

Prévalence sous-estimée de *Pneumocystis jirovecii* chez les personnes séropositives au VIH-1 au Burkina Faso

Abdoul Rahamani NIKIEMA¹, Serge Théophile Ragnagnewendé SOUBEIGA¹,
Florencia Wendkuuni DJIGMA^{1,2}, Tégwindé Rébecca COMPAORE¹,
Théodora Mahoukèdè ZOHONCON^{1,2,3,4}, Djeneba OUERMI^{1,2}, Eliane BELEMSEOGO¹,
Albert Téophane YONLI, Virginio PIETRA^{2,4}, Jacques SIMPORE^{1,2,3,4}

Résumé

La pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* (PCP) est une infection opportuniste grave chez l'immunodéprimé. L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence de la PCP chez patients VIH-1 positifs. Des échantillons de crachat de 83 patients ont été collectés dans des boîtes à crachat à usage unique. Après un mélange de l'échantillon avec 4 % de solution de NaOH, une série de centrifugation a été effectuée. Le culot a été récupéré dans des tubes Eppendorf et conservé à -20°C avant l'extraction de l'ADN. L'extraction et l'amplification de l'ADN ont été faites avec le kit « *Pneumocystis jirovecii* (carinii) Real – TM ». L'appareil Real Time PCR Fast 7500 a été utilisé pour l'amplification. Les résultats de notre étude ont montré la présence de la PCP chez 84,34 % des patients. Parmi eux 61,4% avaient un taux de CD4 compris entre 200 à 350 Cellules/ μ l et 38,6 % des patients avaient un taux de CD4 < 200 Cellules/ μ l. Les femmes étaient les plus touchées (74,7 %). La toux, l'expectoration et la fièvre sont les signes cliniques les plus associées à la survenue d'une PCP. Notre travail a permis de révéler la présence de cette maladie au sein des patients VIH-1 positifs suivis à l'Hôpital Saint Camille de Ouagadougou.

Mots-clés : Pneumocystis à *P. jirovecii*, VIH, PCR en Temps Réelle, Burkina Faso.

Underestimated presence of *Pneumocystis jirovecii* in HIV-1 infected people in Burkina Faso

Abstract

Pneumocystis jirovecii pneumocystis (PCP) is a severe opportunistic infection in immunocompromised patients. The objective of this study was to determine the prevalence of PCP in HIV-1 patients. Sputum samples from 83 patients were collected in single-use sputum boxes. After mixing the sample with 4% NaOH solution, a series of centrifugation was performed. The pellet was recovered in Eppendorf tubes and stored at -20 ° C prior to DNA extraction. Extraction and amplification of the DNA was done with the kit "Pneumocystis jirovecii (Carinii) Real - TM". Real Time PCR Fast 7500 was used for amplification. The results of our study showed the presence of PCP in among 84.34% of the HIV-1 positive patients. Among them, 61.4% had a CD4 count between 200 and 350 cells / μ l and 38.6% of patients had a CD4 count <200 cells / μ l. Women were the most affected (74.7%). Cough, sputum and fever were the clinical signs mostly associated with the occurrence of PCP. Our work has revealed the presence of this disease in HIV-1 positive patients followed at St. Camille Hospital in Ouagadougou.

Keywords: *P. jirovecii* Pneumocystis, HIV, Real-Time PCR, Burkina Faso.

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génétique (LABIOGENE), Université Joseph Ki-Zerbo, BP 7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso

² Centre de recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA), BP 364, Ouagadougou 01, Burkina Faso

³ Faculté de Médecine, Université Saint Thomas d'Aquin (USTA), BP 10212, Ouagadougou, Burkina Faso

⁴ Hôpital Saint Camille de Ouagadougou (HOSCO), Burkina Faso, BP 444 Ouagadougou 01, Burkina Faso.

