

TESTS IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES RAPIDES DE DÉTECTION DU PALUDISME, PRINCIPES ET STRATÉGIES D'UTILISATION

P. HANCE, E. GARNOTEL, J.J. DE PINA, S. VEDY, C. RAGOT, M. CHADLI, M. MORILLON

Med Trop 2005 ; 65 : 389-393

RÉSUMÉ • Le paludisme est une urgence parasitologique dont la prise en charge nécessite un diagnostic rapide, précis et sûr afin de mettre en place un traitement adapté. De nombreux tests de diagnostic rapides sont maintenant commercialisés et font appel à la détection de l'Ag HRP2, des enzymes LDH ou aldolase. L'utilisation de ces tests doit cependant être réservée à des situations particulières et réalisée par du personnel formé et expérimenté. Nous présentons ici les différents tests commercialisés, et nous avons voulu clarifier leurs limites d'utilisation.

MOTS-CLÉS • Paludisme - Test de diagnostic rapide - Antigène HRP2 - LDH.

.....
RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TESTS FOR DETECTION OF MALARIA: PRINCIPLES AND STRATEGIES FOR USE

ABSTRACT • Malaria is a parasitological emergency requiring safe quick accurate diagnosis so that appropriate therapy can be implemented. A number of rapid diagnostic tests based on detection of HRP2 Ag, enzymes, LDH or aldolase are now available. However the use of these tests is restricted to trained, experienced staff in special situations. The purpose of this report is to describe the different tests on the market and clarify the limitations for their use.

KEY WORDS • Malaria – Rapid diagnostic test - HRP2 Antigen - LDH.

Première endémie tropicale mondiale à l'origine de près de 3 millions de décès annuel, le nombre de cas de paludisme ne cesse d'augmenter. Cette augmentation concerne également la France métropolitaine où le nombre de cas estimés de paludisme importés a plus que doublé en 10 ans, à l'origine d'une vingtaine de décès. Cette fréquence accrue associée à la sévérité des infections liées à *Plasmodium falciparum* rend plus que jamais nécessaire le recours à un diagnostic rapide et fiable. Depuis Laveran, le diagnostic biologique de l'infection repose toujours sur l'utilisation des moyens microscopiques de mise en évidence des parasites à l'examen direct que sont le frottis mince, et les techniques de concentration comme la goutte épaisse ou le QBC Malaria™ test disponible depuis 1989 mais dont la société Becton-Dickinson a arrêté de fabriquer le matériel nécessaire à sa réalisation.

Ces examens microscopiques requièrent toutefois une expérience indispensable liée à leur réalisation : qualité des frottis et de la coloration exposant au risque d'artéfacts, fré-

quence des pauci-parasitismes compliquant l'examen chez les sujets sous chimioprophylaxie mal prise ou non adaptée.

La nécessité et la difficulté d'un diagnostic rapide a conduit de nombreux fabricants à l'élaboration de tests unitaires de détection antigénique reposant sur l'immunochromatographie sur bandelette dont il convient de connaître les apports et les limites afin d'optimiser leur utilisation.

LES DIFFÉRENTS TESTS : PRINCIPE

Plusieurs tests sont actuellement disponibles, et reposent sur un système de détection semblable, comparable aux « savonnets » utilisées pour les tests de détection rapide du VIH ou pour les tests de grossesse.

Il s'agit de trousse de détection prêtes à l'emploi qui permettent en quelques minutes et sans matériel particulier de mettre en évidence la présence de Plasmodium.

Les tests disponibles reposent sur différents principes (Tableau I) :

- les tests qui vont rechercher la glycoprotéine HRP2 (Histidin Rich Protein 2) spécifique de *Plasmodium falciparum* ;
- les tests qui détectent une enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) commune à toutes les espèces plasmodiales ;
- les tests qui détectent une enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) spécifique de *Plasmodium vivax* ;

• Travail du Laboratoire de Biologie Clinique, Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille.

• Correspondance : Laboratoire de Biologie Clinique, Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, BP 50, 13998 Marseille Armées • Fax : 04 91 61 71 12 •

• Courriel : biologie.alaveran@mageos.com

• Article sollicité.

