

Section F : Hématologie / Hematology

Etude comparative entre la PCR et l'iso électrofocalisation dans le diagnostic de la drépanocytose chez l'enfant à l'Hôpital de la Paix de Ziguinchor (HPZ)/Sénégal

Comparative study between PCR and isoelectric focusing in the diagnosis of sickle cell anemia in children at the Ziguinchor Peace Hospital (ZPH) / Senegal

Thiam L¹, Diatta A¹, Doupa D², Makalou D², Déme/Ly I³, Diouf FN⁴, Coly MN¹, Sarr H¹, Diagne I², Fall AL³, Manga NM¹, Ndiaye O³.

1- Université Assane Seck de Ziguinchor, Hôpital de la Paix de Ziguinchor, Sénégal

2- Université Gaston Berger de Saint Louis, Hôpital Régional de Saint Louis, Sénégal

3- Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Hôpital d'Enfants Albert Royer de Dakar, Sénégal

4- Hôpital Régional de Ziguinchor, Sénégal

Tiré à part

Section F : Hématologie

Rubrique : Article original

Résumé

Introduction : la drépanocytose pose un problème de santé publique au Sénégal. Il existe de nombreuses techniques de diagnostic biologique. L'objectif de notre étude était d'apprécier la validité d'une technique de biologie moléculaire pour le diagnostic de la drépanocytose à Ziguinchor à partir d'une étude comparative entre la PCR et l'iso électrofocalisation (IEF). **Matériels et méthode :** il s'agissait d'une étude prospective comparative, du 1^{er} février au 30 avril 2018, entre la PCR et l'IEF, dans le diagnostic de la drépanocytose. Etaient inclus tous les enfants âgés de 4 mois à 15 ans ayant un TE positif et après un consentement éclairé des parents. N'étaient pas inclus les enfants de famille non consentante. L'IEF était réalisée par la technique «RESOLVE Hemoglobin kit»; la PCR par la technique du KIT «Mutation S et C de l'hémoglobine humaine LAMP».

Résultats : la population d'étude était composée de 156 garçons (54,5%) et 130 filles (45,5%). L'âge moyen des enfants était de 7 ans ; 58,4% présentaient des symptômes cliniques. Le taux d'hémoglobine moyen était de 8,9 g/dl [1,7 – 13,4] ; 177 enfants (61,9%) présentaient une anémie d" 8 g/dl. Les 286 échantillons (100%) étaient manipulés, pour l'IEF à partir du sang séché. Pour la PCR, 183 échantillons (64,0%) étaient manipulés à partir du sang séché. Au total, 227 échantillons étaient valides pour les 2 techniques et 59 étaient non interprétables et/ou invalide. La PCR était sensible à 100% et spécifique à 100% par rapport à l'IEF.

Le délai d'une manipulation était plus rapide pour la PCR comparé à l'IEF.

Conclusion : nous recommandons la PCR par la technique du KIT « Mutation S et C de l'hémoglobine humaine LAMP » pour le diagnostic biologique de la drépanocytose à l'HPZ.

Mots clés : drépanocytose, enfant, iso électrofocalisation, PCR.

Summary

Introduction: sickle cell disease poses a public health problem in Senegal. There are many techniques for biological diagnosis. The objective of our study was to assess the validity of a molecular biology technique for the diagnosis of sickle cell anemia in Ziguinchor from a comparative study between PCR and iso electrofocusing (IEF).

Materials and method : this was a prospective comparative study, from February 1 to April 30, 2018, between PCR and IEF, in the diagnosis of sickle cell anemia. Included were all children aged 4 months to 15 years with a positive ET and after informed parental consent. Children from non-consenting families were not included. The IEF was performed using the "RESOLVE Hemoglobin kit" technique; PCR by the KIT technique "S and C mutation of human hemoglobin LAMP".

Results : The study population consisted of 156 boys (54,5%) and 130 girls (45,5%). The average age of the children was 7 years old; 58,4% presented with clinical symptoms. The mean hemoglobin level was 8,9 g / dl [1,7 – 13,4]; 177 children (61,9%) had anemia d" 8 g/dl. All 286 samples (100%) were handled, for IEF from dried blood. For PCR, 183 samples (64,0%) were handled from the dried blood. A total of 227 samples were valid for both techniques and 59 were uninterpretable and/or invalid. PCR was 100% sensitive and 100% specific to IEF.

The time to manipulation was faster for PCR compared to IEF.

Conclusion : we recommend PCR using the "S and C mutation of human hemoglobin LAMP" KIT technique for the biological diagnosis of sickle cell anemia at the ZPH.

Keywords: sickle cell anemia, child, iso electrofocusing, PCR.

