

Valeur des tests rapides pour le diagnostic du paludisme au Bénin

Aubouy A¹, Dechavanne S¹, Dasseya R¹, Massougbodji A²

1. UMR216 Mère et Enfant face aux Infections Tropicales, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), laboratoire IRD/FSS/ISBA, Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA)/Faculté des Sciences de la Santé (FSS), Cotonou, Bénin

2. UER de Parasitologie-Myologie, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey Calavi, Bénin

Med Trop 2010 ; **70** : 485-489

RÉSUMÉ • La qualité du diagnostic du paludisme en zone endémique est fondamentale. Notre étude avait pour but d'évaluer un type de test de diagnostic rapide du paludisme disponible au Bénin, par comparaison à la goutte épaisse habituellement réalisée. Pour ce faire, 84 patients présentant une prescription de goutte épaisse ont été inclus dans l'étude. Gouttes épaisses et tests rapides ont été réalisés en aveugle dans des laboratoires de Cotonou, puis confrontés aux résultats de gouttes épaisses et de PCR réalisés dans notre laboratoire choisi pour référence. Sensibilité et spécificité des techniques ont été évaluées par rapport à la PCR, de même que les valeurs prédictives des diagnostics positifs et négatifs. Le test rapide a montré des résultats très supérieurs à la microscopie des laboratoires extérieurs pour la détection de vrais diagnostics positifs. La goutte épaisse des laboratoires extérieurs a conduit à douze faux diagnostics positifs, résultant en une mauvaise valeur prédictive des diagnostics positifs (58,6%), comparativement à celle du test rapide (85,7%). Sensibilité et spécificité du test rapide (90,0 et 95,3%) étaient également plus élevées que celles de la goutte épaisse des laboratoires extérieurs (85,0 et 81,2%). Ces résultats montrent l'intérêt de l'utilisation du test rapide pour améliorer la qualité du diagnostic du paludisme si celle de la microscopie est moindre. Les dangers de faux diagnostics, ainsi que les limites des différents types de diagnostic sont discutés.

MOTS-CLÉS • Paludisme. Test rapide. PCR. Bénin.

VALUE OF RAPID TESTS FOR DIAGNOSIS OF MALARIA IN BENIN

ABSTRACT • Reliable diagnosis of malaria is essential in malaria endemic areas. The purpose of this study was to compare the performance of rapid diagnostic tests to that of the thick and thin blood smear techniques conventionally used for diagnosis of malaria. A total of 84 patients presenting malaria symptoms were included and tested for malaria. Results of blood smears and rapid tests performed blindly in external labs were compared with results of blood smears and PCR done in our reference laboratory. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value were determined using PCR as the gold standard. Results of the rapid diagnostic test were much better than those of the microscopic technique performed in external labs, particularly with regard to true positivity. The blood smear technique in external labs led to 12 false positive diagnoses and was associated with a lower positive predictive value than the rapid test: 58.6% vs. 85.7%. The sensitivity and specificity of the rapid test were also higher than those obtained in external laboratories using blood smear techniques: 90.0% and 95.3% respectively versus 85.0% and 81.2% respectively. The results of this study indicate that the rapid test is more reliable than microscopy and that its use would improve malaria diagnosis. Risks factors for false diagnosis and limitations of the different diagnostic techniques are discussed.

KEY WORDS • Malaria. Rapid test. PCR. Benin.

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est une parasitose dont l'évolution clinique peut être dramatique. L'impact de la mortalité en zone endémique du paludisme était estimé à 881 000 en 2006, dont 91 % en Afrique (1). Le diagnostic d'une telle affection est par conséquent fondamental. Ce diagnostic repose si possible sur un diagnostic clinique combiné à un diagnostic biologique, car la justesse du diagnostic clinique est limitée par la faible spécificité des symptômes de cette parasitose. Par ailleurs, le déploiement actuel des combinaisons thérapeutiques à base des dérivés de l'artémisinine (2) dont le coût non subventionné est 10 à 30 fois plus élevé qu'un traitement à base de chloroquine, encourage un diagnostic juste permettant une utilisation ciblée de ces traitements. En ce sens, l'OMS recommande de ne traiter parmi les sujets présentant des symptômes cliniques de paludisme simple, uniquement les sujets dont le diagnostic parasitologique est positif, et ce au moins chez les enfants de plus de 5 ans et les femmes non enceintes (1).