*Auteur correspondant: Dr Florencia Wendkuuni DJIGMA ; Département de Biochimie-Microbiologie, Université Joseph Ki-Zerbo, Burkina Faso; Email: florencia.djigma@gmail.com ou f.djigma@labiogene.org

Introduction

La pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* (PCP) est causée par un champignon appelé *Pneumocystis jirovecii*. Ce champignon entraîne une infection pulmonaire lorsque le système immunitaire est affaibli (1). Les personnes porteuses du VIH dont la numération des cellules CD4 est inférieure à 200 cellules/ μ l courent un risque plus grand de contracter la PCP (2). Cependant, en raison de la spécificité et le risque de toxicité avec le traitement, la confirmation de PCP est une information importante pour le suivi des patients (3). La culture de *P. jirovecii* n'étant pas réalisable à ce jour, le diagnostic repose sur la mise en évidence du micro-organisme au sein de prélèvements respiratoires (4). Cela par examen direct tel que la technique des colorations traditionnelles (4,6-8). La technique de biologie moléculaire pour la mise en évidence du génome de *P. jirovecii* dans les prélèvements respiratoires est sensible, spécifique et rapide, même avec de faibles charges fongiques (9). Par cette technique, on a recherché surtout le gène MSG (Major Surface Glycoprotein) qui code la glycoprotéine de surface la plus abondante des protéines de surface exprimées par le genre *Pneumocystis* (9). Plusieurs études ont prouvé qu'entre un quart (1/4) et un tiers (1/3) de toutes les admissions des patients infectés par le VIH sont dues à *P. jirovecii* (10,7).

C'est conscient de ce problème de santé que nous avons mené cette étude dans le but de déterminer la prévalence de cette maladie chez les patients séropositifs au VIH-1 à l'Hôpital Saint Camille de Ouagadougou (HOSCO) au Burkina Faso.

Matériel et méthodes

Cadre d'étude et échantillonnage

Notre étude s'est déroulée à l'Hôpital Saint Camille de Ouagadougou (HOSCO) et au Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA). L'HOSCO dans lequel nous avons effectué notre échantillonnage contient une file active adulte de huit cent cinquante-neuf (859) personnes dont cent quatre-vingt-treize (193) hommes et six cent soixante six (666) femmes. Parmi eux, quatre-vingt-trois (83) patients ont pris part à notre étude selon nos critères d'inclusion.

Le CERBA dans lequel nous avons effectué nos analyses (traitement de l'échantillon, l'extraction de l'ADN et l'amplification) est une fédération de plusieurs laboratoires qui possède un plateau technique moderne pour les recherches fondamentales, pharmacologiques et de biologie moléculaire.

Prélèvement et traitement des échantillons

Le type de VIH, le taux de CD4 et les signes cliniques étaient les critères essentiels d'inclusions qui ont conduit au recrutement des patients pour l'étude. Après l'explication des objectifs, de l'impact de l'étude et le consentement libre et éclairé du patient, du crachat est prélevé dans des pots à crachat à usage unique. Les échantillons de crachats étaient préalablement traités avant l'étape d'extraction : nous avons homogénéisé les échantillons avec un mélange à volume égal de 4 % de solution de NaOH, puis nous avons centrifugé les échantillons à 3000 tr/mn pendant 15 minutes et prélevé soigneusement le surnageant en laissant le culot dans le tube. Les mêmes étapes ont été répétées une deuxième fois mais en centrifugeant à 12000 tr/mn pendant 10 minutes. Le culot ainsi obtenu a été conservé à $- 80^{\circ}\text{C}$ pour l'extraction de l'ADN.

Extraction de l'ADN et amplification de *Pneumocystis jirovecii*

L'extraction de l'ADN et l'amplification ont été réalisées à l'aide du kit « *Pneumocystis jirovecii* (carinii) Real-TM » de Sacace Biotechnologies (Como, Italy) en suivant les instructions du fabricant.

