

Pièges et mésusages des tests de diagnostic rapide pour rechercher le paludisme en routine

Tricks and misuses of rapid diagnostic testing for malaria diagnosis

Victor Mercier¹

Éric Bailly¹

Nathalie Van Langendonck¹

Eloi Chevallier²

Louis Bernard³

Guillaume Desoubieux¹

¹ Service de parasitologie-mycologie-médecine tropicale, CHU de Tours, France

² Service de néphrologie, CHU de Tours, France

³ Service de médecine interne et maladies infectieuses, CHU de Tours, France

Résumé. Des tests de biologie moléculaire ou de détection d'antigènes par immunochromatographie (tests de diagnostic rapide ou TDR) sont classiquement proposés comme aides au diagnostic du paludisme en routine. Cependant, l'interprétation de leurs résultats nécessite une connaissance précise de leurs limites, aussi bien par le biologiste que par le clinicien. Elle est en particulier conditionnée par un interrogatoire méticuleux du patient afin de ne pas méconnaître un antécédent d'accès palustre récent ou même plus ancien. Nous discutons ici des différents usages et de l'interprétation de ces outils diagnostiques, en prenant exemple d'un cas de paludisme particulièrement difficile à investiguer.

Mots clés : *paludisme, test de diagnostic rapide, LAMP, PCR*

Abstract. Molecular biology or immunochromatographic tests are conventionally offered as aids in the routine diagnosis of malaria. However, the interpretation of their results requires a precise knowledge of their limits, both by the biologist and the physician. It is in particular conditioned by thorough interview of the patient in order to seek a history of recent or even older malaria disease. We discuss herein the different usages and how to interpret such diagnostics, through a concrete example of a malaria case which was particularly tough to investigate.

Key words: *malaria, rapid diagnostic test, LAMP, PCR*

Article reçu le 20 novembre 2019,
accepté le 24 février 2020

Des tests de biologie moléculaire ou de détection d'antigènes par immunochromatographie (tests de diagnostic rapide ou TDR) sont classiquement proposés comme aides au diagnostic du paludisme en routine. Cependant, l'interprétation de leurs résultats nécessite une connaissance précise de leurs limites, aussi bien par le biologiste que par le clinicien. Elle est en particulier conditionnée par un interrogatoire méticuleux du patient afin de ne pas méconnaître un antécédent d'accès palustre récent ou même plus ancien.

Nous rapportons ici le cas d'une patiente de 58 ans d'origine africaine. Ce jour (J0), elle présente de la fièvre, et souffre d'insuffisance rénale aiguë, probablement liée à une néphropathie cristalline (hypophosphatémie, créatininémie à 566 $\mu\text{mol/L}$, et découverte de cristaux d'oxalate dans les urines fraîches), ainsi que d'une infection active à virus de

l'hépatite C (sérologie positive pour les anticorps anti-VHC totaux et charge virale VHC à 6,23 \log_{10} UI d'ARN/mL). Son bilan d'entrée montre un taux de plaquettes assez bas à $149 \times 10^9/\text{L}$ et une anémie à 9,0 g/dL. Elle vit en France métropolitaine depuis près de 20 ans et n'est jamais retournée en Afrique durant toute cette période, à part lors d'un séjour récent de deux mois au Cameroun dont elle est revenue une semaine plus tôt (J-7). Sur place, elle a suivi une chimioprophylaxie antipaludique par doxycycline jusqu'à une semaine après son retour (de J-65 à J0, jour de la présente consultation). La posologie quotidienne était élevée à 200 mg pour cause de surpoids, la patiente pesant 103 kg. Par ailleurs, elle allègue volontiers quelques oublis de prise. La recherche directe de paludisme réalisée à J0 est négative par frottis sanguin mince et goutte épaisse rapide [1]. En revanche, la détection d'antigènes plasmodiaux circulants par TDR *via* le kit PaluTop® 4+ Optima® (Biosynex, Strasbourg, France) met en évidence la présence de la protéine parasitaire HRP-2 (protéine-2 riche en histidine, spécifique

Correspondance : G. Desoubieux
<guillaume.desoubieux@univ-tours.fr>

de l'espèce *Plasmodium falciparum*). Devant la discordance entre les résultats de l'approche microscopique et la détection des antigènes plasmodiaux, l'interrogatoire plus précis de la patiente permet de rapporter qu'environ sept jours avant son retour en France, elle a reçu un traitement antipaludique empirique à base de dihydroartémisinine et pipéraquline par voie orale pendant trois jours (J-15 à J-12) pour fièvre, céphalées, nausées et vomissements, douleurs abdominales et myalgies [2] (sans possibilité de savoir quel était le niveau d'observance, ni même la posologie prescrite). Au vu de tous ces éléments, il est donc d'abord naturellement conclu à un épisode d'accès palustre résolu récemment, avec persistance d'antigène plasmodial circulant, et sans lien avec le reste de son actualité médicale.