Le diagnostic biologique du paludisme repose encore le plus souvent sur un diagnostic direct de mise en évidence des *Plasmodium* dans le sang par goutte épaisse et frottis sanguin (GE/FS), la méthode de référence pour l'OMS. Cette technique a une sensibilité de 4 à 20 parasites/µl de sang (3-5), bien que dans

des conditions de terrain, un seuil de 50-100 parasites/µl de sang soit plus réaliste (6, 7). Cependant, la sensibilité de la GE/FS est très variable et la technique repose sur l'accès à des microscopes, l'électricité, mais surtout à des microscopistes bien formés, une maintenance rigoureuse du matériel, ainsi qu'un contrôle de qualité régulier (8). Les tests de diagnostics rapides (TDR) présentent un potentiel pour améliorer la qualité du diagnostic du paludisme. Ces tests présentent l'avantage d'une plus grande faisabilité que la GE/FS puisqu'ils ne nécessitent pas de personnels de santé expérimentés, d'infrastructure spécifique, et présentent une grande rapidité dans l'exécution et l'obtention du résultat (5 à 15 minutes). Leur principe repose sur la technologie d'immunochromatographie et permet la détection d'un antigène de *Plasmodium* par immunocapture à l'aide d'un anticorps spécifique. Les anticorps utilisés peuvent être spécifiques d'une seule espèce de *Plasmodium*, ou être « pan-spécifiques » c'est-à-dire capables de reconnaître plusieurs espèces de *Plasmodium*. Les protéines histidine-rich protein 2 (HRP-2), *Plasmodium* lactate deshydrogénase (pLDH) et moins fréquemment l'aldolase, sont les trois protéines utilisées dans les TDR commerciaux. De nombreuses études ont comparé les TDR au diagnostic par GE/FS et l'OMS s'intéresse de près à ces diagnostics rapides, recommandant leur utilisation dans les centres de santé dépourvus de laboratoire ou dans les zones où une bonne qualité de microscopie ne peut être maintenue (9, 10).

• Correspondance : agnes.aubouy@ird.fr

• Article reçu le 17/03/2010, définitivement accepté le 22/07/2010

Au Bénin, la majorité des centres de santé ne disposent pas d'un laboratoire permettant un diagnostic par GE/FS, or les TDR sont encore peu utilisés dans les centres publics et privés du pays. Par conséquent, le traitement présomptif de toute fièvre reste répandu, bien que l'utilisation de la combinaison arthéméter-luméfanantrine pour le traitement du paludisme simple soit recommandée au Bénin depuis 2004. Dans ce cadre, notre étude avait pour but d'évaluer un type de TDR disponible à Cotonou, par comparaison à la GE/FS habituellement réalisée pour le primodiagnostic du paludisme. Pour ce faire, GE/FS et TDR ont été réalisés en aveugle dans deux laboratoires d'analyses médicales de Cotonou (LAM), puis confrontés aux résultats des GE/FS et de PCR réalisés dans le laboratoire IRD/FSS/ISBA choisi comme laboratoire de référence dans cette étude.

Patients et méthodes

L'étude s'est déroulée entre février 2008 et juillet 2009 dans deux laboratoires de Cotonou au Bénin. Cotonou bénéficie d'un climat sub-équatorial autorisant une transmission palustre pérenne avec des pics correspondant aux deux saisons pluvieuses (avril-juillet et septembre-novembre) (11). La ville de Cotonou est caractérisée par des inondations persistantes pendant les pluies, favorisant la multiplication anophélienne (12). *P. falciparum* est l'espèce la plus largement rencontrée dans la zone (13). Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique institutionnel de la Faculté des Sciences de la Santé (FSS), de l'Université d'Abomey Calavi au Bénin.

