

Evaluation du test de diagnostic rapide (TDR) du paludisme SDFK50 détectant PfHRP2 Evaluation of the malaria rapid diagnostic test (RDT) SDFK90 detecting PfHRP2

Gbadoé AD (1), Djadou KE (1), Dagnra A (2), Guédénon K (1), Tongon K (1), Adjéloh P (3).

- 1- Département pédiatrie, Université de Lomé (Togo).
- 2- Département de microbiologie, Université de Lomé.
- 3- Programme National de Lutte contre le Paludisme, Lomé.

Auteur correspondant : Dr Adama Gbadoé, Département de pédiatrie, Université de Lomé
adgbadoé@yahoo.fr, Tel 0022891620204

Résumé

Introduction: le paludisme demeure un problème de santé publique en Afrique, et les TDR permettent un diagnostic rapide en vue d'un traitement précoce. L'objectif de cette étude était de déterminer la performance du TDR, SDFK50[®] détectant PfHRP2 chez des enfants souffrant de paludisme, par comparaison avec la goutte épaisse (GE), test de référence.

Matériel, patients et méthodes: étude comparée de la sensibilité et de la spécificité du TDR, SDFK50 détectant PfHRP2 versus GE à partir de 457 enfants de moins de 18 ans reçus dans trois centres de santé du Togo du 1^{er} Juillet au 30 Octobre 2012 bénéficiant d'un TDR et d'une GE. Ceux qui étaient positifs au TDR/GE avaient reçu des antipaludiques.

Résultats : Les enfants de moins de 5 ans représentaient 68,3 %. Le motif le plus fréquent de consultation était la fièvre (93,6 %). La GE était positive chez 214 (46,8 %) avec 205 cas de *Plasmodium falciparum* (*Pf*), cinq cas de *Plasmodium malaria* (*Pm*) et quatre cas d'infestation mixte à *Pf* et *Pm*. La densité parasitaire moyenne était de 23178 p/μl. Le TDR était positif chez tous les 209 patients infestés par *Pf* et négatif chez les cinq patients porteurs de *Pm* seul. Le paludisme était simple dans 96,1 %. 19 résultats de GE étaient discordants après contrôle de qualité. Les antipaludiques les plus prescrits étaient la Quinine surtout comprimés (48,1 %), l'artéméther (33,2 %) ou l'artéméther-luméfantrine (26,6 %).

Conclusion : Le TDR devrait être l'examen essentiel des cas suspects de paludisme en zone d'endémicité en vue d'un diagnostic précoce pour un traitement rapide.

Mots-clefs : Paludisme, TDR, Goutte épaisse.

Summary

Introduction: Malaria remains a public health problem in Africa and Rapid Thick Drop (RTD) permitted rapid diagnosis in order to a precocity treatment. The aim of this survey was to determine the performance of the RTD, SDKF50, detecting the PfHRP2 among children suffering from malaria, by comparing it to thick blood drop (TBD), the reference test.

Material patients and methods: compared study of RTD SDFK50 detecting PfHRP2 sensibility and specificity versus TBD from 457 children under 18 years old in three Togo's healthy centers from July the 1st to 30 October 2012. Both tests were conducted: TBD and RDT. Those who were positive to both received malaria treatment.

Results: Among 457 patients included in the study aged less than 18 years old, those under 5 represent 68.3 %. The most reason for consultation was fever (93.6%). The TBD was positive for 214 (42.8), with 205 cases of *pf*, five cases of *pm* and four cases of mixed infection by *pf* and *pm*. The average parasitemic density was 23178p/μl. RDT was positive for all the 209 patients infected by *pf*. It was negative for those infected by only *pm*. 19 results of TBD were discordant after double-check. The most prescribed malaria treatments were Quinine especially tablets (48.1%), arthemeter (33.2%), arthemeter-lumefantrine (26%).

Conclusion: The RDT should be the confirmatory test of suspected malaria cases in high endemic area.

Keys-words: Malaria, RDT, thick blood drop

INTRODUCTION

Depuis les années 1950 et l'échec des stratégies d'élimination du paludisme en Afrique, l'OMS a opté pour un contrôle du paludisme et a recommandé un traitement antipaludique systématique présomptif de toute fièvre [1]. Cette attitude a conduit à une pression médicamenteuse accrue et à l'apparition de résistances du parasite à plusieurs antipaludiques. La solution à ce problème a été la recommandation depuis le début des années 2000 de l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) après une confirmation systématique des cas de paludisme simple par une goutte épaisse (GE) ou un test de diagnostic rapide (TDR) chez les patients de plus de 5 ans. Cette recommandation a été élargie ensuite aux enfants de moins de 5 ans. Les TDR sont réservés aux formations sanitaires qui ne disposent pas de laboratoires pour réaliser la GE.