Cependant, la patiente consulte de nouveau, une semaine plus tard, pour persistance des symptômes (J7). Cette fois-ci, le diagnostic d'accès palustre aigu est clairement établi devant l'observation de trophozoïtes de *P. falciparum* sur le frottis sanguin. Un traitement curatif à base de dérivé d'artémisinine par voie orale en combinaison est alors prescrit. *A posteriori* une contre-expertise, effectuée par le Centre national de référence (CNR) du paludisme (qui surveille les cas de paludisme importés depuis 1985 en se reposant sur un réseau bénévole de laboratoires de parasitologie métropolitains et d'outre-mer), est réalisée à partir du prélèvement initial (J0). Les tests complémentaires avec les kits TDR Vikia Malaria® Ag Pf/Pan (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) et PaluTop® 4+ Optima® (Biosynex, Strasbourg, France) se révèlent positifs pour la recherche d'antigène HRP-2, et négatifs pour l'antigène aldolase (enzyme commune à toutes les espèces du genre *Plasmodium*), ainsi que pour p-LDHcom (lactico-déshydrogénase commune à toutes les espèces du genre *Plasmodium*), respectivement. Aussi pour vérifier la spécificité des résultats de ces TDR, l'ADN plasmodial circulant a été recherché : sans succès avec le kit PCR LAMP Alethia® (Méri-dian, Cincinnati, Ohio, USA), mais positivement avec PCR LAMP Alethia® PLUS (Méri-dian, Cincinnati, Ohio, USA). Enfin, la trousse PCRq Fast track Diagnostic® (Esch-sur-Alzette, Luxembourg) détecte l'ADN de *P. falciparum* avec un Cq (cycle quantitatif) à 28 cycles.

Il est nécessaire au biologiste, comme au clinicien, de bien connaître les limites des tests utilisés en diagnostic de routine pour la recherche de paludisme. Il est habituellement admis que les limites de détection s'étalent entre 100 parasites par microlitre pour le frottis sanguin mince, et 10 à 100 pour la goutte épaisse [3, 4] (même si la lecture et l'interprétation de cette dernière restent délicates, et dépendent surtout de l'expérience du microscopiste). En contraste, les performances des TDR ou des PCR rapides, type LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), sont globalement meilleures [5], ces dernières étant presque dix fois plus sensibles. Ainsi, la

recherche d'ADN plasmodial dans le sang circulant par le test PCR commercial Alethia® Malaria approche une limite de détection déterminée à deux parasites par microlitre. Par rapport à la technique de référence qu'est la microscopie optique, ce kit a montré une sensibilité de 97,3 % (IC_{95%} [90,7–99,7]) (en comparaison, la sensibilité du TDR Biosynex PaluTop® 4+ Optima a été estimée à 94 % pour l'antigène HRP-2 de *P. falciparum* [6]), avec une spécificité de 93,8 % [5]). Il possède aussi une version améliorée avec le kit Alethia® Malaria PLUS qui autorise une meilleure purification des acides nucléiques ; sa limite de détection devient alors très basse, de l'ordre de 0,25 parasite par microlitre pour *P. falciparum*. Néanmoins, l'interprétation clinique qui est faite de tous ces tests rapides doit rester prudente. D'une part, ils n'autorisent pas la distinction des stades parasitaires (en particulier, les PCR rapides sont incapables de différencier les ADN issus des gamétocytes – formes parasitaires sexuées dont la présence dans le sang est normale en période post-thérapeutique – et ceux des trophozoïtes et schizontes - formes asexuées responsables de la maladie clinique), et ne permettent pas d'estimer la parasitémie [7], et parfois ne différencient même pas les espèces plasmodiales les unes des autres (comme le kit PCR rapide Alethia® Malaria). D'autre part, les antigènes plasmodiaux et/ou l'ADN circulants peuvent parfois rester détectables dans le sang des patients infectés pendant plusieurs semaines après la résolution de l'accès aigu, voire jusqu'à un mois pour l'antigène HRP-2. Les résultats sont uniquement qualitatifs, ne permettant pas une maîtrise claire de la cinétique d'évolution des ADN et/ou antigènes détectés. Ces outils de dépistage sont donc peu contributifs pour le suivi post-thérapeutique, et dans certaines conditions peuvent même brouiller les pistes diagnostiques. Dans la situation présentée ici, il était impossible de faire la distinction entre un accès palustre débutant à parasitémie (*i.e.* observation directe dans le sang des formes parasitaires asexuées) encore sub-microscopique, et un cas guéri récemment par l'administration de médicaments antipaludiques. Vraisemblablement, nous avons affaire à une situation hybride d'un sujet qui avait subi un accès palustre une semaine auparavant. Celui-ci a été mal contrôlé par la prise en charge thérapeutique initiale en Afrique, la mauvaise observance du traitement antipaludique curatif ou le sous-dosage posologique (à cause du surpoids et/ou des vomissements) ayant pu avoir décapité l'infection sans l'éradiquer complètement. Cet épisode a laissé ensuite place à une rechute authentique débutant avec une parasitémie sub-microscopique au moment de la première consultation au retour du Cameroun. En effet, au cours du cycle de multiplication de *Plasmodium falciparum*, la formation de chaque schizonte endo-érythrocytaire aboutit à la production subséquente de 16 à 24 parasites en 48h qui, lors de la lyse de l'hématie parasitée, vont à