Tableau I - Tests disponibles reposant sur différents principes.

| Test | Palutop | Kat-Quick Malaria | Now Malaria | Optimal-It | Palutop+4 | Core Malaria |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Distributeur | All Diag | AES | Fumouze | Diamed | All Diag | Core diagnostics |
| Nombre d'antigènes détectés | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| Antigène (s) détecté (s) | HRP2 | HRP2 | HRP2 Ag commun aux 4 espèces plasmodiales | LDH spécifique de <i>P. falciparum</i> LDH commune aux 4 espèces plasmodiales | HRP2 LDH spécifique de <i>P. vivax</i> LDH commune aux 4 espèces plasmodiales | HRP2 LDH spécifique de <i>P. vivax</i> LDH commune aux 4 espèces plasmodiales |
| Espèce (s) détectée (s) | <i>P. falciparum</i> | <i>P. falciparum</i> | <i>P. falciparum</i> + autres espèces (1) | <i>P. falciparum</i> + autres espèces (1) | <i>P. falciparum</i> + autres espèces (2) | <i>P. falciparum</i> + autres espèces (2) |

(1) le test ne différencie pas les espèces *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* entre elles
 (2) le test différencie *P. vivax*

- les tests qui détectent une enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) spécifique de *Plasmodium falciparum*.

Deux tests détectent uniquement l'antigène HRP2 : PALUTOP® (All Diag - France), KAT-QUICK MALARIA® (AES Laboratoire - France).

Un test détecte l'antigène HRP2 et une aldolase commune aux 4 espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) : NOW® Malaria (Fumouze - France).

Un test détecte une enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) commune à toutes les espèces plasmodiales et enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) spécifique de *Plasmodium falciparum* : OPTIMAL-IT® (Diamed - Suisse).

Deux tests détectent l'antigène HRP2, une enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) spécifique de *Plasmodium vivax* et une enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) commune à toutes les espèces plasmodiales : PALUTOP+4® (All Diag - France), CORE MALARIA® (Core diagnostics- UK).

Le principe des différents tests est globalement superposable et repose sur l'immunochromatographie : l'échantillon à tester (quelques microlitres de sang total obtenu à partir de sang capillaire ou de sang veineux) est déposé à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose fixée sur un support plastique ou carton. Si l'antigène recherché est présent (HRP2, LDH), il va se lier avec un anticorps marqué le plus souvent à l'or colloïdal. Afin de faciliter la lyse des globules rouges ainsi que la migration de l'échantillon sur la bandelette, quelques gouttes de solution tampon/lyse sont déposées.

Les complexes antigènes - anticorps vont alors migrer par chromatographie et l'antigène sera capturé en sandwich

par un anticorps de capture fixé sur la membrane. Cette capture va alors se traduire par l'apparition d'une ligne mauve.

L'excès de conjugué va continuer à migrer et va être immobilisé par un anticorps qui peut être anti-lapin ou anti-souris, l'accumulation de complexes colorés va là aussi entraîner l'apparition d'une ligne mauve : cette seconde ligne ou ligne contrôle valide le bon fonctionnement de la réaction.

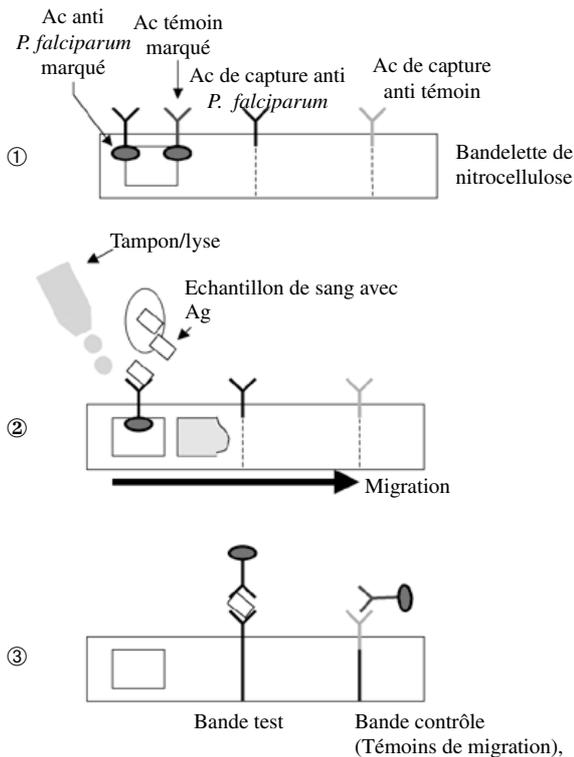
En cas de réaction négative seule la ligne contrôle doit être positive.