L'amplification a été effectuée à l'aide de l'appareil 7500 Fast Real Time (Applied Biosystems) selon le programme suivant: 95 °C pendant 15 mn pour la dénaturation initiale ; ensuite 95 °C pendant 15 secondes/ 60 °C pendant 1 mn/ 72°C pendant 1mn le tout en 45 cycles.

Aspect éthique

Le consentement libre et éclairé des patients, l'anonymat, le respect de la confidentialité ainsi que l'accord du comité d'éthique de l'Hôpital Saint Camille de Ouagadougou (HOSCO) et du Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA) ont été indispensables pour la réalisation de cette étude.

Analyse des données

Les données ont été saisies dans Excel 2007 et ensuite analysées avec le logiciel standard Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20,0 pour Windows et par le logiciel EPI Info version 6.0. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Résultats

Un total de quatre-vingt trois (83) patients VIH-1 séropositifs ont pris part à cette étude dont 21 hommes soit 25,3 % et 62 femmes soit 74,7%. Selon le tableau I, l'âge moyen au moment de notre étude était de $37,71 \pm 10,26$ ans. Dans notre population d'étude, 55 personnes avaient un taux de cellules CD4 compris [1-300 cellules/ μ L] ce qui représentait 66,3 % et 28 personnes soit 33,7 % un taux [300-500 cellules/ μ L]. L'observance du traitement était de 62,7 %. On a noté 38,6 % des patients qui avaient un taux de CD4 < 200 Cellule/ μ L alors que 61,4 % avaient un taux de CD4 compris [200-350 cellules/ μ L].

La prévalence *P. jirovecii* trouvée au cours de notre étude par la technique de la PCR en temps réel était de 84,34 % (70/83).

Tableau I : Caractéristiques sociodémographiques, cliniques et biologiques de la population d'étude

Caractéristiques		Effectif	n=83 (%)	p value
Sexe	Masculin	21	(25,3)	< 0,0001
	Féminin	62	(74,7)	
Profession	Ménagères	49	(59,0)	0,0005
	Secteur Informel	16	(19,3)	
	Secteur Privé	5	(6,0)	
	Secteur Public	4	(4,8)	
	Elèves / Etudiants	9	(10,8)	
Traitement	1 ^{ère} ligne	55	(66,3)	0,0039
	2 ^e ligne	28	(33,7)	
Observance	Bonne	52	(62,7)	0,0285
	Mauvaise	31	(37,3)	
CD4 (Cellules/ µl)	< 200	32	(38,6)	0,0387
	200 à 350 Cellule/ µl	51	(61,4%)	
PCR	Positif	70	(84,34)	
	Négatif	13	(15,66)	

Les signes cliniques sont les premiers éléments de suspicion de la pneumocystose. Il ressort clairement selon le tableau II que la toux (75,9 %), l'expectoration (75,9 %) et la fièvre (41,0 %) sont les signes cliniques les plus associées à la survenue d'une PCP. Ce résultat se confirme avec la PCR où plus de 85 % de patient présentant ces signes sont réellement positifs.

Tableau II : Corrélation entre les signes cliniques et la présence de la PCP

Signes cliniques		Toux	Fièvre	Essoufflement	Expectoration	Frissons
Résultats	PCP+ N (%)	54 (85,71)	29 (85,29)	8 (66,68)	54 (85,71)	7 (70,00)
PCR	PCP- N (%)	9 (14,29)	5 (14,71)	4 (33,32)	9 (14,29)	3 (30,00)
Valeur de p						
Total	N (%)	63 (75,9)	34 (41,0)	12 (14,5)	63 (75,9)	10 (12,0)

Le taux moyen de lymphocytes T-CD4 lors du diagnostic de la PCP était de $217,43 \pm 97,88$ cellules par microlitre (cellules/µl). La population d'étude était répartie en deux grands (02) groupes en fonction de leur taux de CD4. Le premier groupe ayant un taux de $CD4 < 200$ cellules/µl et le deuxième groupe, ceux ayant un taux de CD4 compris entre 200 et 350 cellules/µl. Dans le premier groupe nous avons trouvé 38,57 % de patients qui étaient positifs à la PCR par rapport à 61,43 % dans le deuxième groupe.

