



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

ARGUMENTAIRE

Évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à *Plasmodium*

Décembre 2016

Cet argumentaire est téléchargeable sur
www.has-sante.fr

Haute Autorité de santé

Service communication - information

5, avenue du Stade de France – F 93218 Saint-Denis La Plaine Cedex

Tél. : +33 (0)1 55 93 70 00 – Fax : +33 (0)1 55 93 74 00

Sommaire

Abréviations et acronymes	4
Résumé	5
Introduction	6
1. Contexte	8
1.1 Source d'information.....	8
1.2 Le paludisme	8
1.3 Prévention et traitement du paludisme.....	11
1.4 Présentation des différentes techniques diagnostiques	15
1.5 Paramètres biologiques non spécifiques	22
1.6 Aspects réglementaires	22
1.7 Conditions actuelles de la prise en charge par l'assurance maladie.....	23
1.8 Contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale	24
2. Méthode d'évaluation	26
2.1 Champ et méthode d'évaluation.....	26
2.2 Recherche documentaire, sélection et analyse	26
2.3 Consultation des parties prenantes.....	29
3. Résultats de l'évaluation	30
3.1 Analyse de la littérature	30
3.2 Point de vue des parties prenantes sur les données concernant le diagnostic biologique du paludisme et sur l'analyse de la HAS.....	36
4. Discussion et conclusions	43
Annexe 1. Recherche documentaire.....	45
Annexe 2. Liste des tableaux, graphiques, organigrammes, schémas, etc.	49
Annexe 3. Grille d'évaluation AGREE II-GRS*	50
Annexe 4. Tableau 11. Analyse sur critères méthodologiques des publications (recommandations de bonne pratique) portant sur les tests diagnostiques d'infection par un <i>Plasmodium</i>	51
Annexe 5. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel d'anesthésie-réanimation (CNPAR)	58
Annexe 6. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Collège français de médecine d'urgence (CFMU)	63
Annexe 7. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA)	68
Annexe 8. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de la Société de pathologie exotique (SPE).....	74
Annexe 9. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de la Société de médecine des voyages (SMV)	81
Annexe 10. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel - Fédération française d'infectiologie (CNP-FFI).....	88
Annexe 11. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de la Société française de biologie médicale (SFBC)	89
Annexe 12. Compte-rendu de l'audition du Centre National de Référence du paludisme (CNR paludisme)	92
Références	99
Fiche descriptive	103

Abréviations et acronymes

- Ac** anticorps
- Ag** antigène
- AGREE** . Appraisal of Guidelines for Research and Evaluation
- ANSM** ... Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
- CDC** *Centers for Disease Control and Prevention*
- cf.**..... confer
- CNAMTS** Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés
- CNP** Conseils nationaux professionnels
- CNR** Centre national de référence
- CSP**..... code de la santé publique
- ECDC**.... European Centre for Disease Prevention and Control / Centre européen de prévention et de contrôle des maladies
- EIA**..... *enzyme immunoassay (méthode immunoenzymatique)*,
- ELISA** ... *enzyme-linked immunosorbent assay*
- FIND**..... *Foundation for Innovative New diagnostics*
- HAS** Haute Autorité de santé
- IFI** immunofluorescence
- Ig**..... immunoglobulines
- IgG** immunoglobuline de type G
- InVS** Institut de veille sanitaire (intégré le 27 avril 2016 dans l'Agence nationale de santé publique)
- IV**..... intraveineux
- JO** Journal officiel de la République française
- LAMP**.... *Loop-mediated isothermal amplification*
- LBM** laboratoire de biologie médicale
- Malaria**.. terme issu de l'italien en usage international pour le paludisme (antimalarique = antipaludéen)
- NABM** ... nomenclature des actes de biologie médicale
- Min**..... minute
- OMS**..... Organisation mondiale de la santé / **WHO** *World Health Organisation*
- PCR** *polymerase chaine reaction* ; amplification génique par polymérisation en chaîne
- PP** partie prenante
- RBP** Recommandations de bonne pratique
- RCP** Résumé des caractéristiques du produit
- RIHN** Référentiel des actes innovants hors nomenclature
- SPILF**.... Société de pathologie infectieuse de langue française
- TDR**..... tests de diagnostic rapide

Résumé

Objectif(s)

L'objectif de ce travail est d'évaluer les examens de biologie médicale permettant d'établir le diagnostic biologique du paludisme, dont les agents pathogènes sont des parasites hématozoaires du genre *Plasmodium*. Il cible plus particulièrement la recherche de protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG) et la recherche d'anticorps spécifiques de *Plasmodium*, mais également les techniques microscopiques d'identification. Ce travail est mené, en vue d'une inscription ou d'une modification d'inscription à la liste des actes de biologie médicale, pris en charge par le système national d'assurance maladie en France, à la demande de ce système.

Méthode

La méthode retenue est une procédure d'évaluation qui comprend :

- la réalisation d'une analyse critique de la littérature synthétique sur le paludisme d'importation en zone non endémique (recommandations de bonne pratique, revues systématiques et rapports d'évaluation technologique) identifiée par une recherche documentaire systématique, puis une sélection sur des critères explicites, dont certains de qualité méthodologique ;
- le recueil de la position argumentée des organismes professionnels de santé concernés (infectiologie, biologie médicale, médecine d'urgence, anesthésie/réanimation, médecine des armées) et du Centre national de référence (CNR) du paludisme.

Ces éléments sont synthétisés dans un argumentaire, soumis au collège de la HAS pour validation.

Conclusion

Les données ainsi analysées (vingt recommandations de bonne pratique, position de sept organismes professionnels et du CNR paludisme) permettent de conclure que :

- les techniques d'examen direct du sang au microscope (frottis sanguin mince, goutte épaisse) sont les techniques de référence pour établir le diagnostic de paludisme, en préciser la ou les espèce(s) et quantifier la parasitémie ;
- la recherche des protéines plasmodiales dans le sang par technique d'immunochromatographie (ICG) est indiquée :
 - dans le diagnostic biologique d'urgence du paludisme, en complément *a minima* d'un frottis sanguin mince (l'ICG ne remplace pas l'examen par microscope) ;
- cette recherche de protéines plasmodiales n'est pas indiquée dans le suivi thérapeutique ;
- la recherche d'anticorps anti-*Plasmodium*, plus rare, est indiquée dans le diagnostic rétrospectif après traitement présomptif ou celui des formes chroniques de paludisme ; les techniques à utiliser sont les techniques immuno-enzymatiques (ELISA) et l'immunofluorescence, l'électrosynérèse ne doit plus être utilisée.

Préconisations

Au vu des caractéristiques du paludisme d'importation en France et la plus grande dangerosité d'un paludisme à *P. falciparum*, les tests d'ICG, s'ils sont utilisés, doivent permettre de détecter le parasite en discriminant en premier lieu une infection à *P. falciparum* des autres espèces grâce au choix des antigènes plasmodiaux ciblés, comprenant obligatoirement la protéine HRP-2 spécifique de *P. falciparum* et au moins un autre Ag commun aux cinq espèces. Afin de faciliter le dialogue clinico-biologique, l'interprétation d'un bilan diagnostique doit être fournie en détaillant les résultats obtenus par chaque technique et par ICG, pour chaque Ag recherché. Ce bilan doit être disponible dans les 4 heures qui suivent le prélèvement. En cas de résultats négatifs dans un contexte clinique fortement évocateur, les examens sanguins directs doivent être répétés sur 24 à 48 heures.

Introduction

Dans le cadre de l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS) a sollicité en septembre 2015 l'avis de la HAS sur la révision de la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) concernant le diagnostic du paludisme, dont les responsables sont plusieurs espèces de parasites sanguicoles du genre *Plasmodium*.

Comme décrit dans la feuille de route (1), l'objectif de ce travail est d'évaluer les diverses méthodes biologiques proposées pour ce diagnostic, en réalisant une analyse de cohérence entre, d'une part, la demande, et d'autre part, la littérature synthétique disponible et la position des professionnels de santé concernés par cette pathologie.

Le diagnostic du paludisme est une urgence médicale chez des personnes ayant séjourné en zone d'endémie de cette maladie, car une infection par *Plasmodium falciparum* peut provoquer un neuropaludisme susceptible d'entraîner la mort du patient en quelques heures.

La demande faite à la HAS n'est que peu argumentée et ne détaille pas les éléments exposés. Elle porte sur trois examens et propose les modifications suivantes dans la nomenclature :

- la recherche directe et l'identification des parasites par examen au microscope :
 - les techniques de recherche directe de *Plasmodium* dans le sang sont le frottis mince et la goutte épaisse, réalisés classiquement après prélèvement veineux sur tube EDTA. Elles sont anciennes et déjà inscrites à la NABM (code de l'acte : 1125)¹. Le demandeur les considère comme l'examen de première intention et à utiliser de façon complémentaire en établissant une séquence avec en premier lieu la réalisation d'un frottis mince. Il s'agit d'un examen habituel d'hématologie. Il permet d'identifier la/les espèce(s) de *Plasmodium* et d'évaluer quantitativement la parasitémie. Le demandeur préconise en cas de résultat négatif du frottis la réalisation d'une goutte épaisse, technique de concentration, plus longue et délicate, qui permet d'augmenter la quantité de sang examinée par un facteur habituellement estimé de 20 à 30, améliorant la sensibilité analytique de l'examen (seuil de 10 à 20 parasites / μ l)² ;
- la principale modification de la demande concerne l'inscription à la NABM de « *recherche de protéines plasmodiales dans le sang par ICG* » qui correspond à la recherche d'antigène(s) protéiques des *Plasmodium* par une technique d'immunochromatographie (ICG).
Le demandeur indique qu'il s'agit d'une technique complémentaire à la recherche de parasites au microscope dans deux cas :
 - lorsqu'un doute diagnostique subsiste après frottis et goutte épaisse négatifs, dans un contexte clinique évocateur ;
 - lorsque l'examen direct est positif à une espèce de *Plasmodium* autre que *falciparum*.

La demande précise que la première situation est issue d'une recommandation de sociétés savantes françaises de 2007 (2) présentant une stratégie diagnostique qui fait appel à un test antigénique en seconde intention, lorsque les deux techniques de recherche directe au microscope sont négatives. Aucune précision n'est fournie pour la seconde situation.