Des patients présentant une prescription de GE/FS ont été inclus dans l'étude, sous réserve de leur consentement écrit. Les enfants étaient sous la responsabilité de leur parent. Un questionnaire était rempli, afin de recueillir des données générales sur les patients. Un prélèvement de 4 mL de sang veineux sur EDTA était réalisé pour les examens de GE/FS, TDR et de numération - formule sanguine (NFS), ainsi que pour la confection de confettis (recueil de trois gouttes de sang sur papier Whatmann, 3MM). GE/FS et TDR étaient réalisés par deux personnes différentes et analysés séparément sans confrontation des résultats avant la fin de l'étude. Le TDR utilisé était spécifique de la protéine PfHRP2 de *P. falciparum* (Malaria Quick test, Cypress Diagnostics, Langdorp, Belgique) et disponible à Cotonou. Les GE/FS étaient fixées au méthanol puis colorées au Giemsa 10%. Les GE étaient lues à raison de 200 leucocytes pour les lames positives, et 500 leucocytes pour les lames négatives ; la densité parasitaire était calculée sur la base de 8 000 leucocytes/ μ L de sang. Une lame de GE/FS était confectionnée en plus pour coloration et lecture dans le laboratoire de référence IRD/FSS/ISBA.

Dans le laboratoire de référence, les lames reçues étaient colorées et lues dans les mêmes conditions que dans les deux laboratoires extérieurs. Les confettis étaient séchés et conservés à température ambiante jusqu'à l'extraction de l'ADN par la méthode du chelex (14). Une PCR simple d'espèce a été réalisée à partir de 4 μ L d'ADN extrait à l'aide d'amorces spécifiques de la petite sous-unité ribosomale de l'ADN de *P. falciparum* comme suit : rfa1 5'-TTAAACTggTgTggAAAACCAAATATATT, rfa2 5'-ACACAATgAACTCAATCATgACTACCCgTC (15). La température d'hybridation était de 58°C. Les produits de PCR ont été migrés sur un gel d'agarose 1,5% contenant du bromure d'éthidium, puis visualisés par transillumination aux UV. Le résultat de la PCR était la présence ou l'absence de la bande attendue de 220 bp. Quatre témoins négatifs et deux témoins positifs d'infection à *P. falcipa-*

rum ont été inclus, l'extraction d'ADN et la PCR a été réalisée en même temps et dans les mêmes conditions que pour les échantillons de l'étude. Les témoins négatifs étaient des personnes vivant en France et arrivées à Cotonou depuis moins d'une semaine. Les témoins positifs étaient des sujets présentant un paludisme clinique confirmé par GE. Les résultats obtenus dans les deux laboratoires ont été confrontés après la clôture de l'étude.

Sensibilité et spécificité des techniques (GE/FS A, GE/FS B, TDR) ont été évaluées avec pour référence la PCR, technique la plus sensible. La sensibilité a été définie comme le nombre de vrais positifs (VP) sur la somme du nombre de VP et de faux négatifs (FN). La spécificité était le nombre de vrais négatifs (VN) sur la somme de VN et de faux positifs (FP). Les valeurs prédictives de diagnostics positifs (VPP) et négatifs (VPN) ont également été calculées comme suit : $VPP = VP/(VP+FP)$, $VPN = VN/(VN+FN)$. Le test non paramétrique U de Mann-Whitney a été utilisé pour analyser la relation entre les valeurs hématologiques et le résultat de la PCR. Les données ont été analysées sur le logiciel Statview (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Résultats

Quatre-vingt-quatre patients ont été inclus dans l'étude. Le tableau 1 présente les données descriptives des sujets inclus. La plupart des sujets étaient d'origine béninoise (57,1%). Le groupe était composé de patients issus de toutes les classes d'âges, de 1 à 62 ans. Les sujets utilisaient pour la plupart une moustiquaire. Environ 20% des sujets (18/84), en majorité d'origine béninoise (15/18), ont déclaré utiliser une prophylaxie antipalustre. Les prophylaxies utilisées étaient pour la plupart constituées de chloroquine ou de tisane. La moyenne géométrique (IC95%) de la durée du séjour au Bénin des sujets étrangers était de 11,6 mois (8,6 - 15,5). La température moyenne (\pm déviation standard) à l'inclusion était de 38,3 (\pm 0,9) °C. Les sujets inclus ont subi entre 0 et 35 jours de fièvre avant de venir consulter, soit 4,2 jours (\pm 5,8) en moyenne.

Le tableau 2 présente les résultats obtenus pour tous les échantillons selon le type de diagnostic. Seule l'espèce *falciparum* a été mise en évidence sur les GE/FS. Dans les laboratoires extérieurs, 29 GE ont été lues positives, 21 TDR ont été obtenus positifs. Douze diagnostics de GE positives étaient négatifs en PCR, et 3 diagnostics de GE négatives étaient positifs en PCR. Ces trois lames ont également été lues négatives par notre laboratoire. Pour

Tableau 1. Données descriptives des sujets inclus, Cotonou, 2008.