Correspondance : Dr : Lamine THIAM,
Email : thiamlkt@yahoo.fr, Téléphone 77 570 49 92

INTRODUCTION

La drépanocytose est une maladie génétique héréditaire de l'hémoglobine [1]. Elle est caractérisée sur le plan moléculaire par une substitution de l'acide glutamique par la valine au niveau du 6^{ème} codon de la chaîne β de la globine [2]. Au Sénégal, 1 personne sur 10, porterait le gène de la drépanocytose [3]. Le diagnostic biologique de la drépanocytose a beaucoup évolué ces dernières années. Jadis c'était uniquement le test d'Emmel qui était utilisé pour la confirmation biologique de la maladie. Aujourd'hui au Sénégal, le diagnostic de la drépanocytose est généralement réalisé par les techniques électrophorétiques. Cependant, les nourrissons de moins de 6 mois ne peuvent bénéficier d'un diagnostic la sur base de ces techniques en raison de l'interférence de l'hémoglobine fœtale. Ainsi d'autres méthodes sont indispensables pour un diagnostic précoce : biologie moléculaire (PCR), isoélectrofocalisation (IEF) [1,4]. C'est dans cette dynamique, que le laboratoire de l'hôpital de la Paix de Ziguinchor (HPZ), en collaboration avec le Centre de Recherche et de Prise en charge Ambulatoire de la Drépanocytose (CERPAD) de Saint Louis, nous a permis de faire une étude comparative entre la PCR et l'IEF dont le but était

d'apprécier la validité de la technique de biologie moléculaire pour le diagnostic de la drépanocytose à Ziguinchor.

MATERIELS ET METHODE

Site de l'étude

Notre étude s'est déroulée dans les laboratoires d'analyse de l'HPZ et du CERPAD de Saint Louis. Le laboratoire de l'HPZ est un service d'analyse hospitalo-universitaire de niveau 2 dans la région de Ziguinchor. Il comporte une grande salle polyvalente, composée d'unités d'hématologie, de biochimie et de sérologie. Le personnel médical est composé d'un professeur titulaire, médecin biochimiste, de deux assistants universitaires, hématologue et microbiologiste. Le CERPAD est un centre de référence en matière de prise en charge et de recherche sur la drépanocytose au Sénégal et en Afrique de l'Ouest. Le centre dispose d'un laboratoire d'analyses de biologie médicale. L'activité première de ce laboratoire est l'étude de l'hémoglobine par différentes techniques d'électrophorèse (isoélectrofocalisation, électrophorèse capillaire, chromatographie liquide haute performance) et autres analyses qui concourent au diagnostic précoce de la drépanocytose et des autres hémoglobinopathies en général. Le

personnel médical du CERPAD est composé d'un professeur titulaire en pédiatrie spécialisé en hématologie, d'un maître-assistant en pédiatrie, d'un maître-assistant en biochimie, d'un assistant en hématologie.

Types et période d'étude

Nous avons mené une étude prospective comparative, qui s'est déroulée durant la période allant du 1^{er} février au 30 avril 2018.

Population d'étude

Notre population d'étude était constituée des enfants de parents porteurs du gène de la drépanocytose.

Critères d'inclusion : étaient inclus dans l'étude, tous les enfants âgés de 4 mois à 15 ans ayant un test d'Emmel (TE) positif et après un consentement éclairé des parents.

Critères de non inclusion : n'ont pas été inclus dans l'étude les enfants de familles non consentantes.

Méthodologie

- *Entretien avec les parents :* La sélection d'un enfant était précédée d'un entretien avec la mère ou les 2 parents. Cet entretien avait pour but de les informer sur la drépanocytose et sur les objectifs de l'étude, d'obtenir leur consentement verbal pour y participer et de remplir la fiche d'enquête.

- *Prélèvements et conservation des échantillons*

Les prélèvements de sang total ont été faits sur tube EDTA, à partir desquels quelques gouttes de sang étaient déposées sur du papier buvard pour tous les malades. Le sang total a été conservé à 2 – 8°C pendant une durée maximale de 7 jours. Le buvard était séché à température ambiante pendant au minimum 8 heures de temps. Il est ensuite placé dans un sachet en plastique et conservé à la température ambiante pendant une durée variant de 3 à 10 mois.

- *Hémogramme*

L'hémogramme de tous les enfants était réalisé par un technicien au laboratoire de l'HPZ à partir d'un contrôle de qualité (sang sysmex) du Coulter Sysmex XN-350.

- *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Nous avons utilisé la technique du KIT de la « Mutation S et C de l'hémoglobine humaine LAMP ». Le Kit LAMP contient 6 amorces spécifiques permettant l'amplification en boucle d'une région spécifique entourant les polymorphismes. Chaque séquence cible amplifiée est détectée par une sonde spécifique de la mutation Hb S par détection de l'extinction de la fluorescence [6].