leur tour parasiter d'autres globules rouges. De ce fait, la parasitémie augmente de façon exponentielle, au rythme de chaque fin de cycle schizogonique érythrocytaire. Dans le cas présent, elle est ainsi passée d'un statut initialement indétectable par microscopie (mais détectable avec les kits PCR rapide et TDR) à celui de détectable, en l'espace de quelques jours d'évolution seulement qui correspondent au délai entre les deux consultations.

À ce jour, la stratégie diagnostique biologique d'un accès palustre d'importation devrait associer une technique sensible (goutte épaisse, QBC – fluorescence *Quantitative buffy coat*® - ou technique de biologie moléculaire à réponse rapide de type LAMP) à un frottis sanguin mince (pour l'évaluation spécifique de la parasitémie et l'identification des espèces), afin de pouvoir rendre un diagnostic fiable dans les deux heures. En pratique, l'association d'un frottis mince et d'un TDR est une alternative crédible, quand l'algorithme précédent ne peut être mis en œuvre [8]. Dans tous les cas, les tests complémentaires moléculaires et antigéniques susmentionnés ne doivent aucunement se substituer totalement aux techniques microscopiques. Ils tendent plutôt à les compléter en palliant les limites de sensibilité de ces dernières et en aidant à renforcer la vigilance en cas de situations discordantes. L'identification d'espèce et le calcul de la parasitémie restent indispensables au diagnostic et au pronostic, ainsi qu'au suivi post-thérapeutique de l'accès palustre. À la lumière des limites de chacune des méthodes décrites ci-dessus, le biologiste médical doit savoir garder son esprit critique.

Remerciements. Les auteurs adressent leur profonde gratitude aux membres du CNR paludisme de Paris pour leur accompagnement.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Thellier M, Datry A, Cissé OA, San C, Biligui S, Silvie O, *et al.* Diagnosis of malaria using thick bloods smears: definition and evaluation of a faster protocol with improved readability. *Ann Trop Med Parasitol* 2002 ; 96(2) : 115-24.
2. Traitement du paludisme - tour d'horizon, mise à jour 8 février 2018. Organisation Mondiale de la Santé (OMS) <https://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/fr/>.
3. Unknown author. Malaria diagnosis: memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization* 1988 ; 66(5) : 575-94.
4. World Health Organization. New perspectives in malaria diagnosis: report of a joint WHO/USAID informal consultation. 25 to 27 October 1999, document no WHO/CDS/RBM/2000.14; WHO/MAL/2000.1091. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2000.
5. Rypien C, Chow B, Chan WW, Church DL, Pillai DR. Detection of plasmodium infection by the illumigene malaria assay compared to reference microscopy and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2017 ; 55(10) : 3037-45.
6. Houzé S, Boutron I, Marmorat A I, Dalichampt M, Choquet C, Poilane I, *et al.* Performance of rapid diagnostic tests for imported malaria in clinical practice: Results of a national multicenter study. *PLoS ONE* 2013 ; 8(9) : e75486.
7. Frickmann H, Wegner C, Ruben S, Behrens C, Kollenda H, Hinz R, *et al.* Evaluation of the multiplex real-time PCR assays RealStar malaria S&T PCR kit 1.0 and FTD malaria differentiation for the differentiation of Plasmodium species in clinical samples. *Travel Med Infect Dis* 2019 ; 31 : 101442.
8. Desoubreux G, Chandener J. Diagnostic biologique du paludisme d'importation. *Revue Francophone des Laboratoires* 2017 ; 497 : 34-43.