	Critères	n (%)
Nationalité	Européenne	33 (39,3)
	Béninoise	48 (57,1)
	Nigériane	1 (1,2)
	Nord américaine	2 (2,4)
Sexe	F	50 (59,5)
	M	33 (39,3)§
Age	0 - 5 ans	27 (32,1)
	6 à 15 ans	11 (13,1)
	16 à 30 ans	11 (13,1)
	> 30 ans	35 (41,7)
Utilisation d'une moustiquaire	Oui	74 (88,1)
	Non	10 (11,9)
Prophylaxie antipalustre	Oui	18 (21,4)*
	Non	66 (78,6)

§ un sujet non renseigné ; * chloroquine (7), tisanes (4), chloroquine-proguanil (1), proguanil (1), sulfadoxine-pyriméthamine (1), quinine (1), non renseigné (3).

Tableau 2. Comparaison des résultats de gouttes épaisses (GE), tests de diagnostic rapide (TDR) et PCR, Cotonou, 2008. Les résultats étaient négatifs (-) ou positifs (+). Les GE positives sont signalées par leurs parasitemies par µL de sang.

Echantillon	GE IRD/FSS/ISBA (µl de sang)	PCR référence	GE LAM (µl de sang)	TDR
AB07	-	-	3 200	-
AB14	-	-	1 600	-
AB23	-	-	800	-
AB27	-	-	360	-
AB36	-	-	3 200	-
AB38	-	-	360	-
AB40	-	-	1 200	-
AB49	-	-	1 050	-
AB64	-	-	60	-
AB68	-	-	200	-
AB16	-	-	3 600	+
AB45	-	-	25 000	+
AB62	-	-	-	+
AB29	-	+	-	+
AB70	-	+	-	-
AB72	-	+	-	-
AB15	70 762	+	4 800	+
AB18	5 920	+	5 600	+
AB19	51 948	+	4 400	+
AB41	50 889	+	312 000	+
AB42	44	+	500	+
AB43	14 165	+	42 000	+
AB44	9 244	+	8 000	+
AB46	4 524	+	24 000	+
AB47	14 838	+	30	+
AB48	10 118	+	52 000	+
AB59	1 360 000	+	2 048 000	+
AB60	11 697	+	42 000	+
AB61	2 950	+	136 000	+
AB65	42 471	+	244 000	+
AB66	13 579	+	144 000	+
AB67	120 000	+	28 000	+
AB69	450	+	60	+
Autres§	-	-	-	-

§ n = 51

les TDR, 3 diagnostics positifs étaient PCR négatifs, et deux TDR négatifs correspondaient à des PCR positives. Dans notre laboratoire, 17 GE/FS ont été lues positives. Trois diagnostics jugés négatifs en GE étaient positifs en PCR. Ainsi, par rapport à la PCR, les laboratoires extérieurs ont obtenus 12 faux diagnostics positifs et 3 faux diagnostics négatifs (sur un total de 84 diagnostics). Les TDR ont conduit à 3 faux diagnostics positifs et 2 faux diagnostics négatifs. La GE réalisée dans notre laboratoire a donné 3 faux diagnostics positifs par rapport à la PCR, et aucun faux diagnostic négatif. Les lames lues positives dans les LAM ainsi que dans notre laboratoire ont présentés des parasitemies très différentes ; parmi les 17 lames lues communément positives, le rapport des valeurs des deux parasitemies obtenues pour 13 lames était supérieur à 3.

Avec la PCR pour référence, la sensibilité qui repose sur la détection des vrais positifs et des faux négatifs, était de 85 % pour les GE des laboratoires de référence et extérieurs, et de 90 % pour le TDR (voir tableau 3). La spécificité, dont le calcul est basé sur la détection des vrais négatifs et des faux positifs, était de 100 et 81,2 % respectivement pour les GE du laboratoire de référence et des laboratoires extérieurs, et 95,3 % pour le TDR. La valeur prédictive des vrais

Tableau 3. Sensibilité et spécificité des techniques de diagnostic testées par rapport à la PCR, Cotonou, 2008.