Le mode opératoire est décrit dans le tableau I.

Thiam L et coll. Etude comparative entre la PCR et l'isoélectrofocalisation dans le diagnostic de la drépanocytose chez l'enfant à l'Hôpital de la Paix de Ziguinchor (HPZ)/Sénégal

Thiam L et al. Comparative study between PCR and isoelectric focusing in the diagnosis of sickle cell anemia in children at the Ziguinchor Peace Hospital (ZPH) / Senegal

L'analyse des résultats est décrite à la figure 2. Le sang total a été manipulé immédiatement dans les 24 à 48 heures après le prélèvement. Le sang séché sur papier buvard a été manipulé dans les trois (03) mois après le prélèvement.

- Collecte et paramètres étudiés

Les paramètres étudiés ont été les données épidémiologiques et sociodémographiques (âge, sexe, ethnie ; origine géographique et consanguinité parentale) ; les données cliniques (antécédents,

circonstances de découverte, syndrome d'hémolyse) ; les données biologiques (hémogramme, PCR, isoélectrofocalisation). Pour chaque patient, les variables épidémiologiques, sociodémographiques, cliniques et biologiques ont été recueillies sur une fiche d'enquête puis analysées grâce au logiciel Epi-Info version 3.5.4.

- Considérations éthiques

Les règles d'anonymat et de confidentialité ont été respectées. Les résultats obtenus ont été transmis pour chaque enfant.

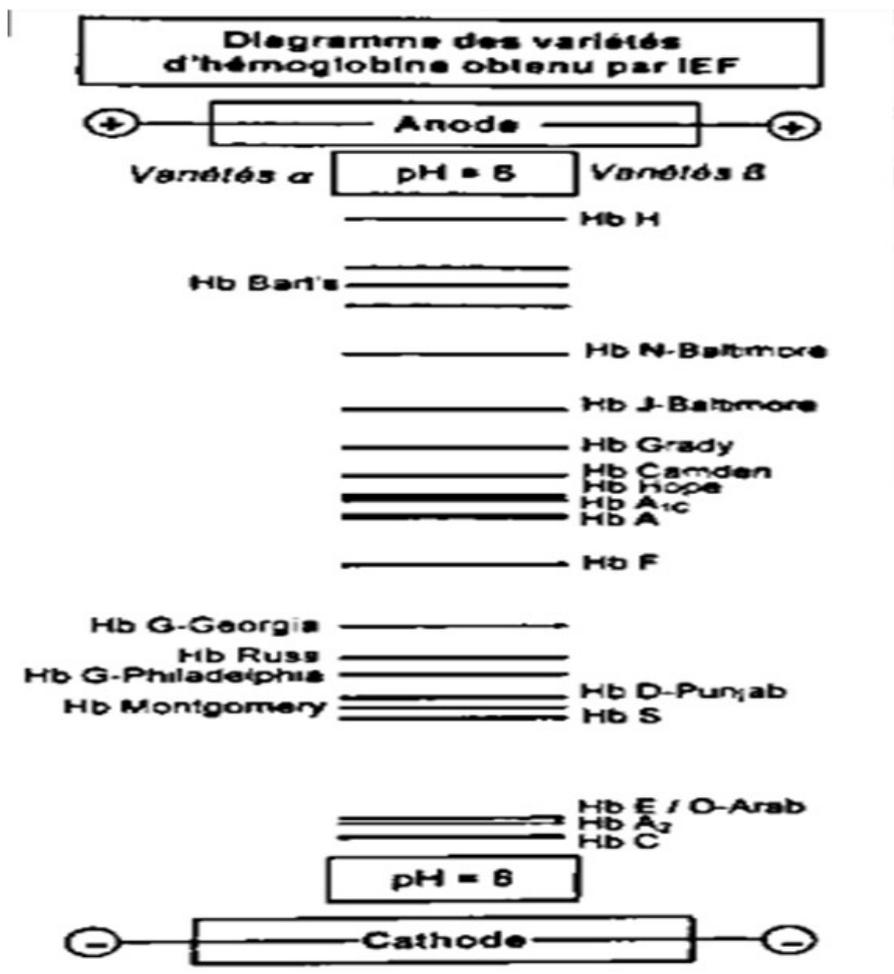


Figure 1 : Diagramme des variétés d'hémoglobine obtenue par IEF [5].

