tombouctou et Côte d'Ivoire

% : Pourcentage

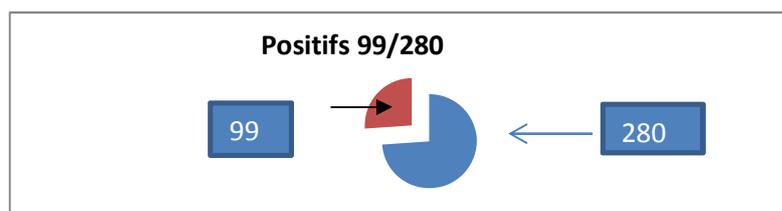


Tableau 2 : Résultats sérologiques positifs par sexe de la toxoplasmose des patients consultants des Services de Biologie du CNAM

	Positifs	% positifs	Tranche d'âge	Provenance
Echantillon total positif	99	100	11 – 77 ans	Bamako, Kayes, Koulikoro, Sikasso, Ségou, Mopti et Côte d'ivoire
Nombre de femmes	32	32,32	17 -63 ans	Cercles : Nara, Kati, Banamba, Yanfolila, Ségou ville, Kayes ville, Bamako et Abidjan
Nombre d'hommes	67	67,67	11 – 77 ans	Cercles : Yélimané, Diéma, Kati, Kangaba, Banamba, Djenné, Douentza, Youwarou, Yanfolila et Abidjan

% : Pourcentage

Les résultats donnent 32,32% et 67,67% pour les femmes et les hommes respectivement, avec une provenance diversifiée quant aux régions et les cercles dans chaque région.

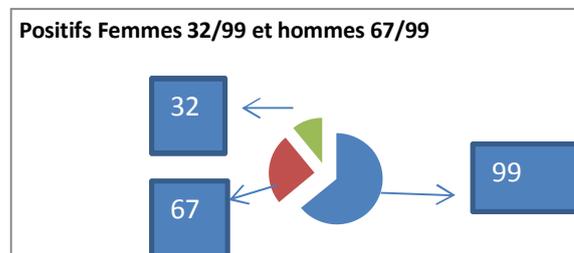
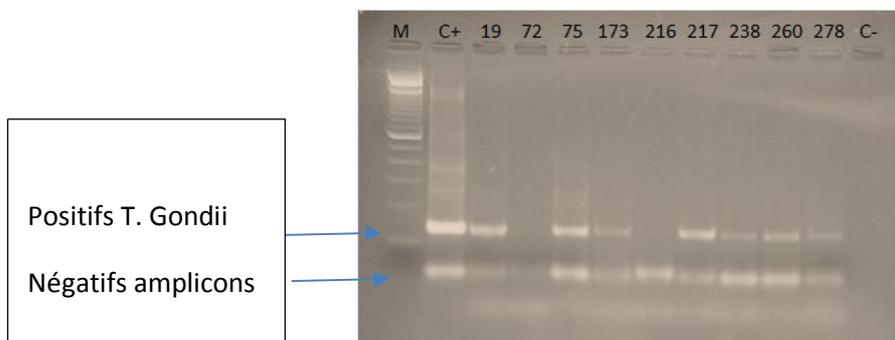


Figure 1 : résultat de la PCR Toxoplasmose



Sur un total de 9 échantillons testés : 7/ 9 échantillons testés sont **positifs à T. Gondii**, ce sont les bandes supérieures. Les N° 72 et 216 sont négatifs ; Les bandes inférieures constituent les résidus d'amplifications.

Tableau 3: Répartition des échantillons en fonction du diagnostic par la méthode de la PCR et la sérologie

Résultats toxoplasmose	Sérologie		PCR	
	#	(%)	#	(%)
Positif	99	(35)	136	(49)
Négatif	181	(65)	144	(51)
Total	280 (1)			
Intervalle de conf.95%	[30-41]		[43-54]	

Le diagnostic par la méthode de la PCR était la plus discriminante avec 49 % des cas, il y a une différence statistiquement significative par rapport au test de sérologie (35 %) $p < 0,01$; $\chi^2 = 11,15$ ddl = 1

4. Discussion

Au regard des résultats obtenus, nous pouvons dire que la Toxoplasmose est une zoonose présente au Mali, si l'on tient compte de la provenance et des tranches d'âge des patients effectuant des analyses dans le service de biologie au niveau du Centre national d'Appui à la lutte contre la Maladie. A noter que les patients inclus sont venus au Centre pour les consultations diverses (dermatologies, léprologie, soins des plaies, analyses biologiques...) avec des analyses sanguines à faire au niveau de la Biologie et les personnes ayant l'information d'un diagnostic gratuit de dépistage de la toxoplasmose.

Les différents résultats ont été analysés en fonction de la séroprévalence positive et du sexe, il ressort de cette analyse, que le nombre de positifs est de 99 patients sur un total de 280 patients. A indiquer que l'échantillonnage total de 327 patients n'a pu être obtenu suite à des difficultés d'inclusion des personnes. Cette difficulté est liée à des préjugés, entre autres que leur sang sera vendu. On peut aussi attribuer cette difficulté à probablement au montant alloué comme compensation pour l'inclusion à l'étude, ce montant correspond au prix de deux morceaux de savon, montant qu'on ne peut pas augmenter du fait du budget global limite sur fonds national accordé à la recherche. Également la difficulté peut être attribuée à un manque de sensibilisation de la population sur les maladies zoonotiques.