	% Sensibilité	% Spécificité	VPP*	VPN*
GE UR10	85,0	100	100	95,5
GE LAM	85,0	81,2	58,6	94,5
TDR	90,0	95,3	85,7	96,8

* Valeur prédictive des diagnostics positifs et valeur prédictive des diagnostics négatifs.

diagnostics positifs (VPP) était faible pour la GE des laboratoires extérieurs avec 58,6 %, comparativement à la GE du laboratoire de référence et au TDR (100 et 85,7 % respectivement). Les valeurs prédictives des vrais diagnostics négatifs étaient par contre élevées pour les 3 types de diagnostics, supérieurs ou égaux à 94,5 %.

Les données hématologiques ont été obtenues pour 40 patients. Le tableau 4 présente ces résultats en fonction du résultat de la PCR. La formule sanguine était normale chez les 4 sujets ayant une PCR positive, alors qu'on a observé une légère hyperleucocytose dans le groupe PCR négative. Les plaquettes étaient plus faibles dans le groupe PCR positive, bien que les valeurs des deux groupes étaient comprises dans l'intervalle des valeurs normales (150 à 450.10³/mm³).

Discussion

L'infection palustre à *P. falciparum* constitue un risque vital en particulier chez l'enfant et le sujet non immun. Cependant, les zones endémiques du paludisme abritent, comme beaucoup d'autres régions, de nombreuses maladies infectieuses potentiellement graves qu'il faut diagnostiquer. Notre étude avait pour but d'évaluer la valeur d'un type de test rapide du paludisme (TDR) pour le primodiagnostic du paludisme en zone urbaine au Bénin.

Dans cette étude, la sensibilité et la spécificité du TDR testé étaient bonnes vis-à-vis de la PCR (90 et 95,3 % respectivement). La qualité du diagnostic par le TDR était supérieure à celle de la GE, en particulier pour la détection de vrais positifs puisque la sensibilité de la GE des laboratoires de référence et extérieurs était de 85 %. La spécificité de la technique, ainsi que la détection de vrais négatifs (c'est-à-dire l'évitement de faux diagnostics positifs) étaient également supérieure pour le TDR vis-à-vis de la GE. Dans les LAM, la microscopie a conduit à douze faux diagnostics positifs, conduisant probablement à la prescription d'un traitement antipaludique inutile, voire plus gravement à mal orienter le diagnostic clinique, comme cela a déjà été décrit (16). Or, les infections bactériennes constituent une cause importante de décès chez les enfants vivant en Afrique (17-19) et il est essentiel que ces cas soient traités correctement. Parmi les conséquences qu'impliquent un diagnostic faussement positif de paludisme,

Tableau 4. Données hématologiques moyennes (± erreur standard) en fonction de la positivité ou non de la PCR, Cotonou, 2008.

	PCR positive (n = 4)	PCR négative (n = 36)	P*
Leucocytes (/litre)	6,6.109 (± 1,2)	10,7.109 (± 0,6)	0,05
Neutrophiles (%)	66,0 (± 3,5)	62,8 (± 3,3)	ns
Eosinophiles (%)	2,2 (± 0,5)	1,3 (± 0,1)	0,09
Basophiles (%)	0	0,1 (± 0,07)	ns
Lymphocytes (%)	30 (± 3,2)	28,2 (± 1,6)	ns
Macrocytes (%)	1,7 (± 0,5)	2,5 (± 0,2)	ns
Hémoglobine (g/dl)	13,9 (± 0,6)	12,8 (± 0,2)	ns
Hématocrite (%)	43,8 (± 2,1)	38,4 (± 1,2)	0,09
Plaquettes (/mm ³)	159,7.103 (± 44,2)	281,4.103 (± 16,1)	0,02