En règle générale en cas de positivité des tests, l'apparition des bandes est rapide : de l'ordre de 1 à 2 minutes. Pour la plupart des tests, la réaction doit être lue dans les 15 minutes. Les tests dont la bande réactive s'est positivée plusieurs heures après la réaction sont à considérer comme négatifs.

Détection de la glycoprotéine HRP2

Cette protéine soluble a été la première à être utilisée pour l'utilisation des tests de diagnostic rapide. Il s'agit de l'Histidin Rich Protein 2, glycoprotéine spécifique de *Plasmodium falciparum* exposée à la surface du globule rouge parasité et en même temps activement sécrétée par les formes asexuées et les jeunes gamétocytes au cours du cycle érythrocytaire avec un pic au moment de la rupture des schizontes (1).

Il existe une circulation prolongée d'HRP2 détectable une quinzaine de jours après la disparition des parasites du sang circulant. Cette clairance plus longue de l'HRP2 permet un diagnostic rétrospectif de la présence de *P. falciparum* mais ne permettra pas de juger de l'efficacité d'un traitement antipaludique.



Légende :

- ① Présentation de la bandelette réactive.
- ② Dépôt de l'échantillon sanguin, de la solution de tampon/lyse puis migration.
- ③ Capture du complexe conjugué-or colloïdal/antigène par l'anticorps de capture fixé et capture de l'anticorps témoin par un anticorps anti-témoin immobilisé.

Figure 1 - Principe d'un test de détection antigénique.

Détection de l'enzyme LDH

On distingue plusieurs isomères des LDH selon l'espèce plasmodiale considérée. Les LDH sont des enzymes qui sont impliquées dans le cycle du glucose, elles sont produites par tous les stades érythrocytaires des parasites, asexués et sexués (2), elles ne persistent pas dans le sang après la disparition des parasites contrairement à l'HRP2.

Principe d'un test de détection antigénique (Fig. 1) détection d'une aldolase

La fructose-1,6-diphosphatase aldolase est produite en grande quantité chez *Plasmodium sp.* On la met en évidence dans la membrane parasitaire et dans le cytoplasme du globule rouge hôte (3).

De nombreuses études ont évalué les performances des tests de diagnostic rapide pour la détection de *Plasmodium falciparum* (4,5). Sans rentrer dans l'étude des performances des différents tests, il ressort clairement des différentes évaluations que la détection des espèces autres que *P. falciparum* est globalement moins performante, phénomène plus marqué encore pour *P. ovale*.

En fonction du contexte épidémiologique, de la population étudiée la pertinence d'utilisation de tels tests « multiparamétriques » doit encore être discutée.

LIMITES DES TESTS

Nous n'entrerons pas dans cet article dans une évaluation des performances des différents tests. En revanche il est important de connaître leurs limites en fonction de leur condition d'utilisation que ce soit en pathologie d'importation, en zone d'endémicité comme test de diagnostic rapide pour un médecin isolé en dehors de ressource microscopique, en utilisation par le voyageur ou encore en zone d'endémie chez le sujet immun.

Le problème des faux négatifs

Le diagnostic de paludisme à *Plasmodium falciparum* est une urgence parasitologique. Le risque étant de méconnaître une possible infection pouvant à plus ou moins brève échéance évoluer vers un accès grave.

La sensibilité des différents tests de diagnostic rapide est pour la détection de *Plasmodium falciparum* sensiblement identique et de l'ordre de 100 parasites par µl (environ 0,002% de globules rouges infectés). Cette sensibilité diagnostique est légèrement supérieure à celle obtenue par le frottis sanguin (encore faut-il que la lecture du frottis soit réalisée par un microscopiste confirmé et avec une lecture d'au minimum 20 minutes). Or il est fréquent en pathologie d'importation ou chez le voyageur non immun en zone d'endémie sous chimioprophylaxie non ou mal adaptée de mettre en évidence des parasitemies très faibles. Dans notre expérience une parasémie inférieure à 100 parasites par µl n'est pas rare. Le diagnostic formel reposera alors le plus souvent sur l'utilisation de technique de concentration (QBC, goutte épaisse), le diagnostic d'espèce peut alors être posé par l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire.

Compte tenu de la possibilité pour les différents tests présentés de rendre un résultat faussement négatif, la plus grande prudence va s'imposer lors de l'utilisation de ces tests en première ligne diagnostique.