- En ce qui concerne la sérologie (recherche d'anticorps (Ac) spécifique de *Plasmodium* dans le sang), le demandeur rappelle qu'elle est déjà inscrite à la NABM, avec deux libellés et deux valeurs de cotation : sérodiagnostic par électrosynérèse (ELS) (code 4353) et par immunofluorescence (IFI) (code 4354). Il précise que l'électrosynérèse est obsolète (elle a été cotée

¹ Le demandeur propose d'englober cette recherche directe de *Plasmodium* dans le sang, dans un libellé générique «Recherche et identification de parasites sanguicoles ou tissulaires», commun à toutes les recherches directes de parasites sanguicoles et tissulaires, qui existent actuellement dans plusieurs libellés.

² À noter que cette séquence (goutte épaisse à réaliser uniquement en cas de frottis mince négatif) est présente dans l'argumentaire de la demande, mais pas dans la proposition de l'actualisation des libellés de la NABM.

23 fois contre 1 668 actes pour l'IFI en 2013). Le demandeur souhaite ne maintenir qu'un seul libellé en supprimant la mention de la technique de réalisation, sans doute pour permettre la prise en compte d'éventuelles nouvelles techniques (toutefois, la nouvelle formulation proposée permettra le maintien de la technique obsolète). Classiquement, la recherche d'anticorps est présentée comme utile, si l'on suspecte un paludisme viscéral évolutif chez un malade (adulte ou enfant) originaire de zones d'endémie ou pour confirmer rétrospectivement un diagnostic chez un patient traité pour un paludisme sans données biologiques. C'est cette indication qui est d'ores et déjà inscrite sur la NABM et le demandeur ne propose pas de la modifier ;

- À noter que la demande ne comporte pas l'introduction d'un libellé pour une technique d'amplification génique (de type PCR ou LAMP).

1. Contexte

1.1 Source d'information

Ce chapitre a été rédigé à partir d'une revue non systématique de la littérature ayant inclus des revues générales, des articles originaux, des documents de préconisation et des bilans épidémiologiques réalisés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) et, pour les chiffres en France, sur les données de l'Institut de veille sanitaire (InVS), puis de l'Agence nationale de santé publique. Les données de l'Assurance maladie (dont NABM) sur les actes considérés sont également fournies.

1.2 Le paludisme

1.2.1 Données parasitaires et modes de contamination

La transmission du paludisme se fait par la piqûre de moustique femelle hématophage du genre *Anopheles*, dont une trentaine d'espèces (sur les 400 répertoriées) sont des vecteurs très importants du paludisme, qui sévit dans des zones assez étendues de la planète, où les conditions climatiques sont favorables toute l'année ou de façon saisonnière à la vie des espèces de moustiques vecteurs.

Il existe cinq espèces de parasites hématozoaires³ du genre *Plasmodium* pathogènes pour l'homme : les deux plus fréquentes sont *Plasmodium falciparum* et *P. vivax* et les deux espèces moins communes *P. malariae* et *P. ovale*. Depuis 2004, des cas de paludisme dus à une cinquième espèce, *P. knowlesi*, jusqu'alors parasite du singe macaque, ont été signalés dans les zones forestières d'Asie du Sud-Est (3). *P. falciparum* sévit dans toutes les zones tropicales d'Afrique, d'Amérique Latine et d'Asie, *P. vivax* en Afrique de l'Est et plus largement en Asie et en Amérique et *P. ovale* en Afrique de l'Ouest. *P. malariae* est présent dans de nombreuses régions.

Chez l'homme, après pénétration par le capillaire sanguin piqué, les parasites (sporozoïtes) effectuent un passage dans les hépatocytes avec multiplication et libération dans un délai d'une semaine de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ces formes parasitaires vont pénétrer dans les globules rouges où elles effectuent des cycles de reproduction asexuée (trophozoïtes, puis schizontes, qui se divisent en plusieurs mérozoïtes), ce qui provoque l'éclatement des globules rouges infectés et l'accroissement de la parasitémie, car chaque mérozoïte va infecter une nouvelle hématie. La longueur du cycle de maturation intraérythrocytaire propre à chaque espèce explique la périodicité particulière des poussées de fièvre, du moins dans les accès classiques (24, 48 ou 72 heures). Les cycles se poursuivent dans le sang, certains mérozoïtes évoluent avec différenciation sexuée et production de gamétocytes non pathogènes, mais caractéristiques. Pour les espèces *P. malariae* et *P. ovale*, des formes parasitaires latentes (hypnozoïtes) vont persister dans le foie, engendrant des crises itératives lors de libérations ultérieures dans le sang. Lorsqu'un moustique femelle se nourrit du sang d'une personne contaminée, le gamétocyte va entamer dans son organisme un nouveau cycle sexué qui conduira à la production de sporozoïtes transmissibles par nouvelle piqûre à un être humain (3). Ainsi l'interaction homme-moustique existe pour ce parasite dans les deux sens.

La transmission non vectorielle est possible : par voies transplacentaire et sanguine (partage de seringue, coupure ou exposition accidentelle au sang de professionnels), transfusion sanguine et greffe d'organe ou de tissu. Elle reste exceptionnelle en France ; des mesures préventives (exclusion de 4 mois au retour d'un voyage en zone impaludée et jusqu'à 3 ans après la dernière crise) et un contrôle des dons du sang et des greffons sont réalisés chez les donneurs à risque par recherche d'anticorps.

³ Hématozoaire : parasite constitué d'une seule cellule (protozoaire eucaryote) vivant dans le sang d'un vertébré.

► Manifestations cliniques du paludisme

L'OMS considère que le paludisme est une des grandes maladies, pour lesquelles il n'existe pas de tableau clinique spécifique, mais elle a établi 10 critères cliniques de gravité (4). Les manifestations cliniques peuvent survenir au bout de 7 jours après la piqûre infectante, plus généralement entre 10 et 15 jours, en lien avec le taux d'infestation et d'hémolyse. Ils sont très variés, avec des pics fébriles, pouvant être associés à des maux de tête, une grande fatigue, des douleurs musculaires, des vomissements, des diarrhées, de la toux. Une hyperparasitémie $\geq 4\%$ d'hématies infectées ($\sim 200\,000$ parasites/ μL) chez un enfant ou adulte non immunisé représente un critère de gravité, nécessitant une prise en charge en soins intensifs (4, 5).

Dans l'infection à *P. falciparum*, si les globules rouges infectés obstruent les petits vaisseaux sanguins irriguant le cerveau⁴ (tropisme spécifique à cette espèce), un neuropaludisme identifié par une prostration, une confusion, des convulsions voire un coma compromet alors le pronostic vital. Cette forme d'installation plus ou moins brutale atteint les personnes non immunisées (jeune enfant en zone d'endémie, voyageur, expatrié) (6).

P. vivax et *P. ovale* provoquent des accès palustres d'évolution généralement bénigne, mais des rechutes peuvent survenir les années suivantes du fait des formes dormantes intra-hépatocytaires. Des accès palustres graves à *P. vivax* (7-9) et *P. knowlesi* (7) sont aussi possibles.

La fièvre élevée présente une régularité différente selon l'espèce contaminante, liée à la longueur du cycle de reproduction de chaque type de parasite, les pics fébriles correspondant à la libération de la forme « mérozoïte » dans la circulation sanguine par éclatement des globules rouges infectés, après multiplication asexuée des schizontes (10, 11). Toutefois, cette régularité n'est pas toujours observée. Au niveau de la rate et accessoirement du foie, l'hyperplasie des cellules macrophagiques assurant la phagocytose des hématies parasitées conduit à l'hépatosplénomégalie clinique, palpable assez rapidement.

Les personnes les plus à risque de développer une forme grave de paludisme sont les jeunes enfants jusqu'à 5 ans, les femmes enceintes, les personnes âgées, immunodéprimées, les personnes splénectomisées (12), les adultes ne vivant pas en zone d'endémie et/ou ayant voyagé en Afrique de l'Est (13).

Chez la femme enceinte, le paludisme présente une forte morbidité (morbidité maternelle / avortement, retard de croissance, anémie élevée, faible poids de naissance et mort-nés), probablement liée à une immunité diminuée (14), d'autant plus grave pour la mère et le fœtus que *P. falciparum* est responsable de la maladie (9). Une des caractéristiques pour *P. falciparum* est que les parasites sont séquestrés dans le placenta, échappant aux systèmes de défense habituels. En zones endémiques, l'intensité des symptômes diminue chez une femme contaminée avec le nombre de grossesses (15). Le risque de paludisme congénital du nouveau-né par une mère contaminée existe (de 8 à 33 % en zone non endémique), la contamination se faisant soit *in utero*, soit au moment de l'accouchement.

D'autres formes cliniques de l'infection par des *Plasmodium* existent en dehors de l'accès palustre fébrile. Ainsi, le paludisme viscéral évolutif (PVE), qui est le signe d'infections palustres répétées, se traduit par une anémie, une cytopénie, une fièvre modérée et intermittente, une asthénie, ainsi qu'une splénomégalie constante et modérée, mais une parasitémie difficilement détectable. Il affecte les enfants de moins de cinq ans non encore prémunis ou les expatriés dans des zones où existent des souches chloroquino-résistantes. *P. falciparum* est le plus souvent la cause du PVE, mais toutes les autres espèces peuvent provoquer cette forme pathologique.

En synthèse, certains groupes humains courent un risque plus grand de souffrir d'une forme grave de paludisme, outre les femmes enceintes et les nouveau-nés, les jeunes enfants, les immunodé-

⁴ Les hématies parasitées sont agrégées ou adhèrent par cytoadhérence aux cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux provoquant une hypoxie tissulaire.

primés (porteurs du VIH) et les voyageurs ou migrants non immunisés, ce risque étant principal et immédiat lors d'une infection à *P. falciparum* (4)

► Données épidémiologiques mondiales

L'OMS estime qu'environ 3,2 milliards de personnes - soit près de la moitié de la population mondiale - sont exposés au risque de contracter le paludisme : la morbidité et surtout la mortalité de ce fléau, en particulier chez les enfants, ont engendré une mobilisation des Nations Unies dans les années 2000, avec la création d'un Fonds Mondial (15). Ses effets sont réels : entre 2000 et 2015, l'incidence du paludisme a baissé de 37 % à l'échelle mondiale (mais encore 214 millions de cas en 2015), tandis que le taux de mortalité a reculé de 60 % toutes tranches d'âge confondues (passant de 1,5 millions à 450 000 morts par an), et de 65 % chez les enfants de moins de 5 ans. L'Afrique subsaharienne (15 pays) supporte en grande partie la charge mondiale du paludisme, avec, en 2015, 88 % des cas de paludisme et 90 % des décès recensés pour cette maladie parasitaire.