* ns : non significatif

la mauvaise interprétation de l'inefficacité d'un traitement antipalustre constitue un danger réel pour l'utilisation des traitements par les patients et les prescripteurs. En effet, une infection non palustre traitée à tort par un antipaludique, peut se prolonger, voire se compliquer, et laisser croire à la présence de résistance parasitaire à la molécule utilisée dans la zone. A l'inverse, l'utilisation d'un traitement avéré inefficace dans une zone, tel que la chloroquine dans le sud du Bénin (20), contre une fièvre non palustre spontanément résolutive pousse le clinicien à conclure à l'efficacité du traitement et à le réutiliser. La mauvaise interprétation de lames diagnostiques du paludisme par microscopie peut avoir diverses origines. La comparaison de microscopistes utilisant un équipement similaire et ayant reçu des formations équivalentes, ou même de microscopistes considérés comme des experts, montre des capacités très variables d'une personne à l'autre (6, 21-24). La mauvaise qualité de préparation d'une GE/FS conduit à des artefacts de coloration qui génèrent des faux diagnostics, notamment des faux positifs. Ces artefacts peuvent être dus à des bactéries, des champignons, ou à des débris cellulaires notamment (25). Par ailleurs, certains composants du sang peuvent également générer de fausses interprétations, tels que les plaquettes (6). Or, nos résultats montrent un nombre de plaquettes plus élevés dans le groupe des vrais négatifs (*i.e.* négatifs en PCR), ce qui pourrait constituer une des raisons des faux diagnostics positifs obtenus. Les diagnostics faussement négatifs reposent en général sur une faible parasitémie non détectée, soit car le nombre de champs lus n'était pas suffisant, soit à cause d'une mauvaise qualité de coloration ne permettant pas une lecture correcte (4, 7, 26, 27). D'autres erreurs portent sur l'identification de l'espèce plasmodiale, et l'estimation de la parasitémie (8).

Les taux de sensibilité des TDR spécifiques de *P. falciparum* calculés par rapport à la GE ou la PCR sont compris pour la plupart entre 95 et 100 % (8). La spécificité est en général moindre, avec environ 85 %, bien qu'elle avoisine 100 % lorsqu'elle concerne des études menées chez des voyageurs non immuns (28-31). La haute sensibilité des TDR dans un autre contexte que celui visant à diagnostiquer des sujets non immuns peut conduire à la détection de faux positifs sur un point de vue clinique, soit parce que la parasitémie détectée est infraclinique, soit parce que les antigènes détectés correspondent à des antigènes circulants issus d'une infection passée. Cependant, si le TDR positif est associé à des symptômes de paludisme simple, la probabilité d'un accès fébrile associé à une infection non palustre serait probablement assez faible. Le principal inconvénient des TDR porte sur la persistance des antigènes cibles dans le sang circulant dans les jours qui suivent un accès palustre. Une étude récente montre une persistance de 26 à 37 jours de l'antigène HRP-2 après un traitement antipalustre efficace (32), alors que la pLDH et l'aldolase disparaissent rapidement après traitement (33). Ces antigènes sont également portés par les formes gamétocytes des parasites. Par conséquent, les TDR sont avant tout destinés au primodiagnostic, mais peu adaptés au suivi du décours de l'infection. Par ailleurs, l'OMS insiste à juste titre sur la nécessité d'une bonne qualité de conservation et du respect des recommandations du fournisseur. Le coût constitue également un facteur important dans la prise de décision de l'adoption d'un type de diagnostic. A Cotonou, le coût d'une goutte épaisse est compris en 2 500 et 4 500 FCFA (3,80 à 6,90 euros) dans les laboratoires publics et privés. Les tests rapides sont disponibles auprès des fournisseurs locaux au prix de 20 500 à 25 000 FCFA les 25 tests, soit 820 à 1 000 FCFA/test (1,25 à 1,52 euros). Le coût des TDR n'est donc pas un obstacle à leur utilisation à Cotonou.

Nos résultats montrent l'intérêt des TDR dans le cas d'une moindre qualité de la microscopie, comme le recommande l'OMS

(1, 9, 10). La combinaison des deux techniques TDR et GE pourrait permettre un gain de temps et de qualité pour le primodiagnostic du paludisme. Le TDR comme primodiagnostic, puis la goutte épaisse pour l'estimation de la parasitémie, sous réserve d'une certaine qualité de la microscopie. Un effort de contrôle de qualité des laboratoires serait nécessaire au Bénin, afin de s'assurer de la qualité du diagnostic, du matériel et de la capacité des agents. Devant des résultats émanant des deux techniques GE et TDR, le clinicien doit avoir à l'esprit qu'un TDR positif peut être associé à une parasitémie très faible, voire nulle ; par contre, la négativité d'un TDR combinée à la positivité d'une GE doit soulever des interrogations et motiver une relecture approfondie de la lame. Par ailleurs, le déploiement d'un nouveau type de diagnostic dans un centre de santé nécessite au préalable son évaluation sur le plan de l'efficacité et de l'acceptation du personnel de santé, mais aussi des patients. Williams *et al.* (2008) ont montré en Tanzanie que la mise en place du diagnostic par TDR dans 6 dispensaires a engendré une diminution progressive du taux de prescriptions abusives d'antipaludiques (de 54 à 16 % en 8 semaines) malgré un test négatif. La perception du personnel de santé et des patients a également montré la nécessité d'accompagner l'implémentation par la formation et l'information. En effet, la mise en place d'un diagnostic plus sensible, en particulier pour la détection de vrais négatifs, aurait pour conséquence une diminution nette du nombre de prescriptions d'antipaludiques malgré la constance du nombre de patients fébriles. Une telle mesure qui ne serait pas accompagnée d'une information claire et détaillée auprès des patients pourrait être très mal perçue.