Aujourd'hui au Togo, l'incidence des cas réels de paludisme n'est pas connue, car malgré les recommandations de l'OMS, plusieurs cas de paludisme sont encore traités de manière présomptive sans confirmation biologique [1]. En outre, même en cas de négativité des tests, plusieurs patients étaient encore traités par des antipaludiques ce qui n'est pas conforme aux recommandations. L'une des raisons expliquant cette attitude est le doute sur la performance des TDR utilisés. Alors qu'un regain d'intérêt est actuellement porté sur l'élimination du paludisme dans le monde, l'impact réel des différentes stratégies de lutte antipaludique n'est pas connu au Togo. Le défi majeur reste donc un changement d'attitude des prescripteurs, afin que les vrais cas de paludisme soient recensés. L'avènement de nouveaux TDR plus performants peut apporter une solution à cette attitude. L'un de ces TDR a été choisi par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) en 2011 pour confirmer les cas de paludisme dans les formations sanitaires, en remplacement du Paracheck® qui détecte aussi HRP2 de *Plasmodium falciparum* (Pf), jugé moins performant par l'OMS [2]. Il s'agit du TDR détectant HRP2 de *Plasmodium falciparum* (Pf) des Laboratoires Standard Diagnostic Inc) (SDFK50) qui donne des résultats même pour les parasitemies très

faibles (< 100 p/µl), une lecture rapide du résultat. Cette étude a été initiée pour évaluer sa performance (sensibilité et spécificité) en comparaison avec la GE, test de référence.

MATERIEL, PATIENTS ET METHODES

L'étude a eu lieu dans trois sites. Deux sites à Lomé, le service de pédiatrie de l'Hôpital de Bè et la Clinique des Moineaux ; et un site pédiatrique rural, le Centre Médico-Social (CMS) des Sœurs de la Providence de Kouvé situé à 70 km de Lomé ont servi de cadre pour l'étude.

Les patients des deux sexes, d'âge inférieur à 18 ans, reçus en consultation pour une suspicion de paludisme, ont été inclus de façon prospective entre le 1^{er} juillet et le 30 octobre 2012.

Pour l'évaluation de SDFK50, il a été prévu d'inclure consécutivement 200 GE positives et 200 GE négatives pour les trois sites d'étude. L'évaluation du devenir des patients a concerné tous les patients ayant un TDR/GE négatifs, qui n'ont pas reçu d'antipaludique. Les patients ont été inclus après avis favorable du comité de bioéthique et de la recherche scientifique puis après un consentement éclairé des parents ou tuteurs.

Après un examen clinique, ils étaient adressés au laboratoire pour un prélèvement de sang au bout du doigt pour le TDR et la GE. La lecture de la GE et du TDR a été effectuée par deux techniciens différents en aveugle. Les résultats étaient ensuite envoyés au prescripteur. En cas de GE et/ou TDR positifs un antipaludique était prescrit. En cas de négativité le patient n'a pas reçu de traitement antipaludique il était traité au cas par cas en fonction de l'étiologie retrouvée. Un contrôle de qualité consistant en une relecture en aveugle des lames était effectué en différé au Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) à Lomé. Les relecteurs de GE pour le contrôle de qualité étaient des biologistes du PNLP, formateurs nationaux, habitués aux tâches de contrôle national de qualité des lames. La sensibilité du test SDFK50 est définie par la capacité à détecter correctement des échantillons de sang contenant des antigènes de *Pf*.

Elle se calcule en divisant le nombre de vrais positifs (résultats de GE positives après le contrôle de qualité) par le nombre total de GE positives (résultat positif au TDR). Et la spécificité est définie par la capacité à détecter correctement des échantillons de sang ne contenant pas des antigènes de *pf*. Elle se calcule en divisant le nombre de vrais négatifs (....) par le nombre total de GE négatives.

L'évolution clinique des patients a été évaluée à partir des données cliniques recueillies aux rendez-vous des 3^e et 9^e jours. Le 9^{ème} jour est choisi en raison de ceux qui étaient négatifs pour être sûr qu'ils étaient libérés guéris mais d'autres visites sont nécessaires entre J 3 et J9 en fonction de l'évolution clinique. Les prescripteurs habituels des trois sites ont participé à l'étude, il s'agissait de quatre pédiatres, quatre médecins généralistes et six assistants médicaux (Corps de santé ayant une formation médicale de niveau Master). Les réalisateurs de GE et de TDR étaient des ingénieurs de travaux biologiques opérant dans les laboratoires des trois sites.