Tableau III. Présence de la PCP en fonction du taux de CD4

	CD4 (cellules/ μ L)	Total		p value
	< 200	200- 350		
PCP ⁺ N(%)	27 (38,57%)	43 (61,43%)	70 (100%)	0,9940
PCP ⁻ N(%)	5 (38,46%)	8 (61,54%)	13 (100%)	

Discussion

L'objectif principal de notre étude a consisté à un diagnostic moléculaire de la pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* pour la première fois dans une population de personnes VIH-1 positives au Burkina Faso. Ce choix se place dans le sillage des études qui cherchent à comprendre combien les marqueurs biologiques et génétiques interagissent dans l'évolution de l'infection à VIH vers ses formes graves.

L'âge moyen de notre population étude était de $37,71 \pm 10,26$ ans ce qui pourrait montrer que notre population d'étude est relativement jeune et cela est le résultat de la gratuité des ARVs au Burkina Faso. Les femmes représentaient 74,7 % soit 62/83 de la population d'étude. Ce taux s'expliquerait par le fait que la plupart des patients VIH séropositifs sont des femmes soit 666/859 des patients suivis à l'HOSCO. En plus de cela, il faut noter que les femmes sont plus exposées au VIH que les hommes. Parmi les femmes, on dénombre 49 qui sont ménagères ; ce qui représentent la profession dominante soit 59,0 % suivis des personnes qui exercent dans le secteur informel. Ce taux s'expliquerait par le faible niveau d'instruction de la population.

En ce qui concerne les caractéristiques cliniques et biologiques (tableau II), il faut noter que le taux de bonne observance était de 62,7 %. Ce taux démontre que les femmes sont non seulement plus sensibles aux conseils des professionnels de santé mais aussi soucieuses de leur santé comparativement aux hommes. Il faut aussi noter que 66,3 % des patients sont à la 1^{ère} ligne thérapeutique, nous en déduisons donc que le taux de résistance aux ARVs est encore assez faible dans le contexte du Burkina Faso. 84,34 % des patients étaient *P. jirovecii*, ce qui démontre clairement la forte présence de ce champignon au sein de notre population d'étude.

La pneumocystose à *P. jirovecii* est une infection opportuniste aigue d'évolution souvent défavorable avec une mortalité élevée selon Nakamura en 2009 (11). Cette infection est fréquente chez les patients infectés par le VIH avec une prévalence de 60 à 80 % dans les pays industrialisés (12) et de 13 à 55 % dans les pays en développement (1). Les résultats de la PCR en temps réel montrent que 70/83 personnes soit 84,34 % étaient positives au *Pneumocystis jirovecii*. Cela prouve la présence réelle de la pneumonie à *P. jirovecii* chez les patients VIH-1 positifs au Burkina Faso. Notre prévalence de 84,34 % est similaire à celle trouvée par Cushion (13) qui est de 82 % en 2009 au Cameroun chez des patients VIH séropositifs par la méthode de la PCR en ciblant principalement le gène MSG. Selon Kamarasamy (14) en 2005 parmi les patients ayants un taux de CD4 faible, on estime que plus de 74 % sont susceptibles à développer la PCP.

En fonction du taux de CD4, l'étude a montré que 38,57 % soit 27/83 patients ayant un taux de CD4 < 200 Cellules/ μ l sont positifs au *P. jirovecii* (tableau III). Une étude au Kenya a trouvé à