Tableau I : Mode opératoire de l'iso électrofocalisation (IEF) [5] et de la PCR [6]

IEF	PCR
<p>Echantillon : Papiers buvard</p> <p>Préparation de la solution d'élution :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 25µL de solution d'élution + 3mm de DBS dans les micro-tubes. - Vortexer pendant 10 minutes <p>Mise en place du gel d'agarose :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3ml d'eau distillée sur la plaque de refroidissement de l'unité d'électrophorèse. - Placer et centrer le gel d'agarose sur la plaque de refroidissement de l'unité d'électrophorèse. - Tout excès d'eau à la périphérie du gel doit être absorbé à l'aide d'une feuille de papier buvard. <p>Mise en place des mèches :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Placer de façon parallèle 2 mèches anodiques ± 1 mèche cathodique sur un support propre du gel. - S'assurer que les mèches sont parallèles entre elles. <p>Mise en place des gabarits d'échantillons :</p> <ul style="list-style-type: none"> - A l'aide de la technique de la parabole, positionner les gabarits d'échantillons sur le gel. <p>Distribution de l'hémolysât des patients :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Distribuer 5 µl de volumes d'hémolysât de papier-buvard de patients dans les puits d'échantillons appropriés. - Il est strictement recommandé l'utilisation de contrôles de positions pour vérifier le bon fonctionnement du test. <p>Etapas de l'électrophorèse</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dérouler les différentes étapes de l'électrophorèse 	<p>Echantillon : Papiers buvard ou sang total</p> <p>Préparation de la solution de lyse :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1000µL de tampon de lyse + 3mm de DBS dans les 6 premiers micro-tubes- - Vortexer pendant 10 minutes <p>Préparation des contrôles positif et négatif :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1000µL de tampon de lyse +5µl de contrôle positif dans le 7^{ème} micro tube et 1000µL de tampon de lyse +5µl de contrôle négatif dans le 8^{ème} micro tube. - Vortexer pendant 10 minutes <p>Distribution du tampon de la réaction LC-HbS/C-RB :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 20µl de tampon de la réaction (LC-HbS /C-RB) sont distribués dans les bandelettes de 0,2ml de LC-Genie sur une bandelette tubulaire. <p>Réaction antigène – anticorps-</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 5µl de « spécimen lyse ou contrôle de la réaction » au 20µl de tampon de la réaction (LC-HbS /C-RB) précédent.- - Utilisez uniquement les bandelettes LC-Genie <p>Analyse de la réaction par lamine LC-Genie III :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fermer correctement les tubes avec bouchons. - Charger le tube sur le système adapté de la machine LC-Génie et fermer le couvercle. - Afin de valider une analyse, les contrôles positif et négatif doivent être inclus dans chaque analyse. <p>Configuration du système de la machine LC-Genie III :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lire et suivre les instructions du manuel avant de la configurer.

Tableau II : Etapes de l'électrophorèse par iso électrofocalisation selon la technique « RESOLVE Hemoglobin kit » [5].

Etapes	Description
1	Placer le support d'électrodes au-dessus du gel et glisser les électrodes mobiles sur les mèches anodique et cathodique respectives.
2	Connecter les conducteurs d'électrode sur les conducteurs de l'unité d'électrophorèse
3	Placer le couvercle de sécurité sur l'unité et brancher les conducteurs du couvercle à l'alimentation électrique.
4	Programmer l'alimentation électrique pour qu'elle délivre une puissance constante
5	Lors de l'électrophorèse, garder les gabarits d'échantillons sur gel pendant les 1 ^{ères} minutes. A la 15 ^{ème} minute, mettre l'unité hors tension, retirer le couvercle de la chambre d'électrophorèse et retirer les gabarits. Placer le couvercle et poursuivre l'électrophorèse.
6	Sécher toute l'eau en excès pouvant apparaître sur le gel durant l'électrophorèse.
7	Mettre l'unité hors tension.
8	Retirer le couvercle de l'électrophorèse, débrancher les électrodes et retirer le support d'électrodes. L'électrophorèse est suivie par une fixation et un lavage des gels par une solution d'acide trichloracétiques à 7,67% ; ensuite une coloration par le système de coloration JB-2

RESULTATS

Durant la période d'étude, 286 échantillons de patients ont été manipulés pour les deux techniques (PCR et IEF) ; 59 échantillons étaient non interprétables à l'IEF.

Données épidémiologiques sociodémographiques et économiques des patients

L'âge moyen des enfants était de 7 ans [04 mois – 15 ans]. La majorité (77,5%) était âgée de moins de 10 ans. Le sex-ratio était de 1,2 (156 garçons et 130 filles).

L'ethnie la plus représentée a été les diolas avec 90 cas (31,5%). Les patients provenaient des régions limitrophes comme Sédhiou, Kolda et de la sous-région (Guinée, Gambie...) dans 118 cas (41,3%). Les données épidémiologiques et sociodémographiques sont représentées dans le tableau III.