L'OMS définit par zones géographiques le niveau de risque de transmission, en catégorisant des zones de forte transmission (> 1 cas déclaré / 1000 habitants/an) et de faible transmission (0-1 cas déclaré / 1000 habitants/an), avec les notions de transmission saisonnière pour certains types de climats, localisée ou sporadique (16).

Le paludisme ne conduit pas à une immunité naturelle, mais en zone d'endémie constante, dans laquelle le climat (chaleur et humidité) permet une reproduction continue des moustiques, les hommes acquièrent une immunité partielle (prémunition), les protégeant d'un risque d'accès grave et ils peuvent être des porteurs sains, réservoir de parasites pour une possible transmission *via* les piqûres de moustiques (10). Mais la pérennité de la protection se perd en l'absence de contact avec l'agent pathogène, exposant à nouveau ces personnes au risque d'accès palustre (3).

► Données épidémiologiques françaises

La France métropolitaine est le pays européen avec le plus grand nombre de cas de paludisme d'importation (devant le Royaume-Uni), selon les données de surveillance collectées par le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) (17) (dernier rapport 2014 et dernières données disponibles 2012). Alors que les chiffres mondiaux sont en baisse, une nette augmentation des cas de paludisme importés en France métropolitaine est observée (+35 % entre 2012 et 2015), avec accroissement du nombre et de la proportion des formes graves, mais sans augmentation concomitante de la létalité. Les données de 2015 sur le nombre de personnes entrant en France après un voyage en zone d'endémie palustre était de 5,443 millions en 2015, en augmentation de 5,0 % par rapport à l'année antérieure⁵. L'augmentation est générale dans les pays européens.

Depuis 1985, un réseau sentinelle de laboratoires de parasitologie métropolitains a été mis en place, sous l'égide du Centre national de référence (CNR) du Paludisme, avec déclaration des cas importés au CNR. À partir de la représentativité de ce réseau, estimée à 50-55 %, il est possible par extrapolation d'estimer le nombre de cas annuels de paludisme survenus sur le territoire métropolitain.

Pour l'année 2015, un total de 2 504 cas de paludisme et de **11 décès** a été déclaré au CNR Paludisme pour la métropole (représentativité du réseau 2014 : 52 %) (18). Le nombre de cas de paludisme d'importation a été estimé à **4 750 cas** pour l'ensemble de la France métropolitaine, soit **9,4 % d'augmentation par rapport à 2014, ce qui confirme l'augmentation déjà enregistrée les années précédentes**. Deux cas sont des paludismes présumés autochtones, aéroportuaires. Les cas sont dus en majorité à l'espèce *P. falciparum* (87 %). Aucun accès à *P. knowlesi* n'a été diagnostiqué, contrairement à 2014, où un cas a été identifié. En métropole, les cas de paludisme sont observés de façon majoritaire chez des personnes de retour de pays où la transmission du

⁵ Données fournies par le Dr Marc Thellier, GH Pitié-Salpêtrière, CNR Paludisme, le 23 septembre 2016.

paludisme est active et qui n'ont pas suivi les recommandations de prévention ou mal utilisé la chimioprophylaxie, principalement chez des sujets d'origine africaine (79 %), résidant en France ou arrivant d'Afrique. Les chiffres recensent aussi les cas observés chez les militaires déployés dans les pays d'endémie (135 cas en 2015). Les pays de contamination sont majoritairement en Afrique subsaharienne (93 %), en premier lieu la Côte d'Ivoire (n=629, - 3,0 % par rapport à 2014), puis le Burkina-Faso, le Cameroun, le Mali, le Sénégal, la Guinée et le Congo. Les cas surviennent à 79,0 % chez des personnes d'origine africaine. **12 % des cas étaient graves (292 cas) et l'espèce *falciparum* était incriminée dans 98 % de ces cas.** Les chiffres de décès sont stables par rapport à ceux des années précédentes (létaleté de 0,44 % sur l'ensemble des cas et de 3,8 % sur les formes graves) et situés entre 10 et 20 / an depuis plusieurs années.

Deux départements d'outre-mer, Mayotte et la Guyane, sont situés en zone d'endémo-épidémie, avec les modalités suivantes :

- Mayotte : risque faible de transmission toute l'année et infection par *P. falciparum* présentant 100 % de multirésistance aux antipaludiques ;
- Guyane : transmission toute l'année dans 9 communes de l'intérieur du territoire bordant le Brésil et le Surinam, présence de *P. falciparum* et *P. vivax* avec multirésistance aux antipaludiques.

En Guyane, en 2015, 434 cas ont été déclarés au laboratoire associé au CNR paludisme, Antilles-Guyane (Institut Pasteur de la Guyane), chiffres proches de ceux de 2014 avec une moyenne d'âge des personnes touchées de 26 ans (19). Environ 16 % étaient des paludismes importés des pays voisins (Suriname, Brésil) et 51 personnes ont été hospitalisées, dont 41,2 % étaient dus à *P. falciparum*, 3,9 % des infections mixtes (*P. vivax* et *P. falciparum*), et les autres patients étaient porteurs de *P. vivax*. Les dernières informations disponibles indiquent la survenue de 44 accès palustres entre les semaines S 15 à S 28 de 2016, dont 77 % étaient dues à *P. vivax*⁶. À Mayotte, les derniers chiffres publiés (InVS) datant de 2012 indiquent (pour une population d'environ 212 000 habitants, en constante augmentation) 74 cas dont 25 cas autochtones, 47 cas importés et 2 indéterminés, soit une baisse sensible au cours des dernières années. *P. falciparum* y est retrouvé dans plus de 90 % des cas, tout comme à la Réunion, géographiquement proche (20), où 47 cas de paludisme d'importation ont été déclarés la même année (avec Madagascar et l'archipel des Comores, Mayotte compris, comme zones de contamination majoritaire). À la Martinique et à la Guadeloupe, moins de 10 cas de paludisme d'importation sont déclarés par an.

Le paludisme est depuis longtemps une question non négligeable pour l'armée française (21), avec 158 cas en 2014 et 135 en 2015, car certaines positions ou interventions plus ponctuelles se situent en zones d'endémie. Les structures sanitaires des services des armées disposent d'un plan de contrôle stratégique et contribuent à la recherche sur la maladie et à la prise en charge des malades (21, 22). En zones rurales, la rapidité du diagnostic et les performances des diverses méthodes sont des enjeux pour le personnel militaire. Certaines publications des services des armées pointent la difficulté d'établir le diagnostic de paludisme pour les espèces moins communes : ainsi, 6 infestations par *P. ovale* en Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire) n'ont pu être diagnostiqués par la recherche d'antigènes sériques et ont nécessité au moins 3 prélèvements et lectures au microscope (frottis et goutte épaisse) successifs avant d'identifier la maladie caractérisée par un échec de prophylaxie par doxycycline et parasitémie très faible, inférieure à 0,5 % (23).

1.3 Prévention et traitement du paludisme

L'OMS reçoit régulièrement des informations des instances gouvernementales et établit une carte des zones où sévit le paludisme, en précisant, le cas échéant, l'émergence de résistance aux divers traitements. Elle exhorte chaque état à établir un plan national de lutte contre le paludisme,

⁶ <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Antilles-Guyane/2016/Situation-epidemiologique-du-paludisme-en-Guyane>. Bulletin avril-juillet-2016. Dernière consultation du site le 9 novembre 2016.

qui se base sur les particularismes de son territoire et sur les éléments pharmaco-épidémiologiques actualisés.

1.3.1 Prophylaxie du paludisme

L'OMS considère que le paludisme est une maladie évitable (15). Les succès du programme mondial de lutte contre le paludisme sont principalement dus à la lutte antivectorielle contre les moustiques, par utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (pyréthriinoïdes) et pulvérisations d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations.

Il n'existe actuellement aucun vaccin homologué contre le paludisme et seule la prévention contre les piqûres de moustique et les traitements pharmacologiques sont possibles.

La chimioprophylaxie du paludisme lors de séjour en zones d'endémie doit se faire en respectant les recommandations les plus récentes (cf. Tableau 1). Elle vise essentiellement à prévenir les risques d'infection à *P. falciparum*, en Afrique et dans les zones forestières d'Amérique et d'Asie. En France, les recommandations sont établies chaque année par le Haut conseil de la santé publique (HCSP), en adéquation avec les recommandations internationales (OMS) qui découlent de la surveillance des zones infestées et d'émergence de nouvelles zones de chimiorésistance aux antipaludiques. Les évolutions géographiques sont prises en compte pour adapter les schémas prophylactiques des recommandations (16).

La résistance de *P. falciparum* pose le plus de problèmes. Des résistances aux différentes molécules utilisées sont apparues dans diverses régions du monde, anciennes pour la chloroquine (Afrique, océan Indien, Amérique du Sud), à la méfloquine (Asie, Afrique, bassin amazonien), plus récente, mais avérée aux dérivés de l'artémisinine, notamment en Asie du Sud-Est (Thaïlande, Cambodge, Laos, Vietnam, Birmanie). L'émergence de multirésistances est redoutée, incitant l'OMS à planifier la disparition du paludisme à *P. falciparum* dans le bassin du Mékong d'ici 2030. Des thérapies combinées ont pour objectif de diminuer l'émergence des résistances à une molécule (4).

Des cas de résistance de *P. vivax* à la chloroquine ont été signalés dans quelques pays d'Asie et d'Océanie.