peu près le même résultat où *P. jirovecii* a été détecté par l'immunofluorescence et par coloration respectivement à 37,2 % et 27,4 % sur 51 patients de VIH-1 (15). Moukhlis et collaborateurs (16) en 2010 ont trouvé respectivement 52% et 55 % de patients VIH-1 séropositifs au Cambodge et au Vietnam positifs à *Pneumocystis jirovecii*. Une étude prospective sur quatre (4) ans sur un total de 659 patients a montré que 63,8% d'entre eux étaient positifs à la PCP par la méthode de la PCR (17). Des résultats faibles par rapport à ceux que nous avons trouvés ont été rapportés. En Ethiopie, la PCP a été détectée dans 4,7 % de personnes VIH séropositives (18). La pneumocystose à *P. jirovecii* a été détectée chez 16/367 (4,4 %) des patient VIH-1 séropositifs par la technique de la PCR (19) . Au Nigeria, Tasaka (20) en 2012 a trouvé 12,6 % (29/230) de patients VIH séropositifs qui étaient positifs à la PCP. La PCR en temps réel a mis en évidence la présence du génome de *Pneumocystis jirovecii* dans 13 % des prélèvements respiratoires au CHU de Nancy pour lesquels l'immunofluorescence était négative. Thomas et collaborateurs (21) en 2004 travaillant sur des patients présentant des symptômes respiratoires ont montré par la technique de la PCR conventionnelle que 22/98 personnes soit 22,45 % étaient positives à *P. jirovecii*. Cette forte diminution des cas de la PCP après 1996 s'expliquerait par l'utilisation de thérapie antivirale hautement réactive (HAART) chez les patients infectés par le VIH (22). En Ouganda, la PCP n'a pas été détectée parmi des personnes atteintes du SIDA selon Walzer (23) et collaborateurs en 2008 par la technique de coloration. Ceci peut traduire soit une faible sensibilité de la méthode.

La toux et l'expectoration (85,71 %) étaient les signes cliniques les plus associés à la survenue de la PCP suivi de la fièvre (85,29 %). Malin et collaborateurs dans une étude avaient trouvé les mêmes signes cliniques associés à la PCP. Ces différentes peuvent s'expliquer non seulement par le type d'échantillon (crachat, LBA ...) et la méthode (PCR, colorations spécifiques ...) utilisés lors des études mais aussi par la spécificité et la sensibilité de ces méthodes.

La particularité de notre étude est le pourcentage de PCP chez les patients ayant un taux de CD4 compris entre 200 et 350 Cellules/ μ l qui était de 61,43 % soit 43/83 de la population d'étude. Ce résultat est difficilement comparable avec d'autres résultats parce que la plupart des études tiennent comptes de taux de CD4 < 200 Cellules/ μ l comme limite supérieure.

Ce taux pourrait s'expliquer par deux (2) hypothèses :

Soit il y'a une erreur d'appréciation en prenant comme limite supérieure de taux de CD4 à 200 Cellules/ μ l pour les patients susceptibles de contracter la pneumonie à *P. jirovecii*.

Soit il y aurait une résistance de *Pneumocystis jirovecii* au cotrimoxazole principal moyen de lutte contre cette maladie opportuniste.

La prévalence de notre étude est de 84,34 %, au vu de ce résultat et aussi du taux d'observance élevé 62,7 % et que la plupart des patients est en première ligne thérapeutique (66,3 %) nous privilégions l'hypothèse de résistance de *Pneumocystis jirovecii* au cotrimoxazole.

Conclusion

Notre travail a permis de révéler la présence de cette maladie au sein des patients VIH positifs suivis à l'Hôpital Saint Camille de Ouagadougou au Burkina Faso. Au vu de ce résultat, il est important d'investiguer encore plus sur les mécanismes de résistance de ce champion pour mieux le connaître et rester vigilant car une inattention peut augmenter le taux de l'infection. Les manifestations cliniques de la pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* révélées par notre étude sont la toux, les expectorations et la fièvre.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'Hôpital Saint Camille de Ouagadougou, le Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni/ Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génétique (CERBA/LABIOGENE). Nous remercions également l'UEMOA à travers son programme PACER2 pour l'appui financier dans la réalisation de ce travail.