Données cliniques

Plus de la moitié (58,4%) des enfants présentaient des symptômes cliniques,

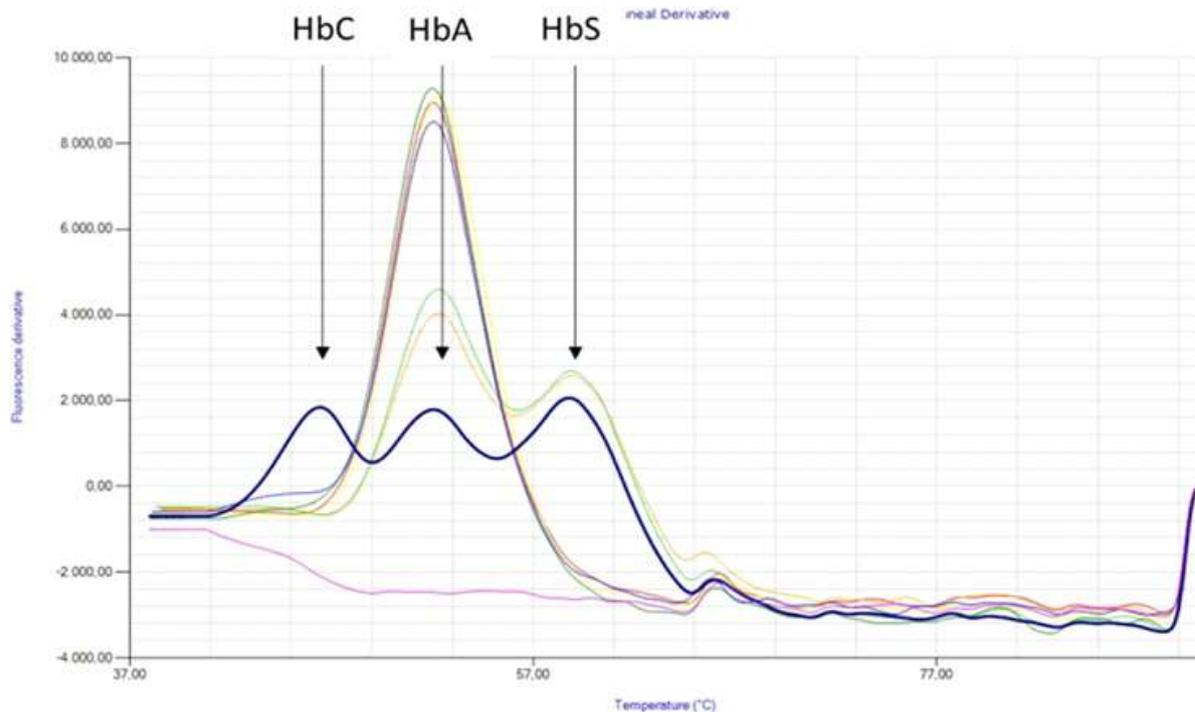


Figure 2 : Interprétation des résultats de la PCR selon la technique du KIT de la « Mutation S et C de l'hémoglobine humaine LAMP » [6].

dont des crises douloureuses (syndrome pied-main et autres crises vaso-occlusives) dans 55,2% des cas (158 enfants). Dix-neuf (19) enfants avaient des antécédents de transfusion sanguine datant de plus de 3 mois avant notre étude. Le tableau IV donne la répartition des enfants selon les données cliniques.

Données biologiques

Les 286 échantillons (100%) étaient manipulés, pour l'IEF à partir du sang séché. Pour la PCR, environ 2/3 des échantillons (183 soit 64,0%) étaient manipulés à partir du sang séché et 103 échantillons (36,0%) étaient manipulés à partir du sang total. Il y avait 10 échantillons de faux positif. C'est-à-dire TE positif, alors qu'à la PCR et à l'IEF,

on obtenait un profil AA et AC. Cinquante-huit (58) échantillons étaient non interprétables à l'IEF ; un (01) échantillon était invalide à la PCR et non interprétable à l'IEF. Le tableau V donne la corrélation entre les résultats des deux techniques utilisées. En dehors des cas non interprétables et/ou invalide, on notait une concordance de 100% entre les résultats des deux techniques.

La sensibilité et la spécificité de la PCR par rapport à l'IEF sont calculées à partir du tableau VI. La PCR avait une sensibilité à 100%, une spécificité à 100% par rapport à l'IEF. La valeur prédictive positive (VPP) était à 100% et la valeur prédictive négative (VPN) à 100%.

Tableau III : Répartition de la population selon les données épidémiologiques et sociodémographiques.