Tableau 1. Recommandations françaises de chimioprophylaxie du paludisme 2016 chez l'adulte et l'enfant (BEH du 31 mai 2016, Paludisme tableau 6)

Médicaments utilisables pour la chimioprophylaxie du paludisme chez l'enfant et l'adulte

Molécule	Présentations	Ponologies enfant et adulte	Durée, indications, précautions d'emploi, contre-indications
Atovaquone-Proguanil	Cp* pédiatrique (cpP) à 62,5 mg/25 mg Cp adulte (cpA) à 250 mg/100 mg	Enfant : 5-<7 kg : ½ cpP/j (hors AMM) 7-<11 kg : ¾ cpP/j (hors AMM) 11-<21 kg : 1 cpP/j 21-<31 kg : 2 cpP/j 31-<40 kg : 3 cpP/j >40 kg : 1cpA/j Adulte : 1 cpA/j	À prendre au cours d'un repas ou avec une boisson lactée Début du traitement : 24 ou 48 h avant le jour d'arrivée À prendre pendant le séjour et 1 semaine après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme Peut être envisagé, si nécessaire, chez la femme enceinte
Chloroquine	Sirop à 25 mg= 5ml Cp sécable à 100mg	Enfant : 1,7 mg/kg/j <8,5 kg : 12,5 mg/j ≥8,5-16 kg : 25 mg/j ≥16-33 kg : 50 mg/j ≥33-45 kg : 75 mg/j >45 kg : 1 cp/j Adulte : 1 cp/j	À prendre pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme Peut être administré à la femme enceinte Attention aux intoxications accidentelles
Chloroquine-Proguanil	Cp à 100 mg/200 mg	Enfant : à partir de 15 ans et >50 kg : 1 cp/j Adulte : 1 cp/j	À prendre en fin de repas, au moins 24 h avant le départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme Réservé aux adultes et adolescents de 15 ans et plus et pesant au moins 50 kg. Peut être administré à la femme enceinte
Doxycycline	Cp à 50 mg Cp à 100 mg Cp sécable à 100 mg	Enfant : ≥8 ans et < 40 kg : 50 mg/j ≥ 8 ans et ≥ 40 kg : 100 mg/j Adulte : 100 mg/j	À prendre pendant le repas du soir au moins 1 heure avant le coucher, la veille du départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme. Contre-indications : femme enceinte, enfant âgé de moins de 8 ans, Effets indésirables : notamment photosensibilisation
Méfloquine	Cp sécable à 250 mg	Enfant : 5 mg/kg/semaine 15-19 kg : ¼ cp/sem >19-30 kg : ½ cp/sem >30-45 kg : ¾ cp/sem >45 kg : 1 cp/sem Adulte : 1 cp/sem	À commencer 10 jours avant le départ jusqu'à 3 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme Contre-indications : notamment, convulsions, troubles neuro-psychiques Déconseillé en cas de pratique de la plongée Peut être administré à la femme enceinte
Proguanil	Cp sécable à 100 mg	Enfant âgé de 1 à 12 ans : 3 mg/kg/j 9-16,5 kg : ½ cp/jr 17-33 kg : 1cp/jr 33,5-45 kg : 1cp ½ /jr Adulte et enfant âgé de plus de 12 ans : 200 mg/j	Uniquement en association avec la chloroquine À prendre pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme Peut être administré à la femme enceinte

*Cp : comprimé. Avant l'âge de 6 ans pour des raisons pratiques, il peut être nécessaire d'écraser les comprimés.

© Santé publique France. Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2016. BEH 2016;Hors-série (18).

Le respect du schéma prophylactique, propre à chaque médicament, doit être souligné par le prescripteur lors de la consultation médicale, afin de limiter les échecs et l'émergence de résistance. La prévention (anti-vectorielle et chimioprophylactique) est très importante chez la femme enceinte, car l'état gravidique est un facteur de risque d'aggravation de la maladie.

La prophylaxie même bien suivie, y compris après le retour d'un voyage en zone impaludée, peut conduire à un échec : aussi devant toute fièvre chez une personne revenant d'une zone à risque, une suspicion de paludisme doit être la règle et un dépistage demandé systématiquement (24).

De surcroît, 3 % des infections par *P. falciparum* étant détectés plus de deux mois après le retour, cette recherche en urgence doit être faite au-delà de ce délai de deux mois, habituellement considéré comme limite de risque de manifestation palustre à *P. falciparum* (18).

1.3.2 Traitement curatif du paludisme

La rapidité du diagnostic – comprenant la distinction entre espèces – est indispensable aux cliniciens pour une prise en charge précoce adaptée (initiation et mise en place des mesures curatives en deux heures, possiblement en soins intensifs/réanimation si cas grave). L'examen clinique recherchera donc, en plus de la fièvre, les signes d'un des dix critères de gravité, tels que définis par l'OMS (13).

Le traitement par artésunate (ou acide artésunique, dérivé de l'artémisinine) intraveineux est recommandé par le HCSP depuis 2013, comme traitement de première intention des formes graves du paludisme chez l'enfant et l'adulte (cf. Tableau 2) (6). Il a été prescrit dans 77 % des cas en 2015 (18). Ce traitement est disponible dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative, délivrée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). La prise en charge en secteur de réanimation est indiquée face à tout signe de gravité tant chez l'adulte que l'enfant (5). Les accès graves à *P. vivax* et à *P. knowlesi* sont traités comme les accès graves à *P. falciparum*.

Les formes non compliquées sont traitées par voie orale, en absence de signes digestifs à type de nausée ou vomissements, et en ambulatoire, en absence de signe de gravité et selon les critères sociaux habituels de la prise en charge ambulatoire.

Si la crise initiale d'une infection à *P. vivax* ou *P. ovale* est habituellement moins dangereuse, un traitement par primaquine⁷, prescrit dès le premier accès et accessible par ATU nominative, aura pour objectif de prévenir la chronicité et les rechutes susceptibles de survenir dans les deux ou trois années qui suivent. Ce traitement est aussi préconisé par le HCSP depuis 2008, pour détruire les gamétocytes afin d'éviter la transmission par les moustiques autochtones en France méditerranéenne et dans les départements d'outre-mer où *P. vivax* est endémique, surtout la Guyane (25).

Tableau 2. Molécules utilisées dans le traitement curatif du paludisme en France

Antimalariques	DCI	Nom commercial en France
Schizonticides érythrocytaire	Chloroquine (amino-4-quinoléines)	NIVAQUINE
	Atoqualone - proguanil	MALARONE
	Artemeter - lumefantine	RIAMET
	quinine	QUININE SURQUINA QUINIMAX
	Artenimol (dihydroartémisinine) - pipéraquine	EURARTESIM
	Proguanil	PALUDRINE
	Mefloquine	LARIAM
	Halofantine	HALFAN
	Dérives de l'artémisinine : Artésunate Artéméter	MALACEF PALUTHER

⁷ Avant utilisation de primaquine chez un patient, la recherche d'un déficit en G-6-DP (glucose-6-phosphate déshydrogénase) est préconisée (OMS, HCSP).

Antimalariques	DCI	Nom commercial en France
	Sulfadoxine- pyriméthamine	FANSIDAR
Schizonticides intra hépatiques et gamétocytocides	Primaquine	PRIMAQUINE

Selon l'OMS, la mise à disposition d'associations thérapeutiques d'antipaludéens de modes d'action différents, comportant un dérivé de l'artémisinine, est essentielle et constitue une réponse reconnue au besoin de faire face au risque de résistance de *P. falciparum* aux monothérapies et à la progression de la multirésistance aux antipaludéens classiques.

En France, les seules associations comportant un dérivé de l'artémisinine et disposant d'une AMM sont les associations artéméther + luméfántrine (RIAMET) et dihydroartémisinine + pipéraquline (EURARTESIM). Ainsi, en Guyane et à Mayotte, l'utilisation en routine de ces deux spécialités constitue une alternative satisfaisante à l'association atovaquone-proguanil (MALARONE). En France métropolitaine, où les souches multirésistantes sont plus rares et où le risque de sélection ne se pose pas en l'absence de transmission, ces bithérapies constituent une alternative utile à l'association atovaquone-proguanil (MALARONE) et à la méfloquine (LARIAM), compte tenu notamment d'une mauvaise tolérance parfois observée avec ces traitements (avis de la Commission de la transparence 19 février 2014⁸).

1.3.3 Suivi parasitologique du traitement

Les recommandations françaises préconisent le suivi d'un traitement antipaludique par frottis sanguin / goutte épaisse à J3, J7 et J28 de l'initiation du traitement, voire pour les formes graves, répétés tous les jours jusqu'à visualisation d'une négativation (26). Des échecs au traitement curatif à l'atovaquone-proguanil et à l'artéméther-luméfántrine ont en effet incité les autorités à recommander des contrôles post-thérapeutiques tardifs (J28) pour ces médicaments à longue demi-vie d'élimination. Pour les formes graves, l'OMS préconise un suivi sanguin très rapproché (toutes les 12 heures pendant les 2/3 premiers jours du traitement), pour s'assurer de son efficacité (4).

1.4 Présentation des différentes techniques diagnostiques

L'OMS souligne que chaque pays doit s'assurer, par sa politique de lutte contre le paludisme, de la formation des professionnels de santé et de procédures indexées dans un système d'assurance qualité (4). Ainsi, dans un pays non endémique (comme la France métropolitaine), dans lequel le diagnostic peut être erroné par méconnaissance de la maladie, il convient pour l'OMS de disposer d'une technique qui possède pour l'espèce la plus dangereuse, *P. falciparum* :

- une très bonne sensibilité ;
- une très bonne valeur prédictive négative,

pour permettre chez un sujet gravement malade suspect d'accès palustre, d'établir rapidement et avec certitude un diagnostic différentiel écartant ou confirmant le paludisme et de débiter le traitement adéquat.

Le HCSP a rappelé dans un avis rendu le 27 mars 2015 que « le diagnostic et le traitement du paludisme sont des urgences absolues » (16). La conférence de consensus de 2007 a stipulé que le diagnostic du paludisme doit être réalisable 24h/24 et les résultats transmis en moins de deux heures (2). La nécessaire interaction entre cliniciens et biologistes dans la recherche du paludisme pour un patient est soulignée (27).