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR, constitue également une méthode de diagnostic du paludisme basée sur la détection de l'ADN parasitaire dans le sang du patient. Cette méthode présente une haute sensibilité et spécificité, largement plus élevées que celles de la GE/FS, en particulier pour la détection de très faibles parasitémies ou d'infections mixtes (15, 34-36). Des parasitémies inférieures à 5 parasites/ μ L de sang, probablement jusqu'à 0,004 parasites/ μ L, sont détectables en PCR (37, 38). L'inconvénient de la technique se situe au niveau du coût et du matériel nécessaire qui requiert du personnel formé à la biologie moléculaire. La très haute sensibilité peut également présenter l'inconvénient de détecter l'ADN parasitaire présent suite à une infection passée et/ou correspondre à un seuil subclinique pour les populations vivant dans des conditions de forte exposition (39). Par contre, cette technique a été adoptée par plusieurs équipes européennes pour la détection du paludisme d'importation chez les voyageurs (40, 41).

Les données hématologiques constituent un complément d'information pour le clinicien dans le cadre du diagnostic d'une maladie fébrile. Malheureusement, ces indicateurs ont une valeur pronostique faible pour l'infection palustre simple bien que la thrombopénie soit souvent associée au paludisme (42). Nos résultats vont dans ce sens malgré le faible effectif. Le paludisme grave est associé à une anémie et par conséquent à un taux d'hématocrite et d'hémoglobine diminués. Pour le paludisme simple, les indicateurs permettent plutôt d'écartier d'autres causes de fièvre, telles qu'une infection virale ou bactérienne généralement associées à une lymphopénie et neutropénie ou une hyperleucocytose.

Conclusion

Notre étude a permis de tester à Cotonou la validité d'un test rapide pour le diagnostic du paludisme. Elle a permis une première évaluation d'un type de TDR dans des conditions réelles de diagnostic de patients. Par rapport aux laboratoires d'analyses médicales où cette

étude s'est déroulée, le diagnostic par TDR était très supérieur à la microscopie, mais relativement équivalent à la GE réalisée dans le laboratoire de référence. La moindre qualité de la microscopie dans les zones hyperendémiques telles que Cotonou peut poser un problème grave de Santé Publique à ne pas négliger. Améliorer la qualité du diagnostic palustre permettrait d'améliorer sans aucun doute la prise en charge médicale de la population. La mise en place d'un système national d'assurance qualité des laboratoires publics et privés du pays permettrait certainement d'améliorer la qualité du diagnostic pour le paludisme.

Remerciements • Nos remerciements s'adressent aux patients (ou à leur parents) qui ont accepté de participer à cette étude, ainsi qu'au Pr Akogbeto qui nous a ouvert son laboratoire. Merci également à Justin Doritchamou pour son aide technique et à Michel Cot pour ses précieux conseils.