Données socio démographiques	Effectif (n = 286)	Pourcentage (%)
Sexe de l'enfant		
Masculin	156	54,5
Féminin	130	45,5
Age des enfants (ans)		
< 5	90	31,5
5 – 10	131	45,8
> 10	65	22,7
Groupe ethnique		
Diolas	90	31,5
Poullars	77	26,9
Manding	66	23,1
Wolofs	31	10,8
Sérères	17	05,9
Autres	06	02,1
Origine géographique		
Commune de Ziguinchor	168	58,7
Hors commune de Ziguinchor	118	41,3
Consanguinité parentale		
Oui	81	28,3
Non	205	71,7

L'ouverture d'un kit de PCR était possible avec 6 échantillons de prélèvements de malades et les résultats étaient disponibles au bout de 1 heure. Alors que pour l'IEF, l'ouverture d'un kit était faite à partir de 68 prélèvements de malades et les résultats n'étaient disponible que 2 heures de temps après.

Tableau IV : Répartition des enfants selon les circonstances du test, les antécédents et les signes cliniques.

Données cliniques	Effectif (n=286)	Pourcentage (%)
Circonstances du test		
Dépistage familial	119	41,6
Hospitalisation	89	31,1
Symptômes mineurs*	78	27,3
Antécédents/symptômes		
Hospitalisation	53	18,5
Transfusion	19	06,6
Syndrome pied-main	47	16,4
Autre crise vaso-occlusive	111	38,8
Hémolyse chronique	151	52,8

Symptômes mineurs* : douleur peu intense, pâleur et/ou ictère léger n'ayant pas nécessité une hospitalisation

Tableau V : Répartition des enfants selon les résultats de la PCR et de l'iso électrofocalisation (IEF).

Effectif (n = 286)	Pourcentage (%)	Résultat PCR	Résultat IEF
116	40,6	SS	SS
98	34,3	AS	AS
09	03,1	AA	AA
01	00,3	AC	AC
03	01,0	SC	SC
31	10,8	SS	NI*
26	09,1	AS	NI*
01	00,3	SC	NI*
01	00,3	INV*	NI*

INV* = Invalide

NI* = non interprétable

Le prix total d'une manipulation (68 échantillons de prélèvements de malades) était de 244 800 franc CFA pour l'IEF contre 27 000 franc CFA pour la PCR (6 échantillons de prélèvements de malades) ; ce qui revenait à 3600 franc CFA le prix d'un échantillon de malade pour l'IEF contre 4500 franc CFA le prix d'un échantillon de malade pour la PCR. A l'hémogramme, on notait une hyperleucocytose supérieure à 10 000 leucocytes/mm³ chez 176 enfants

(61,5%). Le nombre de globules blancs moyen était de 11 465 leucocytes/mm³ [4 400 – 28 650]. L'anémie avec un taux d'hémoglobine inférieur ou égal à 8 g/dl était notée chez 108 enfants. Le taux d'hémoglobine moyen était de 8,9 g/dl [1,7 – 13,4]. Le phénotype de l'enfant était significativement associé à la valeur du taux d'hémoglobine (p value=0,000). Le tableau VII donne la répartition des enfants selon le profil et l'hémogramme.

Tableau VI : Performance comparée de la PCR et de l'iso électrofocalisation selon le profil.

		Drépanocytose + (AS, AC, SS, SC)	Drépanocytose – (AA)
Résultat du test PCR	Positif	Vrai positif (VP) = 218	Faux positif (FP)=0
	Négatif	Faux négatif (FN) = 0	Vrai négatif (VN) = 9

$$\text{Sensibilité} = \frac{VP}{VP+FN}$$

$$\text{VPP} = \frac{VP}{VP+FP}$$

$$\text{Spécificité} = \frac{VN}{VN+FP}$$

$$\text{VPN} = \frac{VN}{VN+FN}$$

Tableau VII : Répartition des enfants en fonction du profil, du nombre de globules blancs et du taux d'hémoglobine.

Hémogramme		Profil		P value
		TD* (AS, AC)	SDM* (SS, SC)	
Globules blancs (éléments/mm ³)	< / = 10 000	60	41	0,071
	> 10 000	66	110	
Hémoglobine (gramme/dl)	< / = 8	19	89	0,000
	> 8	113	56	

TD* : trait drépanocytaire

SDM* : syndrome drépanocytaire majeur

DISCUSSION

Afin de valider la technique de biologie moléculaire (PCR) dans le diagnostic de la drépanocytose au laboratoire de l'HPZ, nous l'avons comparée à une technique de référence qu'est l'IEF sur un échantillon de 286 prélèvements. L'ensemble des échantillons manipulés par la technique moléculaire s'est confirmé à l'IEF. Nous n'avons observé aucune différence entre ces deux techniques quant au diagnostic de la drépanocytose. Nos résultats sont comparables à ceux retrouvés par une étude faite au Nigéria. Dans cette étude, les auteurs ont retrouvé 100% de concordance entre la PCR et l'électrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin chez 42 personnes [7]. Dans l'Etat de Khartoum au Soudan, des auteurs ont également retrouvé les mêmes résultats en comparant la PCR et l'électrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin chez 70 personnes [8]. Mais notre échantillon d'étude est 4 fois plus important et nous avons utilisé l'IEF comme référence. Cette méthode a le meilleur pouvoir de résolution et offre une meilleure séparation des différentes hémoglobines (normales ou pathologiques). Malheureusement cette technique de pointe n'est pas souvent disponible dans les pays en développement [9].