⁸Commission de la transparence. Avis 19 février 2014. EURARTESIM 320 mg/40 mg, comprimé pelliculé. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-13375_EURARTESIM_PIC_INS_Avis2_CT13375.pdf.

1.4.1 Recherche directe des parasites dans le sang et les tissus

Les formes pathogènes de plasmodies⁹ les plus fréquentes chez l'homme sont intra-érythrocytaires, visibles dans les hématies du sang périphérique. Le diagnostic est réalisé à partir d'un prélèvement sanguin veineux, soit au pli du coude, soit, en cas d'impossibilité (enfant, ...), par piqûre digitale à la lancette. Le sang est recueilli sur tube avec anticoagulant EDTA (pas d'héparine). Une conservation jusqu'à 24 h à température réfrigérée est possible, permettant la réalisation d'un examen à distance. Les examens de recherche directe au microscope nécessitent au préalable une opération de coloration appropriée.

Les prélèvements tissulaires pour recherche directe de *Plasmodium* sont rares, pratiqués essentiellement sur le tissu placentaire après la délivrance chez les parturientes (9, 28), mais cette situation est exceptionnelle en France, selon le CNR (Cf. compte-rendu de l'audition du CNR en Annexe 12). Cette recherche peut être complétée par un examen microscopique du sang placentaire ou du cordon ombilical (28).

Deux techniques existent pour rechercher les *Plasmodium* au microscope :

- **le frottis sanguin (FS) (mince)**, obtenu par étalement du sang sur une lame propre, fixation puis coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou une autre technique de coloration plus rapide. Il s'agit d'un examen habituel d'hématologie. Un étalement soigneux du sang permet d'obtenir une seule couche cellulaire (frottis mince). La qualité du colorant et la réalisation de cette étape sont importantes pour permettre l'identification de l'espèce plasmodiale. Chacune et à chaque stade de son évolution (trophozoïte, schizonte, gamétocyte) présente à l'intérieur des hématies des particularités de formes (formes annulaires des trophozoïtes, rosaces de schizontes) et de colorations (chromatine, cytoplasme), avec des déformations (granulations / pigmentations) particulières et identifiables (11). Le seuil de détection est classiquement présenté entre 100 et 300 parasites / μl et la quantification de la parasitémie est effectuée lors de cet examen par le microscopiste¹⁰, s'il y est entraîné. La découverte d'une espèce ne fait pas stopper la lecture, car une atteinte par plusieurs espèces est possible suivant la région de contamination (11) La lecture avec huile à immersion est effectuée pendant au minimum 20 minutes sur 100 à 200 champs et poursuivie jusqu'à 30 minutes avant de rendre un résultat négatif selon les préconisations. La prise d'antipaludique(s) modifie la morphologie parasitaire responsable d'erreur d'espèce, préjudiciable lorsque le parasite est *P. falciparum* car les mesures thérapeutiques prises peuvent s'avérer insuffisantes ;
- **la goutte épaisse (GE)** : il s'agit d'une technique manuelle de concentration sans étalement, qui utilise un volume de sang deux fois plus élevé que le frottis (0,25 μl si 300 champs sont lus) et permet d'augmenter la quantité de sang examinée par un facteur de 20 à 30, améliorant la sensibilité analytique de l'examen (classiquement, seuil de 10 à 20 parasites / μl), ce qui est important si la parasitémie est faible. Cette technique est plus longue et délicate que le frottis : il faut d'abord défibriner le sang obtenu par prélèvement capillaire en y appliquant des mouvements circulaires pendant 2 minutes, sécher, déshémoglobiner la lame puis colorer et sécher (11). L'aspect des parasites - après la préparation qui détruit les hématies et la coloration au Giemsa - ne permet pas d'identifier facilement l'espèce. Le comptage de parasites (schizonte, trophozoïte, gamétocytes) se fait en prenant comme référence les cellules leucocytaires (c.-à-d. 100, 200 ou 500 leucocytes comptés) et avec comme unité le nombre de parasites / μl (29). Il existe une technique de fixation-hémolyse-coloration rapide qui a été recommandée par le consensus français de 2007 (2). Cent champs microscopiques sont observés au minimum avant de faire un constat de négativité. La présence de pigment dans les neutrophiles et les monocytes en cas de présence de *P. falciparum* serait un signe de mauvais pronostic (27).
Les fluctuations importantes dans les densités parasitaires selon le cycle du parasite entraînent pareillement des numérations rapprochées (6 à 12 ou 24 heures) en cas de négativité, dans un contexte clinique très évocateur sans autre étiologie identifiée (30).

⁹ Plasmodie, subst. fém. Parasite du genre *Plasmodium* cité dans <http://www.cnrtl.fr/definition/plasmodie>.

¹⁰ Calculée classiquement en pourcentage d'hématies parasitées / hématies saines comptées par champ.

La littérature relate que l'examen direct de recherche de parasites dans le sang exige de la disponibilité et une compétence spécifique d'un personnel entraîné à cette lecture (31). Cette problématique est encore plus aiguë pour des actes qui ne sont pas réalisés fréquemment hors des zones d'endémie du paludisme, par exemple en France métropolitaine (2, 22, 30).

La présence de formes asexuées de *Plasmodium* à l'examen direct du sang au microscope après coloration signe un diagnostic formel de paludisme.

- Il existe par ailleurs une autre technique, commercialisée, **de coloration à l'acridine orange** de l'ADN des plasmodies dite QBC (*Quantitative Buffy Coat*). Après centrifugation avec concentration par gradient de densité, la lecture se fait au microscope avec éclairage halogène et aurait une bonne sensibilité avec de l'entraînement (27). Mais selon les auteurs, cette technique, bien que rapide et facile à réaliser, est onéreuse du fait d'un coût élevé de l'appareillage et des réactifs, la rendant peu attractive, en particulier depuis l'avènement des tests de détection des antigènes plasmodiaux (30). De plus, elle ne permet pas le diagnostic d'espèce (3).

1.4.2 La recherche de protéines plasmodiales par une technique d'immunochromatographie (ICG)

La recherche de protéines plasmodiales se fait par une technique d'immunochromatographie (ICG) apparue dans les années 1990 (30). Cette recherche d'antigènes (Ag) plasmodiaux protéiques par ICG se fait par des tests de laboratoire en kits, dénommés souvent dans la littérature « test de diagnostic rapide (TDR) ».

Leur présentation est variable : bandelettes, cassettes ou carte. La lecture se fait grâce à l'apparition de bandes colorées avec témoins. Des anticorps monoclonaux d'origine animale spécifiques de(s) protéine(s) plasmodiale(s) sont fixés sur un support (bande) en nitrocellulose, et d'autres, couplés à un révélateur colorimétrique (or colloïdal), sont contenus dans le tampon de migration (32). Lorsque la goutte de sang est déposée, les hématies sont éclatées par le tampon libérant les Ag plasmodiaux. En présence de l'Ag correspondant dans le sang (cas de paludisme), des liaisons en sandwich s'effectuent entre ces trois éléments, d'abord de l'Ag contenu dans le sang infecté avec les Ac marqués du tampon, puis l'immun complexe ainsi formé est capturé par les Ac fixés sur la nitrocellulose, faisant apparaître une bande colorée. La bande témoin contenant un Ac anti-Ac animal (33) sert à capter les Ac marqués à l'or libres permettant de valider ou d'invalider le test et les résultats obtenus (34).

Ces kits ne requièrent pas d'expérience particulière pour leur réalisation, le résultat est obtenu en moins de 30 minutes.

Plusieurs protéines plasmodiales ont été identifiées comme Ag pouvant être détectés par ICG (cf. Tableau 3) :

Tableau 3. Type d'antigènes de *Plasmodium* utilisables dans la technique ICG (TDR)

Antigène(s) détecté(s)	Sous types	Espèce(s) cibles identifiées(s)
HRP-2	-	<i>P. falciparum</i>
LDH	Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>
	Pv pLDH	<i>P. vivax</i>
	Pan pLDH	toutes
Aldolase	Pv aldolase	<i>P. vivax</i>
	Pan aldolase	toutes

Il existe sur le marché des tests d'ICG spécifiques d'une espèce, en particulier *P. falciparum*, et d'autres génériques du genre *Plasmodium* (cf. Tableau 4) :

- la plupart mettent en évidence l'HRP-2 (*Histidin Rich Protein-2*), glycoprotéine de la membrane et du cytoplasme des formes asexuées (trophozoïte) et du gamétocyte jeune de *P. falciparum* (30) ; la protéine HRP-2 est spécifique de cette espèce ;
- d'autres tests permettent la mise en évidence de la pLDH (*Plasmodium lactate déshydrogénase*), enzyme glycolytique commune aux cinq espèces plasmodiales pathogènes chez l'homme et présente sur toutes les formes sexuées et asexuées de ces parasites. À noter également que certains de ces tests ciblent une forme moléculaire de pLDH spécifique de *P. falciparum* ou de *P. vivax* (35) ;
- certains tests combinent la détection par l'HRP-2 et la pLDH ;
- d'autres recherchent l'aldolase (pan-aldolase), une autre enzyme glycolytique, commune à toutes les espèces de *Plasmodium* (12). À noter également qu'une aldolase spécifique de *P. vivax* (iso-enzyme) est aussi utilisée par quelques fabricants.

Les tests d'ICG doivent être utilisés en stricte conformité avec le mode d'emploi du fabricant afin d'en préserver les performances diagnostiques (33, 36). L'OMS conseille de tester les lots avant utilisation et a relevé divers facteurs pouvant en altérer les performances (35). L'administration américaine, la FDA (*Food and Drug Administration*) n'a autorisé qu'un seul test¹¹, recherchant deux Ag : HRP-2 de *P. falciparum* et une pan aldolase (Binax NOW Malaria, Alere) - pour une utilisation en laboratoire de biologie médicale (avis de juillet 2007). Les *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recommandent toutefois de compléter ce diagnostic par une recherche microscopique pour confirmer l'espèce et estimer la parasitémie (14).