Le test utilisé était le SD BIOLINE Malaria Ag Pf HRP2, 05FK50 (SDFK50). Il s'agissait d'un test qualitatif rapide, à deux bandes, pour la détection de l'antigène HRP2 de *Pf* (Standard Diagnostic, Inc., Kyonggi Font, Corée). Deux lots de tests ont été utilisés : le lot N° 82159 du 11/1/12 et le lot N° 82206 du 15/6/12. Le test était réalisé exactement comme l'indiquait la notice du fabricant. Il était conservé durant la période d'étude entre 23 et 35 °C. Le matériel de prélèvement était un gobelet inversé permettant de prélever 5 µl de sang. La lecture était réalisée entre 15 et 30 mn. Le test était négatif lorsque la bande contrôle était visible et positif lorsqu'apparaissaient deux bandes Si aucune bande n'apparaissait, le test n'était pas valable.

La GE et le frottis mince étaient réalisés sur la même lame pour chaque enfant inclus dans l'étude. Les lames étaient asséchées après fixation dans le méthanol puis colorées avec du Giemsa à 10%. Elles ont été examinées au microscope à immersion d'huile. La densité parasitaire a été estimée sur la GE. Un minimum de 200 champs consécutifs était examiné avant de considérer le comme étant négatif. Les parasites étaient comptés pour 200 globules blancs.

La densité parasitaire était estimée par rapport à 8000 GB/µl de sang. Les données ont été enregistrées dans le logiciel Excel. La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives ont été calculées avec un intervalle de confiance de 95 %. Les patients positifs pour la GE ou le TDR ont été traités par artéméther-luméfantine pour ceux souffrant du paludisme simple et la quinine ou artéméther pour les cas de paludisme grave.

RESULTATS

Caractéristiques générales

Au total, 457 enfants suspects de paludisme et admis de façon consécutive dans les trois sites ont été inclus dans cette étude. Ils étaient répartis comme suit : 213 à Kouvé, 196 à Bè, et 48 à la Clinique des Moineaux. Une prédominance des enfants âgés de moins de 5ans (68,3 %) était notée, et la sex-ratio était de 1,16. Le motif de consultation le plus fréquent était la fièvre (93,6 %) suivie des vomissements (25,6 %), des céphalées (8,75 %) et de l'anorexie (5,2 %). Les « diagnostics » les plus souvent posés avant le traitement étaient un paludisme (46,8 %), un syndrome infectieux non documenté (28,6 %), et une infection broncho-pulmonaire (14 %) (tableau 1). Le paludisme était simple dans la majorité des cas (96,1 %). Dix-huit patients inclus étaient des cas de paludisme grave : anémie sévère, (n= 13 cas), convulsions (n= 5 cas).

Tableau 1. « Diagnostics » retenus avant traitement

	Effectif	%
Paludisme		
- Isolé	200	43,7
- Associé à autre infection	14	3,1
Syndrome infectieux non documenté	131	28,7
Infections broncho-pulmonaires	64	14
Gastro-entérites fébriles	26	5,7
Infections ORL (otite, angine, rhino-pharyngite)	20	4,4
Pyodermite	2	0,4
Total	457	100

Aspects biologiques**Résultats définitifs après contrôle de qualité des gouttes épaisses**

La GE était positive chez 214 patients (46,8 %) : le site rural (173 patients sur 213 soit 81,2 %) et les deux sites urbains (35 patients sur 196 à l'Hôpital de Bè soit 17,8 % ; six patients sur 48 à la Clinique des Moineaux soit 12,5 %). Il y avait 205 cas de *Pf*, cinq cas de *Pm*, et quatre cas d'infestation mixte à *Pf* et *Pm*.

Tous les neuf cas de *Pm* (4,2 %) étaient diagnostiqués dans le site rural de Kouvé. La densité parasitaire moyenne était de 23 178 p/μl avec des extrêmes de 19 et 493 333 p/μl. Neuf patients (4,2 %) avaient une densité parasitaire de plus de 250 000 p/μl, tandis que 82 patients (38,3 %) avaient une parasitémie inférieure à 200 p/μl, dont 11 étaient inférieures à 100 p/μl (tableau 2).