Malgré ces différentes difficultés, un pourcentage d'inclusion de 85, 63% a été obtenu. On remarquera également que le pourcentage de positifs chez les hommes est beaucoup plus élevé que chez la femme, de l'ordre de 67, 67% et de 32,32% respectivement. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus par Ouologuem et al. (2013). Ceci est un point qui doit être développé en tenant compte de certains paramètres n'ont pris en compte dans ce protocole, à savoir la profession (métiers à risque comme la boucherie), l'habitat (s'ils vivent avec des animaux, exemple chat) et l'environnement (exemple zone d'élevage) de ces patients positifs.

Selon une autre étude menée en république centrafricaine chez les femmes en consultation prénatale sur la séroprévalence de la toxoplasmose, à l'hôpital du District sanitaire de Bossembele, les données sur cette maladie sont fragmentaires. Elle a été menée sur une période de de 4 mois de juin a septembre 2020. Au total le sérum de 50 femmes enceintes a été analyse, l'âge moyen était de 25 ans + ou - 6 ans avec une prépondérance des primipares (60%). Les résultats ont donné 15 patientes positives (30%) et selon les caractéristiques

sociodémographiques la séroprévalence était plus élevée chez les tranches d'âge de 20 à 35 ans.

Une autre étude rétrospective et transversale menée dans le cadre de la recherche sur la toxoplasmose cérébrale 97 patients au niveau du service des maladies infectieuses du CHU Point G. prenait en compte les aspects épidémiologiques, paracliniques, clinique, thérapeutique et pronostics sur terrain VIH. Les recherches ont donné 10,1% de toxoplasmose cérébrale, indiquant une prévalence élevée de cette maladie chez les personnes immunodéprimées.

On notera aussi que la tranche d'âge est de 11 à 77 ans, femme et homme confondus avec quelques adolescents. Ceci peut être compris par le test utilisé, qui détecte les immunoglobulines de type G. Ces anticorps sont produits tardivement après environ une quinzaine de jours. Ainsi la plupart pourrait être des infections non récentes. Ainsi quelques échantillons des patients positifs avec de fortes dilutions au test Toxo Screen, ont été analysés par d'autres tests de confirmation, comme l'ELISA (test sérologique) et la caractérisation par la biologie moléculaire. Ces deux derniers tests plus sensibles et plus spécifiques que le Toxo Screen DA, ont donné des résultats de 7 positifs sur un total de 9 échantillons testés, avec plus de 50% d'hommes. Ceci confirme que ces personnes sont infectées et qu'une prise en charge et un suivi s'imposent.

D'une manière générale, la contamination peut être évitée en suivant les mesures d'hygiène lors de la consommation des aliments crus et insuffisamment cuits sans congélation préalable. Eviter les contacts avec les chats surtout errants. Une étude a démontré que l'eau est également une source potentielle d'infection suite à une enquête menée au Canada. Elle a révélé la présence d'ADN de toxoplasmes dans 7% des échantillons d'eau de surface et 9% des échantillons d'eau de puit.

La vigilance doit être accrue lors de la prise de repas hors du domicile, où les mesures d'hygiène sont difficilement contrôlables.

Si on tient compte du fait que l'étude n'a eu lieu qu'au CNAM, une transposition de ces résultats sur l'ensemble des centres de santé de même niveau montre une zoonose majeure qui évolue en sourdine qui peut être à l'origine de pathologies sérieuses, comme par exemple les problèmes ophtalmologiques.

5. Conclusion

La prévalence élevée de 36,36% de positifs est indicative d'une source d'infection géographique commune et étendue, qui n'est pas isolée. Ceci s'explique par la diversité des provenances des sujets inclus et de la tranche d'âge variée obtenues. On peut donc dire que la Toxoplasmose est un problème réel de santé publique au Mali. Tenant compte de son caractère zoonotique, une bonne sensibilisation/ information sur la maladie, sensibilisation sur les risques de contamination, la surveillance sérologique systématique couplée aux mesures d'hygiène peuvent aider à diminuer la prévalence. Des études plus étendues et touchant différents paramètres à savoir médical, vétérinaire et socio anthropologue s'avèrent aussi indispensables.

Références

Ann. Afr. Med. Vol.15 N0 2, mars 2022

Baril L. et al. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case control study in France. Scand J. Infect. Dis. 1999; 31 (3): 305-9.

Bowie WR. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet, 1997; 350: 173-7.

Koureich F., Thèse de Doctorat en Pharmacie 2005. La leishmaniose cutanée chez les patients reçus à l'Unité Biologie du CNAM de janv. 2002 à oct. 2004.
Mohamed Aly Ag Mohamed, USTTB. These de Medicine 2020.

Quilici M. et al., 1976. Toxoplasmosis in the republic of Mali. An epidemiologic approach. Acta Trop. 1976; 33(3):229-39.

Ouologuem D.T. et al., Séroprévalence de Toxoplasma gondii au Mali, J. Parasitol., 99 (2) : 371-4, 2013.

SY D. et al., 2004. Prévalence de la tuberculose et de la Brucellose bovine dans certains élevages laitiers périurbains de Ségou, San et Niono. Revue malienne de science et de technologie. N°6 : 64-72, sept 2004.

Villena I. et al Evaluation of a strategy for Toxop. Gondii oocyst detection in water. Appl. Environ Microbiol. Juill 2004; 70: 4035-9