Par leur facilité d'utilisation, ces tests de recherche d'Ag plasmodiaux ont retenu l'attention de l'OMS dans son objectif d'un accès universel au diagnostic du paludisme et d'éradication de cette maladie. Alors que les causes de fièvre sont multiples, tant chez l'enfant que chez l'adulte (37), un des écueils en absence de diagnostic biologique est l'utilisation des antipaludiques sans discernement, engendrant des chimiorésistances. À ce titre, l'OMS a utilisé ces tests dans une campagne « à grande échelle » de diagnostic du paludisme avec en corollaire une utilisation appropriée des antipaludiques (38). Ainsi, au Sénégal, la mise à disposition des tests TDR du paludisme a permis de passer de 4 à 86 % de cas de fièvre testés et d'éviter 500 000 prescriptions inappropriées d'antipaludiques en 2009.

Il existe, selon l'OMS, plus de 200 tests antigéniques (TDR) sur le marché au niveau mondial en 2016 (39). Elle a lancé en 2008 un programme de pré-qualification (contrôle de qualité) sur la base du volontariat des fabricants et sa dernière publication sur les résultats de la 6^e évaluation date de mars 2016 ; une 7^e évaluation est en cours. Pour valider chaque test, en termes de performances, l'OMS a considéré les seuils d'acceptabilité cumulés suivants (39) :

- 75 % de détection pour des concentrations de 200 parasites / μL pour *P. falciparum* et pour *P. vivax* ;
- moins de 10 % de faux positifs ;
- moins de 5 % de tests non interprétables.

À partir de ces résultats, l'OMS fait des propositions de classement par afin d'aider au choix de TDR selon chaque contexte d'infestation parasitaire (34). Une base de données interactive est tenue à jour par la *Foundation for Innovative New diagnostics* (FIND), partenaire de l'OMS dans la lutte contre le paludisme. Elle permet aux organismes et institutions de sélectionner les kits validés par rapport aux besoins locaux (39).

Les identifications possibles par les TDR disponibles sur le marché, répertoriés dans la 6^e évaluation de l'OMS en 2015, sont présentées dans le Tableau 4 ci-dessous (34) :

¹¹ CDC. Malaria Diagnosis (U.S.) – Rapid Diagnostic Test. 2114. http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/rdt.html ; dernière consultation le 3 novembre 2016.

Tableau 4. Différents types de TDR disponibles selon l'OMS (technique ICG sur Ag plasmodiaux)

Types de test	Antigène(s) détecté(s)	Espèce(s) cible(s) par Ag	Espèce de <i>Plasmodium</i> diagnostiquée
A	HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i> (P. f)
B	Pan aldolase ou Pan pLDH	toutes	Tout <i>Plasmodium</i>
C	T1 : Pan aldolase ou Pan pLDH	toutes	<i>P. falciparum</i> Paludisme mixte
	T2 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	Paludisme autre que P. f
D	T1 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i> Paludisme mixte
	T2 : Pan aldolase ou Pan pLDH	toutes	Paludisme autre que P. f
E	T1 : Pv pLDH	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i>
	T2 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	Paludisme mixte (P. f, P. v)
F	T1 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i>
	T2 : Pv pLDH	<i>P. vivax</i>	Paludisme mixte (P. f, P. v)
G	T1 : Pan pLDH ou Pan aldolase	toutes	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> Paludisme mixte (P. f, P. v)
	T2 : Pv pLDH	<i>P. vivax</i>	Paludisme mixte (P. f et espèce autre que P. v).
	T3 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	Paludisme mixte (P. f, P. v et autre espèce) Paludisme mixte (P. v et espèce autre que P. f) Paludisme autre que P.f et P.v (P.o, P. m)
H	T1 : pLDH (Pv, P.o, P.m et non P.f)	<i>P. vivax, P. ovale, P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i> Paludisme mixte (P. f et P. v ou P. o ou P. m)
	T2 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	Paludisme autre que P. f Paludisme mixte avec 2 espèces hormis P. f
I	Pv LDH	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>
J	HRP-2	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	Pf pLDH		
K	T1 : Pv LDH	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i>
	T2 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	Paludisme mixte (P. f P. v)
	T3 : HRP-2 ou Pf pLDH		
L	T1 : Pan pLDH ou Pan aldolase	toutes	<i>P. falciparum</i> Paludisme mixte (P. f et autre espèce)
	T2 : HRP-2 ou Pf pLDH	<i>P. falciparum</i>	Paludisme autre que P. f
	T3 : HRP-2 ou Pf pLDH		Paludisme mixte avec 2 espèces hormis P. f

P. f = *P. falciparum* ; *P. v* = *P. vivax* ; *P. o* = *p. ovale* ; *P. m* = *P. Malariae*.

Plusieurs observations générales ont été publiées sur les tests de recherche des antigènes plasmodiaux :

- La protéine HRP-2 reste présente dans le sang jusqu'à 28 jours après l'initiation d'un traitement antimalarique : de ce fait, les tests recherchant cette protéine ne peuvent pas être utilisés pour le suivi d'efficacité d'un traitement (5). Par contre, l'élimination rapide de la protéine pLDH du sang en 5 à 6 jours après la disparition du parasite peut permettre - à défaut de lecture microscopique - un suivi thérapeutique (40) ;
- Des questionnements existent sur les performances de ces tests, notamment leur faible sensibilité analytique (si parasitémie de moins de 100-200 parasites / μL). A l'inverse des faux négatifs peuvent résulter d'un phénomène de prozone si la parasitémie est très forte (33). Les tests ICG ont en général une sensibilité médiocre pour *P. ovale* (41) et *P. malariae* (42) ;
- Des faux positifs en présence d'auto-anticorps ou de facteur rhumatoïde à des taux élevés ont été décrits (43) avec la première génération de tests, mais ces réactions croisées seraient maintenant exceptionnelles avec les tests de deuxième génération, ayant une meilleure spécificité analytique par utilisation d'IgM monoclonaux (30). Toutefois, un taux de 3 % de faux positifs est rapporté dans une étude récente, menée en France par le CNR (42) ;
- Une revue Cochrane a été conduite, en lien avec l'OMS, pour évaluer ces tests en zones d'endémie de *P. falciparum*. Une grande proportion avait des résultats supérieurs à 90 %, tant pour la sensibilité que pour la spécificité, autorisant leur usage dans le diagnostic (44). Selon la même méthode, ces auteurs (Abba *et al.*) ont procédé à une revue sur les tests de détection des espèces autres que *P. falciparum* et/ou ciblant *P. vivax* (40) avec des performances meilleures pour les tests spécifiques de *P. vivax* les plus récents. Ces deux méta-analyses ont exclu les études réalisées sur les personnes non immunes (voyageurs, migrants)¹² ;
- L'OMS a identifié récemment en Afrique une problématique de souches de *P. falciparum* présentant une délétion du gène des protéines HRP-2/3¹³, qui empêche l'identification du parasite par les tests ICG utilisant cette protéine (45). Les délétions existent aussi au Pérou (31). L'organisation a lancé une alerte auprès des autorités et des fabricants - avec recherche éventuelle de la prévalence de cette délétion parmi les parasites d'une région - et a débuté un programme de travail et de surveillance spécifique sur ce problème. Elle a établi un protocole d'identification formelle à destination des professionnels : lors du constat de résultats divergents entre d'une part deux tests ICG différents - dont la qualité a été validée par l'OMS - donnant des résultats négatifs pour la HRP-2 et positifs pour la protéine pLDH ou Pf pLDH, et d'autre part un diagnostic positif d'infection à *P. falciparum* faite par deux microscopistes expérimentés sur le même échantillon sanguin, il convient de confirmer finalement le diagnostic de paludisme par biologie moléculaire. Si la délétion suspectée est ainsi formellement identifiée en laboratoire spécialisé, une notification doit être adressée à l'OMS ;
- Les tests de détection des protéines de *P. falciparum* ont un intérêt chez la femme enceinte, car les parasites sont en grande partie séquestrés dans le placenta, limitant la possibilité de diagnostic par les examens directs au microscope, alors que l'HRP-2 est libérée dans la circulation sanguine par les hématies infectées. Une méta-analyse sur les études chez la femme enceinte ou parturiente (14) montre que les ICG sont plus sensibles, avec 81 % de sensibilité [IC95 % : 55-93] versus 72 % [IC95 % : 62-80], que le frottis de sang périphérique. L'examen du tissu placentaire serait encore le plus pertinent, mais n'est réalisable qu'après la délivrance (28). Cette problématique est forte pour les zones d'endémie, dans lesquelles les décès des femmes gravides et des nouveau-nés demeurent élevés.

1.4.3 Les tests sérologiques de détection d'anticorps spécifiques

Diverses techniques existent pour mettre en évidence les Ac développés contre *Plasmodium* : immunofluorescence, électrosynérèse ou méthodes immunoenzymatiques ELISA (*Enzymes-linked*

¹² De ce fait, elles n'ont pas été incluses dans la partie évaluation de ce rapport.

¹³ La protéine HRP-3, de la même famille que HRP-2 et très proche dans sa séquence d'acides aminés, provoque des réactions immunitaires croisées.

immuno-sorbent assay). Le CDC a répertorié des tests pour trois des espèces de *Plasmodium* : *falciparum*, *vivax* et *malariae*¹⁴.

Du fait de l'apparition tardive des Ac anti-trophozoïte, postérieure de 10 jours en moyenne à la crise aiguë, la recherche des Ac, IgM comprises, n'a pas d'intérêt en situation d'urgence (15). Cette recherche d'Ac est cependant classiquement décrite comme utile dans d'autres situations cliniques¹⁵ :

- pour confirmer rétrospectivement un diagnostic chez un patient ayant pris un traitement sans diagnostic biologique (traitement présomptif) ;
- pour confirmer des formes chroniques de paludisme chez un patient originaire de zone d'endémie (paludisme viscéral évolutif [PVE] chez adulte ou enfant, splénomégalie palustre hyperimmune chez l'adulte) et permettre l'instauration d'un traitement d'éradication approprié. Il s'agit en particulier de confirmer des infections à *P. vivax* et d'initier un traitement pour éliminer les hypnozoïtes (46). Dans le PVE, des IgG retrouvées à des taux élevés signent la chronicité de l'infection ;
- dans les dons de sang, de cellules et d'organes (27) ;
- dans les enquêtes épidémiologiques de zones impaludées (31, 47), mais il n'est pas possible avec les tests immuno-enzymatiques actuels de distinguer les infections récentes et anciennes (15, 46).