Références bibliographiques

1. MORRIS, A., KINGSLEY, L. A., GRONER, G., *et al.* Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. *AIDS*. 2008; 18, 793-8.
2. ALIOUAT-DENIS, C. M., CHABE, M., DEMANCHE, C., *et al.* *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infect Genet Evol.* 2008; 8, 708-26.
3. MONTES-CANO, M. A., CHABE, M., FONTILLON-ALBERDI, M., *et al.* Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15, 125-7.
4. CATHERINOT, E., LANTERNIER, F., BOUGNOUX, M. E. *et al.* *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.* 2010; 24, 107-38.
5. RUFFOLO, J. J., CUSHION, M. T., WALZER, P. D. Techniques for examining *Pneumocystis carinii* in fresh specimens. *J Clin Microbiol.* 1986; 23, 17-21.
6. ELVIN, K. M., BJORKMAN, A., LINDER, E. *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *BMJ.* 1988; 297, 381-4.
7. HUANG, L., HECHT, F. M., STANSELL, J. D. *et al.* Suspected *Pneumocystis carinii* pneumonia with a negative induced sputum examination. Is early bronchoscopy useful? *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151, 1866-71.
8. KOVACS, J. A. MASUR, H. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA.* 2009; 301, 2578-85.
9. KUTTY, G., SHROFF, R. & KOVACS, J. A. Characterization of *pneumocystis* major surface glycoprotein gene (*msg*) promoter activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2013; 12, 1349-55.
10. MILLER, R. & HUANG, L. *Pneumocystis jirovecii* infection. *Thorax.* 2004; 59, 731-3.
11. NAKAMURA, H., TATEYAMA, M., TASATO, D. *et al.* Clinical utility of serum beta-D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Intern Med.* 2009; 48, 195-202.
12. LUBIS, N., BAYLIS, D., SHORT, A. *et al.* Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Postgrad Med J.* 2003; 79, 164-6.
13. CUSHION, M. T. Comparative genomics of *Pneumocystis carinii* with other protists: implications for life style. *J Eukaryot Microbiol.* 2004; 51, 30-7.
14. KUMARASAMY, N., VALLABHANENI, S., CECELIA, A. J., *et al.* Safe discontinuation of primary *pneumocystis* prophylaxis in Southern Indian HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; 40, 377-8.
15. MA, L., IMAMICHI, H., SUKURA, A. KOVACS, *et al.* Genetic divergence of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in *Pneumocystis carinii* from 7 different host species. *J Infect Dis.* 2001; 184, 1358-62.
16. MOUKHLIS, R., BOYER, J., LACUBE, P., *et al.* Linking *Pneumocystis jirovecii* sulfamethoxazole resistance to the alleles of the DHPS gene using functional complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16, 501-7.
17. SKELLY, M., HOFFMAN, J., FABBRI, M., *et al.* S-adenosylmethionine concentrations in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet.* 2003; 361, 1267-8.
18. SKELLY, M. J., HOLZMAN, R. S. & MERALI, S. S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46, 467-71.
19. STRINGER, J. R. *Pneumocystis*. *Int J Med Microbiol.* 2002; 292, 391-404.

20. **TASAKA, S., HASEGAWA, N., KOBAYASHI, S., et al.** Serum indicators for the diagnosis of pneumocystis pneumonia. *Chest*. 2007; 131, 1173-80.
21. **THOMAS, C. F., JR. & LEMPER, A. H.** Pneumocystis pneumonia. *N Engl J Med*, 2004. 350, 2487-98.
22. **KAPLAN, J. E., HANSON, D. L., NAVIN, T. R. & JONES, et al.** Risk factors for primary Pneumocystis carinii pneumonia in human immunodeficiency virus-infected adolescents and adults in the United States: reassessment of indications for chemoprophylaxis. *J Infect Dis*. 1998; 178, 1126-32.
23. **WALZER, P. D., EVANS, H. E., COPAS, A. J., et al.** Early predictors of mortality from Pneumocystis jirovecii pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006. *Clin Infect Dis*. 2008; 46, 625-33.