Tableau 2. Répartition des patients selon la parasitémie (p/μl)

	Effectif
< 100	11
[100-200[71
[200-500[09
[500-5000[33
[5000-50 000[28
[50 000-250 000[53
≥250 000	9
Total	214

Résultats des TDR

Le TDR était positif chez tous les 209 patients infestés par *Pf*. Il était négatif chez les cinq patients porteurs de *Pm* seul.

Sensibilité et spécificité du test SD BIOLINE Malaria Ag *Pf* HRP2

Si on exclut les 5 cas de GE positive à *Pm* seul, pour lesquels le TDR était naturellement négatif, la concordance était parfaite entre les deux types d'examen parasitologique. Soit une sensibilité et une spécificité à 100 % (valeur prédictive positive et négative à 100 %).

Evolution

L'évolution a été favorable pour tous. Les enfants avec GE ou TDR négatifs avaient été pris en charge en fonction de l'étiologie de la fièvre au cas par cas. Aucun d'eux n'avait reçu d'antipaludiques. Ils avaient tous une évolution favorable au bout des 9 jours de suivi.

DISCUSSION

Sur la base de l'évaluation de la performance des TDR du paludisme par l'OMS, SDFK50 détectant *pf*HRP2 fait partie des meilleurs tests actuellement disponibles eu égard à sa sensibilité, sa spécificité et sa stabilité thermique [2-4]. Sa sensibilité à 200 parasites/μl était de 97,5 % en 2009 [2].

Des variations significatives de sensibilité peuvent se voir d'une étude à l'autre, en fonction du degré de parasitémie des patients, et pour le même test, d'un lot à l'autre [4]. Il n'en était pas le cas dans cette étude. Cette évaluation, en révélant une spécificité et une sensibilité de 100 % de SDFK50, même pour les parasitémies très faibles (< 100 p/μl), confirme la bonne performance de ce TDR chez les patients togolais. Toutefois, la performance de SDFK50 ne doit pas occulter les inconvénients des TDR.

Les rares faux positifs sont en rapport avec une lecture trop tardive, la présence de facteur rhumatoïde [5] ou encore le remplacement du tampon de lyse par une autre solution [6]. Quant aux faux négatifs ils étaient l'apanage des faibles parasitémies (< 100/μl). Mais si l'enfant présentant cette faible parasitémie est symptomatique, son traitement est

nécessaire. Les TDR qui ne détectent que *pfHRP2*, bien qu'ayant souvent une forte sensibilité, présentent en particulier certains inconvénients : la persistance de la positivité du test après la fin du traitement (HRP2 peut persister jusqu'à deux semaines dans le sang); la mutation du gène HRP2 pouvant induire des faux négatifs jusqu'à 41 % au Pérou selon Maltha et al [7], et l'effet prozone. Celui-ci se définit comme la négativité ou la faible positivité du test dans les hyperparasitémies, par saturation de la réaction [8, 9, 10]. L'effet prozone est présent dans 10 % environ des cas d'hyperparasitémie $\geq 250\,000$ parasites/ μ l, surtout sous forme d'une faible positivité du test, les vrais faux négatifs étant exceptionnels [9-11]. Pour pallier à ces inconvénients, d'autres TDR ont été développés, notamment ceux associant la détection de HRP2 et de pLDH (lactate déshydrogénase de plasmodium), autre enzyme sécrétée par les formes asexuées et les gamétocytes de *Pf*. Le pLDH disparaît rapidement dans le sang (il peut donc permettre le suivi de l'efficacité de l'antipaludique), et n'est pas affecté par l'effet prozone [12].

Dans cette étude, l'avantage de SDFK50 sur la GE s'explique par le fait qu'il dépend moins de la qualité du technicien de laboratoire. En effet, plusieurs erreurs (corrigées par le contrôle de qualité) ont été commises sur les trois sites dans la réalisation et la lecture de la GE, bien que celle-ci ait été réalisée par des ingénieurs de travaux biologiques censés avoir reçu une bonne formation. La GE est donc un examen qui requiert une grande expertise du technicien. En examen de routine, sa sensibilité peut diminuer de beaucoup en Afrique subsaharienne [13].