Des faux positifs aux tests sérologiques ont été identifiés, par réaction croisée avec des Ac dirigés contre d'autres parasites d'espèces intraérythrocytaires proches comme *Babesia* (48).

1.4.4 Les techniques d'amplification génique

La première description d'une technique de biologie moléculaire dans le paludisme remonte à 1994 (30), ces techniques se sont ensuite diversifiées : classique ou en temps réel, avec différentes sondes d'hybridation. Du fait du principe même d'amplification, elles présentent une très bonne sensibilité, notamment pour la détection de *P. falciparum* (0,5 à 0,0005 parasites / µl), et peuvent permettre une identification d'espèce, précieuse pour distinguer les espèces autres que *falciparum* (32). Mais le matériel spécifique peut ne pas être accessible à tous les laboratoires et le délai de rendu des résultats ne peut répondre à l'urgence (49). De plus, ces techniques souffrent d'une absence de standardisation (46).

La sensibilité élevée des techniques d'amplification génique peut être utile chez des patients avec des parasitemies très basses : chimioprophylaxie mal suivie, échec de traitement préventif pour *P. vivax* (22) ou infection mixte (2). Une recherche négative par PCR lors d'un accès de fièvre pourrait totalement écarter l'hypothèse de paludisme (50), sous réserve de la qualité de l'analyse. Toutefois, certains auteurs (30) rapportent que des variants dans la séquence nucléotidique cible des espèces *malariae*, *vivax* et *ovale* peuvent conduire à des résultats faussement négatifs. Certains de ces tests dépistant *P. falciparum* ont obtenu le marquage CE en 2016 (Illumigene Meridian Bioscience).

Selon l'OMS, des infections inframicroscopiques (non détectables au microscope) à *P. falciparum* et *P. vivax* sont fréquentes et les techniques par amplification génique seront primordiales dans la lutte antipaludique pour identifier les zones où la maladie sévit sous cette forme, notamment lorsque la transmission se situe à un taux faible (semi-endémie). Elles présentent également un intérêt dans les cas complexes et dans la surveillance des lignées chimiorésistantes dans le monde (47).

La dernière technique d'amplification génique apparue ne nécessite pas de thermocycleur : la LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) est une technique d'amplification isotherme induite par boucle (terme OMS 2014) qui permet la détection à l'œil nu par turbidimétrie (ou fluorescence)

¹⁴ CDC. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. 2016 <http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/serum/tests.html> ; dernière consultation le 3 novembre 2016.

¹⁵ CDC. Malaria Diagnosis (U.S.) – Serology. 2012. http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/serology.html.

et des résultats rapides (15). Elle utilise du matériel peu onéreux (plastique) qui présente un intérêt pour la détection de masse dans une population asymptomatique (51).

1.5 Paramètres biologiques non spécifiques

Des explorations paracliniques avec bilan sanguin, hémocultures, bandelettes urinaires peuvent compléter les éléments cliniques pour un diagnostic différentiel de pathologies exotiques ou cosmopolites susceptibles de provoquer une fièvre élevée.

Au niveau des paramètres biologiques généraux, lors d'un accès palustre, sont souvent relevées une anémie hémolytique et une thrombopénie (< 100 000 plaquettes / μ l voire 50 000 / μ l dans les formes graves), cette dernière ayant une bonne valeur d'orientation chez un patient fébrile selon la conférence française de consensus de 2007 (49). Un ictère clinique ou une bilirubine totale > 50 μ mol / L, ainsi qu'une atteinte rénale (créatininémie ou urée élevées), sont d'autres critères de gravité d'un accès palustre.

1.6 Aspects réglementaires

En France¹⁶, le paludisme fait actuellement partie des maladies à déclaration obligatoire (transmission obligatoire des données individuelles à l'autorité sanitaire). Le signalement doit être fait sans délai auprès de l'ARS du lieu d'exercice par le biologiste ou le clinicien avec notification ultérieure de suivi, mais la surveillance du paludisme est différente selon la nature du territoire concerné :

- en France métropolitaine, seuls les cas de paludisme autochtone (infection contractée en métropole) sont à signaler et à notifier à l'ARS compétente. Il en survient quelques cas chaque année (18), et après un signalement, une enquête est menée afin de confirmer l'origine, le caractère autochtone de la contamination et prendre les mesures qui seraient nécessaires ;
- dans les départements français d'outre-mer (DOM)¹⁷, les cas de paludisme autochtone et ceux d'importation doivent faire l'objet d'un signalement et d'une notification à l'ARS. Des mesures axées en premier lieu sur la lutte anti-vectorielle autour de chaque cas sont alors mises en place ;
- à noter que ce dispositif exclut les pays et territoires d'outre-mer (PTOM) français ayant un autre statut¹⁸ en droit français et européen.

De plus, une potentielle contamination par un *Plasmodium* fait partie de la problématique de qualification biologique de prélèvements d'éléments et produits du corps humain à des fins thérapeutiques : la détection des anticorps antipaludéens est effectuée, notamment dans le cas où les donneurs rapportent avoir séjourné dans une zone d'endémie lors du questionnaire ou de l'entretien préalables au don [art. R1211-13 et -14 du Code de la santé publique (CSP)].

Au niveau européen, une décision [numéro 2012/506/EU] d'exécution de la Commission européenne (52) a été publiée le 8 août 2012 sur la base d'un avis scientifique établi par l'ECDC. Cette décision actualise les informations de la décision n°2002/253/CE établissant des définitions de cas pour la déclaration des maladies transmissibles au niveau communautaire et leur surveillance. En 2012, elle stipule que pour le paludisme, un cas confirmé est celui d'une personne répondant aux critères cliniques et de laboratoire suivants :

¹⁶ Articles L3113-1, R3113-4 et R3113-2 du CSP ; pour le paludisme, les modalités sont régies par l'article D3113-6 du CSP ; la surveillance avec nécessité d'intervention urgente locale, nationale ou internationale est constituée d'une action de santé publique autour du cas (prévention individuelle et collective) et d'un suivi des tendances avec mesures d'investigation et d'intervention le cas échéant. Certaines autres maladies relèvent de l'article D3113-7 du CSP.

¹⁷ Les DOM sont la Guadeloupe, la Guyane, la Martinique, Mayotte, et la Réunion.

¹⁸ Les pays et territoires d'outre-mer (PTOM) français sont la Nouvelle-Calédonie, la Polynésie française, les îles Wallis et Futuna, Saint-Pierre-et-Miquelon, les Terres australes et antarctiques françaises, Saint-Martin et Saint-Barthélemy à compter du 1^{er} janvier 2012. Les PTOM ne font pas partie de l'Union européenne, à l'inverse des départements d'outre-mer (DOM) qui ont le statut de régions ultrapériphériques (RUP) de l'Union européenne.

- critères cliniques : toute personne présentant de la fièvre ou des antécédents de fièvre ;
- critères de laboratoire : au moins un des trois critères suivants :
 - mise en évidence de l'hématozoaire du paludisme par microscope optique dans des frottis sanguins ;
 - détection d'acide nucléique de *Plasmodium* dans le sang ;
 - détection de l'antigène de *Plasmodium*.

Cette décision incite à procéder, si possible, à une différenciation des espèces de *Plasmodium*. Par rapport à la décision de 2002 et sur la base des données de la littérature, cette actualisation a notamment ajouté les tests antigéniques dans les critères de laboratoire pris en considération pour constituer un cas.

1.7 Conditions actuelles de la prise en charge par l'assurance maladie

Sont inscrits à la NABM :

- les deux techniques de recherche directe de *Plasmodium* dans le sang au microscope, c'est-à-dire le frottis et la goutte épaisse, rassemblées dans un seul libellé ;
- le sérodiagnostic - recherche d'anticorps à *Plasmodium*, avec deux libellés différents : un pour l'immunofluorescence, un autre pour l'électrosynérèse (contre immunoélectrophorèse).

La NABM ne précise pas totalement les indications de ces trois libellés (diagnostic, suivi de traitement, ...).

Les volumes des actes remboursés ces trois dernières années, disponibles sur le site Ameli¹⁹ sont les suivants (Tableau 5) :

Tableau 5. Actes de diagnostic du paludisme remboursés par la CNAMTS

Type d'examen diagnostique du paludisme à la NABM	Code des examens inscrits	Nombre de cotations en 2013	Nombre de cotations en 2014	Nombre de cotations en 2015
Hématozoaires : recherche sur frottis et en goutte épaisse	1125	21 137	20 862* / 30458**	20 809 / 27189
Paludisme : sérodiagnostic par ELS	4353	23	22 / 25	23 / 24
Paludisme : sérodiagnostic par IFI	4354	1668	1729 / 2275	1410 / 1780

* Régime général – hors sections locales mutualistes - Hors DROM.

** Régime général – avec sections locales mutualistes – Métropole et DOM.

Le dernier rapport du CNR (53) relate qu'en 2013 le diagnostic a été réalisé plus largement en laboratoires d'analyse médicale (LBM) privés (n=653) que publics (n=276), avec une répartition sur tout le territoire, bien que la zone de plus grande fréquence soit l'Île-de-France. Nonobstant l'absence de cotation à la NABM, un test d'ICG est réalisé dans 77,7 % des cas rapportés au CNR, dans lesquels il est alors associé à 99,8 % à la recherche directe du parasite au microscope.

La détection des protéines plasmodiales par ICG n'est pas inscrite à la NABM, mais est prise en charge financièrement via une autre modalité, celle de la Mission d'enseignement, de recherche, de référence et d'innovation (MERRI) intitulée « Référentiel des actes innovants hors nomenclature » (RIHN), dans la « liste complémentaire d'actes de biologie médicale et d'anatomopathologie », ce qui permet sa prise en charge lorsqu'elle est réalisée en établissement de santé. Le code et le libellé de ces tests sont : « G110 - Paludisme recherche d'Ag solubles par une technique immunochromatographique (test de diagnostic rapide) » (chapitre 07 Immunologie,

¹⁹Ameli. Actes de biologie médicale. Juin 2016. <http://www.ameli.fr/l-assurance-maladie/statistiques-et-publications/donnees-statistiques/actes-de-biologie-medicale/biolam-2013-2015.php>.

sous-chapitre 07-06 Sérologie parasitaire). La note de commentaire argumente que « la recherche des Ag plasmodiaux dans le sang circulant est un outil indispensable au diagnostic de paludisme en France de par sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité / facilité de réalisation au regard d'une pathologie potentiellement létale ».