L'utilisation de la PCR dans le diagnostic de la drépanocytose à l'HPZ présente quatre avantages :

- La disponibilité de l'appareil comme seul moyen de diagnostic biologique de confirmation de la drépanocytose, disponible dans toute la région naturelle de la Casamance, dans les établissements publics de santé.
- La rapidité technique de la PCR. L'ouverture d'un kit de PCR est possible avec 6 échantillons de prélèvements de malades et les résultats sont disponibles au bout de 1 heure. Alors que pour l'IEF, l'ouverture d'un kit est faite à partir de 68 prélèvements de malades et les résultats sont disponibles au bout de 2 heures de temps.
- La machine de la PCR (Genie® III) dispose d'une batterie interne rechargeable, permettant le fonctionnement pendant une journée complète sans être branchée au réseau électrique (autonomie électrique de 3 heures de temps) [10].
- Les réactifs ne sont pas cancérigènes comparé à ceux de l'IEF, dont l'exposition à l'activateur de colorant JB2 est toxique et à la longue cancérigène [8]. Il y avait 58 échantillons non interprétables à l'IEF ; 01 échantillon invalide à la PCR et non interprétable à l'IEF. Ce qui pourrait s'expliquer par : la longue durée et la

mauvaise conservation des papiers buvards. Nos échantillons ont été conservés pendant plus de 3 mois avant la manipulation. En effet pour qu'un résultat soit de qualité, il faut que les échantillons sur papier buvard soient manipulés dans un délai d'un mois à compter de la date du prélèvement [11]. Le séchage à l'étuve peut détériorer l'hémoglobine et la conservation des papiers buvards dans un milieu humide peut rendre non interprétable les résultats [12,13].

Concernant le traitement des échantillons, d'une part le prélèvement sur tube EDTA est plus simple, mais d'autre part il est plus facile de transporter les papiers buvards, que de transporter les tubes EDTA.

Par ailleurs, sur 286 cas avec TE positif, il y'avait 10 cas de faux positif, c'est-à-dire TE positif alors qu'à la PCR et à l'IEF on obtient un profil normal Hb AA, ou un hétérozygote Hb AC. Nos résultats rejoignent ceux d'une étude faite au Bénin, sur 415 échantillons les auteurs notaient 7 cas de faux négatifs et 4 cas de faux positifs [14]. Une contre lecture des lames de TE permettrait d'éliminer les faux positifs de notre étude. En effet l'HbAA et HbAC ne peuvent jamais donner un TE positif.

Ces résultats nous montrent les limites de notre étude. Le screening par le TE dans

les critères d'inclusion ne nous permet pas de recruter les nourrissons âgés de moins de 6 mois. En plus le TE n'est pas discriminatoire puisqu'il y'a beaucoup de faux positifs et de faux négatifs.

Dans notre étude les phénotypes majoritaires étaient ceux des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) avec au total 151 cas, soit 52,8% (147 cas d'homozygotes SS et 04 cas d'hétérozygoties SC). Puis il s'en suit les hétérozygotes ou trait drépanocytaire avec au total 125 cas, soit 43,7% (124 cas d'hétérozygotes AS et 01 cas d'hétérozygote AC). Nos résultats différents de ceux de l'étude faite au Soudan. Dans cette étude, les auteurs ont comparé les deux méthodes de diagnostic sur un échantillon de 70 personnes, composé de 35 cas de drépanocytaires homozygotes SS ; 15 cas de drépanocytaires hétérozygotes AS et 20 cas de sujets normaux AA [8]. Cela peut s'expliquer par le fait que notre étude s'est déroulée en milieu hospitalier sur un plus grand échantillon.

Parmi les 151 enfants présentant un SDM, il y avait 119 (78,8%) enfants âgés de moins de 10 ans. Cette tranche d'âge de moins de 10 ans que nous avons trouvée était identique à celle que nous avons trouvée dans la même région de Ziguinchor en 2017 et dans la région de Dakar (âge médian 8 ans) [3, 15]. Dans

Thiam L et coll. Etude comparative entre la PCR et l'isoélectrofocalisation dans le diagnostic de la drépanocytose chez l'enfant à l'Hôpital de la Paix de Ziguinchor (HPZ)/Sénégal

ces études, les auteurs avaient noté que, respectivement 63% et 65% des enfants drépanocytaires de leur série avaient moins de 10 ans.