Concernant les espèces autres que *Plasmodium falciparum* la sensibilité de détection semble moins performante sur les différentes évaluations réalisées.

Le problème des faux positifs

Il faut d'emblée classer à part le « faux positif » lié à la persistance de la circulation d'HRP2 après disparition des parasites du sang circulant. Cette circulation prolongée a été trouvée jusqu'à 15 jours après négativité des tests microscopiques. Il ne s'agit donc pas réellement d'une fausse positivité mais ceci implique que l'on ne pourra pas utiliser ce moyen pour juger de l'efficacité thérapeutique à la différence de la LDH, enzyme liée à la parasémie dont la présence est liée à la persistance de parasites circulants.

La présence de facteur rhumatoïde a entraîné de rares réactions faussement positives. Celles-ci semblent liées à la nature IgG de l'anticorps présent (6).

STRATÉGIE D'UTILISATION DES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE

Utilisation des tests de diagnostic rapide au retour d'une zone d'endémie

En métropole, le diagnostic du paludisme d'importation doit être microscopique. Lui seul permet à la fois de répondre aux 3 questions fondamentales à se poser dans un contexte de fièvre au retour :

- Présence ou non de Plasmodium ?
- S'agit-il de *P. falciparum* ?
- S'il s'agit de *P. falciparum*, quelle est la densité parasitaire ?

Bien évidemment il n'est pas toujours facile de répondre d'autant plus qu'en pathologie d'importation chez un sujet sous chimioprophylaxie la parasitémie est le plus souvent très faible à la limite de la détection au frottis mince, ou encore les parasites peuvent être altérés compliquant leur identification.

Une technique de concentration est alors nécessaire mais n'est pas toujours disponible (QBC) ou maîtrisée (goutte épaisse). De plus ces techniques ne permettent pas toujours de répondre sur le diagnostic d'espèce.

Il faut également soulever le problème du diagnostic du paludisme par du personnel de garde pas ou insuffisamment formé à la reconnaissance des formes parasitaires. Dans ces conditions, l'utilisation d'un test de diagnostic rapide pour identification ou exclusion de l'espèce peut être d'un apport certain en complément du diagnostic microscopique.

Utilisation des tests de diagnostic rapide chez le voyageur

Plusieurs études ont évalué l'utilisation des tests de diagnostic rapide comme moyen d'autodiagnostic par le voyageur (7). Dans tous les cas les difficultés ont été nombreuses, liées à une incompréhension de la notice du fabricant, à un défaut de recueil de sang pour le prélèvement, soit à une mauvaise interprétation du test.

Signalons que certains tests commercialisés fournissent un capillaire de verre exposant alors à son bris et au risque d'exposition au sang lorsque la manipulation est confiée à un tiers.

Pour ces différentes raisons, l'utilisation de tels tests mis à disposition du voyageur ne paraît pas actuellement légitime.

La formation d'un « référent » au sein d'un groupe de voyageurs pourrait éventuellement être une solution à ces difficultés mais la mise en place est compliquée. On pourrait envisager par exemple ce type d'alternative pour les sportifs participant à des « raids aventures » en zone d'endémie.

Ces tests sont déjà utilisés par les médecins militaires en situation d'isolement mais ces derniers ont reçu une for-

mation préalable sur les limites et les performances des tests, et leur utilisation est réservée en zone d'endémie palustre aux sujets non immuns.

Utilisation des tests de diagnostic rapide en zone d'endémie

L'évaluation des tests de diagnostic rapide du paludisme en zone d'endémie a fait l'objet de multiples publications (8-10).

L'insuffisance de structures médicalisées associée au manque de microscopistes confirmés a probablement favorisé l'utilisation systématique d'un traitement présomptif anti-paludéen devant tout syndrome fébrile. Ce traitement présomptif souvent coûteux a contribué inévitablement à la sélection de souches de *P. falciparum* résistantes. Pour ces différentes raisons l'OMS (11) tend à promouvoir l'utilisation de tests de diagnostic rapide, peu chers et simples à mettre en œuvre. Leur sensibilité, certes critiquable, est le plus souvent au moins aussi bonne qu'un examen parasitologique réalisé à la périphérie du système de santé avec du matériel pas toujours adapté, des réactifs parfois périmés et un microscopiste insuffisamment formé. Bien évidemment si les structures locales disposent de matériel et de réactifs utilisés régulièrement par du personnel entraîné le diagnostic microscopique reste et doit rester le « gold standard ».