Toutefois, quoique très performant aujourd'hui, SDFK50 ne peut pas remplacer la GE en raison de son impossibilité de quantifier la parasitémie et d'identifier les autres espèces plasmodiales. Pour pallier à cette insuffisance, des TDR détectant à la fois *Pf* et les 3 autres espèces plasmodiales ont été mis sur le marché. Mais la sensibilité et la spécificité pour la détection de *Pm*, *ovale* et *vivax* sont nettement plus faibles que pour *Pf* [4]. La possibilité au Togo, d'une infestation par des espèces

de plasmodiums autres que *Pf* (comme ce fut le cas dans notre série), dénote de la place encore privilégiée aujourd'hui de la GE. Au Togo, les recommandations de la politique nationale de lutte contre le paludisme ne sont pas bien suivies dans les formations sanitaires. Le taux de confirmation du paludisme n'est que de 51,1 % tandis que plusieurs cas, bien que négatifs, sont traités par des antipaludiques [1]. La politique médicamenteuse nationale n'est pas non plus suivie dans plusieurs centres, la preuve en est la quinine ou l'artémether injectables utilisés en première intention dans notre série chez de nombreux malades, à la place de la combinaison artémether-luméfranine qui est destinée au paludisme simple.

Les résultats de cette étude devraient à priori avoir un impact positif sur le plan national. En effet, les avantages de disposer d'un TDR d'une telle performance sont multiples : meilleur diagnostic des cas permettant l'économie d'un traitement antipalustre et donc une meilleure gestion des CTA ; traitement plus rapide et plus adéquat des cas négatifs ; meilleure évaluation de l'incidence réelle des cas et de l'impact réel des nombreuses interventions de lutte contre le paludisme. Par ailleurs, la bonne évolution de tous les cas négatifs, sans recours aux antipaludiques, devrait amener les praticiens encore réticents, au changement de comportement.

CONCLUSION

Les résultats ont montré que SDFK50 est un test performant (sensibilité et spécificité à 100 %). Le TDR du paludisme devrait être l'examen de première intention de tous les cas suspects de paludisme en zone d'hyperendémicité comme le Togo où le paludisme a représenté en 2012, 49% des cas de maladies reçus en consultation externe dans les formations sanitaires [1]. Il permet de prendre rapidement une décision thérapeutique adéquate, surtout en consultation externe, aussi bien dans les formations sanitaires périphériques que dans les grands hôpitaux en raison de la rapidité du diagnostic (15 mn). La morbidité du paludisme chez l'enfant va nécessairement chuter ; les travaux en cours seraient édifiants dans les années à venir. L'association dans le

même test de la détection de HRP2 et de pLDH devrait augmenter la sensibilité des TDR et pallier aux insuffisances des tests détectant le seul antigène HRP2. La GE reste un examen nécessaire qui permet un suivi des enfants hospitalisés pour paludisme grave (détermination de la densité parasitaire, suivi de l'efficacité thérapeutique) et combler au besoin les insuffisances des TDR telles que le diagnostic d'espèces,

REFERENCES

- 1- Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Revue de performance du programme. Rapport, Février 2012.
- 2- World Health Organization: Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 2 (2009). Geneva: WHO; 2010. reports_brochures/malaria-diagnostic-test-report-round2.html.
- 3-World Health Organization: Malaria Rapid Diagnostic Test Performance; Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 1 (2008). Geneva: WHO; 2009.
- 4-World Health Organization. Rapid diagnosis test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 4, WHO library, 2012.
- 5-Grobusch M, Alpermann U, Schwenke S et al. False positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet* 1999; 353: 297.
- 6-Maslin J, Coton T, Martinaud C. Test rapide de diagnostic du paludisme : une curieuse discordance. *Médecine et armées* 2010 ; 38, 2 : 137-41.
- 7-Maltha J, Gamboa B, Bendezue J. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Diagnosis in the Peruvian Amazon: Impact of pfhpr2 gene deletions and Cross-Reactions. *Plos One* 2012; 7: e43094.
- 8-Risch L, Bader M, Huber AR. False negative quick malaria test. *Schweiz Med Wochenschr* 1999, 129:1002.
- 9-Gillet P, Mori M, Van Esbroek M, et al. Assessment of prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. *Malar J* 2009; 8:271.
- 10-Gillet P, Scheirlinck A, Stokx J et al. Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed? *Malar J* 2011;10: 166.
- 11-Luchavez J, Baker J, Alcantara S. Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malar J* 2011; 10: 286.
- 12-Heutmekers M, Gillet P, Cnops L et al. Evaluation of the malaria rapid diagnostic test SDFK90: detection of both PfHRP2 and Pf-pLDH. *Malar J* 2012;11:359.
- 13-Nankabirwa J, Zurovac D, Njogu JN et al. Malaria misdiagnosis in Uganda—implications for policy change. *Malar J* 2009; 8:66.