CONCLUSION

Il y avait une concordance de 100% entre les résultats des deux techniques comparées. La validité de cette technique de biologie moléculaire sur notre échantillon, est caractérisée par : la rapidité technique, un risque moindre. Par ailleurs le cout financier est légèrement plus élevé par rapport à l'isoélectrofocalisation. Nous recommandons la PCR par la technique du KIT de la « Mutation S et C de l'hémoglobine humaine LAMP » pour le diagnostic biologique de la drépanocytose à l'hôpital de la Paix de Ziguinchor.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

REFERENCES

1. Rapport du directeur regional OMS : Comité régional de l'Afrique, 60. (2011). Drépanocytose : une stratégie pour la Région africaine de l'OMS. [Consulté le 06/05/2019]. Disponible sur internet : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/1727>.

Thiam L et al. Comparative study between PCR and isoelectric focusing in the diagnosis of sickle cell anemia in children at the Ziguinchor Peace Hospital (ZPH) / Senegal

2. OMS. Rapport de l'OMS sur la Prévalence mondiale de la drépanocytose, 24 avril 2006. Disponible sur internet : apps.who.int/A59_9-fr. [consulté le 6/05/2019].

3. Diagne I, Ndiaye O, Moreira N, Signate-Sy H, Camara B, Diouf S, Diack-Mbaye A, Ba M, Sarr M, Sow D, Fall M. Les syndromes drépanocytaires majeurs en pédiatrie à Dakar (Sénégal). Archives de Pédiatrie. 2000;7(1):16-24.

4. Makalou D, Doupa D, Seck N, Thiam O, Guèye MW, Coly MN, Gadjji M, Sène A, Diop M, Seydi F, Sène M, Mbaye G, Kamara R, Mbaye O, Touré AO, Diagne I. Dépistage néonatal de la drépanocytose et autres hémoglobinopathies à Saint Louis : résultats préliminaires. Revue africaine de Biologie Médicale. 2020;5(10):807-813.

5. Basset P, Beuzard Y, Garel MC, Rosa J. Isoelectric Focusing of Human Hemoglobin: Its Application to Screening, to the Characterization of 70 Variants, and to the Study of Modified Fractions of Normal Hemoglobins. Blood. 1978; 51(5):971-982.

- 6. Detemmerman L, Olivier S, Bours V, Boemer F.** Innovative PCR without DNA extraction for African sickle cell disease diagnosis. *Hematology*.2018;23(3):181–186.
- 7. Toye ET, Marle GV, Hutchins W, Abgabiaje O, Okpuzor J.** Single tube allele specific PCR: a low cost technique for molecular screening of sickle cell anaemia in Nigeria. *African Health Sciences*.2018;18(4):995-1002.
- 8. Abdelazim MF, Ali EW, Abdelgader EA.** Comparison between PCR– based Single Tube Genotyping of Sickle Cell Disease and Alkaline Haemoglobin Electrophoresis. *British Journal of Medicine & Medical Research*.2015; 10(9):1-6.
- 9. Essono ME, Nkoa T.** Diagnostic et anomalies biologiques chez un drépanocytaire. *Clinics in Mother and Child Health*. 2004;1(1):12-20.
- 10. Genie® II MkII – OptiGene.** [Consulté le 19 juillet 2017]. Disponible sur internet : <http://www.optigene.co.uk/wp-content/uploads/2019/02/Optigene-Genie-III-A4-Flyer-ARTWORK-1.pdf>.
- 11. Adam BW, Chafin DL, De Jesús VR.** Stabilities of hemoglobins A and S in dried blood spots stored under controlled conditions. *Clinical Biochemistry*.2013; 46(12):1089-1092.
- 12. Hirtz C, Lehmann S.** Le prélèvement sanguin sur papier buvard : une révolution de la biologie médicale en marche ? *Annales de Biologie Clinique*.2015;73(1): 25-37.
- 13. Costa X, Jardi R, Rodriguez F, Miravittles M, Cotrina M, Gonzalez C et al.** Simple method for alpha 1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens. *European Respiratory Journal*.2000;15(6):1111-5.
- 14. Assoumanou M, Issifou D, Akpona A.** Le test de précipitation en milieu réduit : une alternative au test d’Emmel dans le dépistage de l’hémoglobine S. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*.2010;4(2):354-361.
- 15. Thiam L, Drame A, Coly IZ, Diouf FN, Seck N, Boiro D, et al.** Profils épidémiologiques, cliniques et hématologiques de la drépanocytose homozygote SS en phase inter critique chez l’enfant à Ziguinchor, Sénégal. *Revue d’oncologie hématologie pédiatrique*.2017;5:130-5.