Le raisonnement qui s'applique à l'interprétation du résultat des tests de diagnostic rapide n'est pas stéréotypé. En effet il faut en zone d'endémie distinguer les zones de transmission permanente où l'on s'attend à avoir une circulation régulière et homogène de *P. falciparum* avec une population le plus souvent immune et présence de porteurs asymptomatiques, des zones de transmission saisonnière où l'immunité est plus faiblement entretenue. Si dans ce cas la positivité d'un test de diagnostic rapide réalisé dans de bonnes conditions par du personnel formé chez un patient symptomatique permet d'affirmer le diagnostic, la positivité d'un test en zone de transmission permanente ne permettra pas de s'affranchir d'un examen microscopique pour affirmer le diagnostic.

L'autre difficulté liée à l'utilisation de ces tests en zone d'endémie est la circulation prolongée d'antigène HRP2 même après un traitement efficace et qui ne doit pas faire évoquer à tort un échec thérapeutique, ou même une résistance au traitement.

Enfin, la détection de la circulation d'antigène HRP2 en l'absence de formes parasitaires microscopiquement visibles a été considéré comme un atout par certains auteurs permettant ainsi d'accroître la sensibilité de la recherche de l'infection à *P. falciparum* au cours de la grossesse (12).

De nombreux tests de diagnostic rapide du paludisme sont maintenant disponibles. Ces tests faciles à mettre en œuvre ne devraient toutefois pas être utilisés de manière indiscriminée. Leur utilisation doit s'inscrire dans des conditions bien définies et ces tests doivent être réalisés par du personnel formé et expérimenté. Si en France métropolitaine dans le cadre du diagnostic du paludisme d'importation on ne conçoit son utilisation qu'en complément du diagnostic microscopique, il peut paraître concevable d'avoir recours à

de tels tests en première ligne en zone d'endémie à condition toutefois qu'ils soient réalisés par du personnel formé connaissant les limites de leur utilisation. Bien évidemment le recours à de tels tests doit être réservé là où le diagnostic microscopique est hors de portée ce qui nous permet de rappeler que dans tous les cas la formation du personnel reste et doit rester une priorité.

RÉFÉRENCES

- 1 - ROCK E, MARSH K, SAUL AJ *et Coll* - Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein HRP1, HRP2 and HRP3 in malaria parasites of diverse origin. *Parasitology* 1987; **95** : 209-227.
- 2 - MAKLER M, PALMER CJ, AGER AL - A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; **92** : 419-433.
- 3 - CERTA U, GHERSA P, DOBELI H *et Coll* - Aldolase activity of a *Plasmodium falciparum* protein with protective property. *Science* 1988; **240** : 1036-1038.
- 4 - PAUGAMA A - Diagnostic du paludisme : apports des tests de détection antigénique sur bandelette. *La Lettre de l'hygiénologue* 2000 ; **15** : 225-230.
- 5 - MOODY A - Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002 ; **15** : 66-78.
- 6 - Grobusch M, Alpermann U, Schwenke S *et Coll* - False positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet* 1999; **353** : 297.
- 7 - BEHRENS R, WHITTY C - Self-use of rapid tests for malaria diagnosis. *Lancet* 2000 ; **355** : 237.
- 8 - GATTI S, BERNUZZI A, BISOFFI Z *et Coll* - Multicentre study, in patients with imported malaria, on the sensitivity and specificity of a dipstick test (ICT Malaria P. f./P. v.(tm)) compared with expert microscopy. *Ann Trop Med Parasitol* 2002 ; **96** : 15-18.
- 9 - JELINEK T, GROBUSH MP, SCHWENKE S *et Coll* - Sensitivity and specificity of dipstick tests for rapid diagnosis of malaria in nonimmune travelers. *J Clin Microbiol* 1999 ; **37** : 721-723.
- 10 - TRAORE I, KOITA O, DOUMBO O *et Coll* - Field studies of the Parasight-F test in malaria endemic area : cost, feasibility, sensitivity, specificity, predictive value and deletion of the HRP2 gene among wild type *Plasmodium falciparum* in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 1997 ; **57** : 272-273.
- 11 - WHO - New perspectives in malaria diagnosis. Who Health Organisation, Geneva, Switzerland 2000.
- 12 - LEKE RF, DJOKAM RR, MBU R *et Coll* - Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women : implications for diagnosing placental malaria. *J Clin Microbiol* 1999 ; **37** : 2992-2996.