Références

- World Health Organization. World malaria report 2008. WHO/HTM/GMP/2008.1 2008
- White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW *et al.* Averting a malaria disaster. *Lancet* 1999 ; 353 : 1965-7.
- Bruce-Chwatt LJ. DNA probes for malaria diagnosis. *Lancet* 1984 ; 1 : 795.
- Dowling MA, Shute GT. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull World Health Organ* 1966 ; 34 : 249-67.
- Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ* 1988 ; 66 : 621-6.
- Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1994 ; 47 : 740-2.
- No authors listed. Malaria diagnosis: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1988 ; 66 : 575-94.
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007 ; 77 : 119-27.
- World Health Organization. Malaria Rapid Diagnosis: Making it Work. Meeting report 20-23 January 2003. *World Health Organization*, Manila 2003.
- World Health Organization. The Use of Malaria Rapid Diagnostic Tests. Accessed: 2004. 2004.
- Akogbeto M, Modiano D, Bosman A. Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin. *Parassitologia* 1992 ; 34 : 147-54.
- Wang SJ, Lengeler C, Smith TA, Vounatsou P, Akogbeto M, Tanner M. Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: epidemiology of urban malaria in Cotonou (Benin). *Malaria J* 2006 ; 5 : 45.
- Kinde-Gazard D, Oke J, Gnahoui I, Massougbodji A. Le risque de paludisme transfusionnel à Cotonou, Bénin. *Sante* 2000 ; 10 : 389-92.
- Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellem TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; 52 : 565-8.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaitong S, Brown KN. 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* 1993 ; 58 : 283-92.
- Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet* 2004 ; 364 : 1896-8.
- Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S *et al.* Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 39-47.
- Brent AJ, Ahmed I, Ndiritu M, Lewa P, Ngetsa C, Lowe B *et al.* Incidence of clinically significant bacteraemia in children who present to hospital in Kenya: community-based observational study. *Lancet* 2006 ; 367 : 482-8.
- Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O *et al.* Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ* 2004 ; 329 : 1212.
- Aubouy A, Fievet N, Bertin G, Sagbo JC, Kossou H, Kinde-Gazard D *et al.* Dramatically decreased therapeutic efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine, but not mefloquine, in southern Benin. *Trop Med Int Health* 2007 ; 12 : 886-94.
- Durrheim DN, Becker PJ, Billingham K. Diagnostic disagreement—the lessons learnt from malaria diagnosis in Mpumalanga. *S Afr Med* 1997 ; 87 : 1016.
- Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 1087-9.
- Maguire JD, Lederman ER, Barcus MJ, O'Meara WA, Jordon RG, Duong S *et al.* Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching, testing and quality assurance during an era of declining diagnostic proficiency. *Malar J* 2006 ; 5 : 92.
- Thomson S, Lohmann RC, Crawford L, Dubash R, Richardson H. External quality assessment in the examination of blood films for malarial parasite within Ontario, Canada. *Arch Pathol Lab Med* 2000 ; 124 : 57-60.
- Houwen B. Blood film preparation and staining procedures. *Clin Lab Med* 2002 ; 22 : 1-14.
- Trape JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985 ; 79 : 181-4.
- World Health Organization. Basic Malaria Microscopy. WHO ed, Geneva, 1991.
- Farcas GA, Zhong KJ, Lovegrove FE, Graham CM, Kain KC. Evaluation of the Binax NOW ICT test versus polymerase chain reaction and microscopy for the detection of malaria in returned travelers. *Am J Trop Med Hyg* 2003 ; 69 : 589-92.
- Grobusch MP, Hänscheid T, Göbels K, Slevogt H, Zoller T, Rögler G *et al.* Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of falciparum malaria in travellers returning to Berlin, Germany. *Parasitol Res* 2003 ; 89 : 354-7.
- Hernandez E, De Pina JJ, Fabre R, Garrabe E, Raphenon G, Cavallo JD. Evaluation du test OptiMAL dans le diagnostic des accès palustres d'importation. *Med Trop* 2001 ; 61 : 153-7.
- Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, Chiodini P. Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Br J Haematol* 2000 ; 109 : 891-4.
- Kyabayinze DJ, Tibenderana JK, Odong GW, Rwakimari JB, Counihan H. Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for *Plasmodium falciparum* malaria in a hyperendemic region of Uganda. *Malar J* 2008 ; 7 : 221.
- Murray CK, Gasser RA Jr, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev* 2008 ; 21 : 97-110.
- Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwuntragoon K, Wirth DF. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1992 ; 46 : 416-26.
- Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 ; 86 : 609-12.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993 ; 61 : 315-20.
- Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M *et al.* Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 3260-4.
- World Health Organization. Malaria Diagnosis. New perspectives Report of a Joint WHO/USAID Informal Consultation, 25-27 October 1999 .
- Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria ? *Trends Parasitol* 2002 ; 18 : 395-8.
- Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval JF. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Med Trop* 2005 ; 65 : 176-83.
- Fabre R, Berry A, Morassin B, Magnaval JF. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitology* 2004 ; 128 : 15-21.
- Franciscetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation* 2008 ; 15 : 81-107.