À noter que figure également dans le RIHN, avec des libellés génériques pour l'ensemble des parasites, la recherche du génome (« N151 - Détection par PCR classique ou temps réel simplex de champignons ou parasites [hors diagnostic prénatal de la toxoplasmose et hors les microorganismes inscrits à la NABM], dans le chapitre 14-2-3).

1.8 Contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

Des opérations du contrôle national de qualité (CNQ) des analyses de biologie médicale, organisé par l'ANSM, ont porté en 2014 et 2015 sur le frottis sanguin, avec envoi aux LBM de frottis contenant des hématies parasitées par des hématozoaires sur des lames déjà colorées (54, 55).

Les résultats de ces CNQ et l'indicateur qualité CNQ publié en mars 2016 (56) indiquent une évolution dans les pratiques des LBM en France sur la base des données colligées lors des précédents contrôles. Ainsi :

- le nombre de laboratoires participant en France métropolitaine au CNQ a chuté, passant de 3341 en 2004 à 921²⁰ en 2016, mais ceci est sans doute plus la conséquence du très large regroupement des LBM (qui font suite à la réforme de la biologie) que d'un arrêt de cette activité ;
- les réponses obtenues en 2014 peuvent être comparées avec celles de précédents CNQ sur cet acte (cf. Tableau 6) ;
- en 2015, le CNQ portant sur un frottis sanguin contenant *P. falciparum* (0,4 % de parasitémie) a obtenu une réponse exacte sur le genre *Plasmodium* de tous les LBM répondeurs (264 laboratoires), mais 10,1 % d'erreurs d'espèce. Les auteurs du rapport commentent : « *Toutefois, en pratique, dans la majorité des laboratoires, le diagnostic biologique du paludisme associe actuellement le frottis et la goutte épaisse à la détection de l'antigénémie par une technique rapide immuno-chromatographique qui permet de confirmer ou réorienter le diagnostic vers P. falciparum (présence de l'antigène HPR2 spécifique de l'espèce)* » (55).

Tableau 6. Résultats comparés d'identification d'espèces plasmodiales sur frottis sanguin dans le cadre du CNQ

Espèce plasmodiale présente dans le frottis	Identification exacte d'espèce (en %)		Erreurs d'espèce plasmodiale (%)		Absence d'identification de <i>Pl.</i> ou de réponse (%)	
	CNQ 2014	CNQ* antérieur	CNQ 2014	CNQ antérieur	CNQ 2014	CNQ antérieur
<i>P. falciparum</i>	87,9	2006 : 94,7	9,9	3,8	4,4	5,3
<i>P. malariae</i>	81,8	2004 : 80,1	13,7	1,9	5,5	2,4
<i>P. ovale</i> ^o	87,0	2002 : 81,8	7,3	16,0	5,3	1,9

* La comparaison a été faite dans cet argumentaire avec le résultat antérieur portant sur une parasitémie la plus proche de celle des échantillons à examiner en 2014.

^o Le CNQ sur *P. ovale* de 2015 (242 LBM participants) a conduit à environ 50 % de réponses exactes et 50 % de réponses « *P. vivax* » et après expertises, il s'est avéré que la distinction entre les deux espèces pouvait être délicate. D'après ANSM, 2015 (54).

²⁰ Chiffres obtenus le 29 septembre 2016 auprès de l'ANSM pour les LBM inscrits au Contrôle national de qualité (CNQ) pour la recherche de parasites sanguins, sur la base d'une inscription par siège social du LBM, y compris pour les LBM multi-sites (une seule inscription).

La dernière conférence de consensus française avait pointé en 2007 que les données colligées par le CNR et l'ANSM témoignaient d'une faible sollicitation individuelle des LBM pour le diagnostic de paludisme sur le territoire métropolitain et de la nécessité de maintenir en interne la qualification des biologistes sur ces techniques d'identification au microscope, à laquelle le CNQ contribue (49).

Une « sérologie du paludisme » a été proposée au CNQ en 2015 : un échantillon, positif en IFI et en ELISA (tests commerciaux), a été adressé à 42 laboratoires déclarant réaliser cette analyse (69 en 2011) (55). Seuls 31 laboratoires (73,8 %), en majorité hospitaliers, ont rendu un résultat. Pour la recherche des Ac sériques, l'IFI reste la technique la plus utilisée par les laboratoires français (69,7 %), suivie par une technique ELISA (27,3 %). Un seul laboratoire utilise l'ELS, en parallèle avec une autre technique, deux utilisent 2 méthodes, IFI et ELISA ou IFI et ELS. Les réponses des laboratoires étaient satisfaisantes, y compris pour les réactifs « maison », sauf dans un cas qui serait dû à une erreur d'échantillon.

2. Méthode d'évaluation

2.1 Champ et méthode d'évaluation

Les tests diagnostiques évalués sont ceux pour lesquels des propositions d'inscription ou de modification d'inscription à la NABM ont été formulées, c'est-à-dire les deux examens microscopiques (frottis et goutte épaisse), la recherche des antigènes sériques par ICG et la recherche des anticorps sériques. Lorsqu'elles sont présentes dans les documents de synthèse, les informations sur les techniques PCR sont aussi collectées afin de cerner leur place actuelle dans le diagnostic du paludisme.

Conformément à la feuille de route adoptée par le Collège de la HAS le 2 juin 2016, (1), la procédure d'évaluation consiste à :

- réaliser une recherche documentaire systématique suivie d'une analyse critique des données de la littérature synthétique (recommandations de bonne pratique, rapports d'évaluation et revues systématiques) de janvier 2000 à mai 2016, faisant état des méthodes diagnostiques des infections à *Plasmodium* dont l'utilisation des techniques de recherche de protéines plasmodiales par ICG ;
- recueillir le point de vue des professions de santé concernées à travers le questionnement du CNR du paludisme et des organismes professionnels des spécialités concernées par cette maladie parasitaire (Conseil nationaux professionnels ou à défaut sociétés savantes), interrogés en tant que parties prenantes au sens du décret n°2013-413 du 21 mai 2013²¹ portant notamment sur les particularismes du paludisme d'importation et la spécificité nationale relative au paludisme d'endémie dans certains départements français d'outre-mer (DOM) ;
- effectuer une approche de type analyse de cohérence, pour chacun des examens pour lequel une demande d'inscription ou de modification de libellé est faite, entre d'une part, les propositions de la CNAMTS, et d'autre part, les données de la littérature et la position des parties prenantes ;
- en compilant ces éléments dans un argumentaire, soumis directement au Collège pour validation.

2.2 Recherche documentaire, sélection et analyse

2.2.1 Stratégie d'interrogation des bases et résultats

Conformément à la méthode d'évaluation retenue, seule la littérature synthétique a été recherchée : recommandations de bonne pratique (RBP) concernant notamment la prise en charge des voyageurs rentrant de zone d'endémie et celles émanant d'organismes internationaux, en particulier l'OMS, rapports d'évaluation technologique (ou Health technology assessment, HTA) et revues systématiques.

La recherche documentaire a été conduite de la manière suivante (Tableau 7).

²¹ Le quatrième alinéa de ce décret dispose que : « La décision peut s'appuyer, si l'objet de l'expertise le justifie, sur la prise en compte des points de vue des « parties prenantes » (ou « parties intéressées »), c'est-à-dire des personnes ou groupes concernés ou susceptibles de l'être, directement ou indirectement, par les conséquences de cette décision, notamment des milieux associatifs et des acteurs économiques ou professionnels, ou qui représentent l'intérêt général de groupes concernés par ces conséquences ».

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027434015&categorieLien=id>

Tableau 7. Stratégie d'interrogation documentaire dans les bases et résultats

Bases de données interrogées	Medline, Science direct
Recherches complémentaires	Sites internet d'agences d'évaluation de technologies de santé, de structures gouvernementales ou internationales (OMS, ECDC) et de sociétés savantes compétentes dans le domaine étudié (françaises et étrangères) ; Cochrane Library ; références des publications identifiées et lues
Période de recherche	Recherche initiale sur la période de janvier 2000 à avril 2016, puis veille réalisée jusqu'au 30 septembre 2016
Langues	Français ou anglais (ou résumé en anglais)

Les équations de recherche, les mots clés utilisés et la liste des sites Internet consultés figurent en Annexe 1 (Tableau 10).

La recherche bibliographique présentée ci-dessus et la veille ont permis d'identifier 345 documents jusqu'au 30 septembre 2016. Les représentants des parties prenantes ont fourni onze références bibliographiques avec leur réponse au questionnaire. Dix n'étaient pas des documents de synthèse ou de recommandation et n'ont pas été retenues, et la dernière référence venait en doublon de la recherche de la HAS.

2.2.2 Sélection bibliographique

Une analyse des titres et résumés a permis la réalisation d'une première sélection qui a consisté à exclure les documents sur les critères suivants :

- publications sans lien avec le sujet, n'appartenant pas à la littérature synthétique, doublons ;
- version(s) antérieure(s), devenue(s) obsolète(s), de recommandations ou de rapport d'HTA lorsqu'il existe une version plus récente ;
- publications non disponibles en français ou anglais (ou absence de résumé exhaustif en anglais) ;
- publications portant uniquement sur les zones d'endémie du paludisme qui ne présentent pas les caractéristiques recherchées dans le présent rapport consacré à la problématique du diagnostic du paludisme hors zone d'endémie ;
- publications dans lesquelles les tests diagnostiques des infections à *Plasmodium* par technique immunochromatographique (recherche d'antigènes) n'étaient pas considérés.

À l'issue de cette première sélection, 307 documents ont été exclus. La majorité des articles l'ont été car ils relataient des études réalisées en zones d'endémie et/ou n'avaient pas de caractère synthétique.

Une deuxième sélection, faite sur lecture *in extenso* des 38 documents restants, n'a pas retenu 18 documents pour les raisons suivantes :

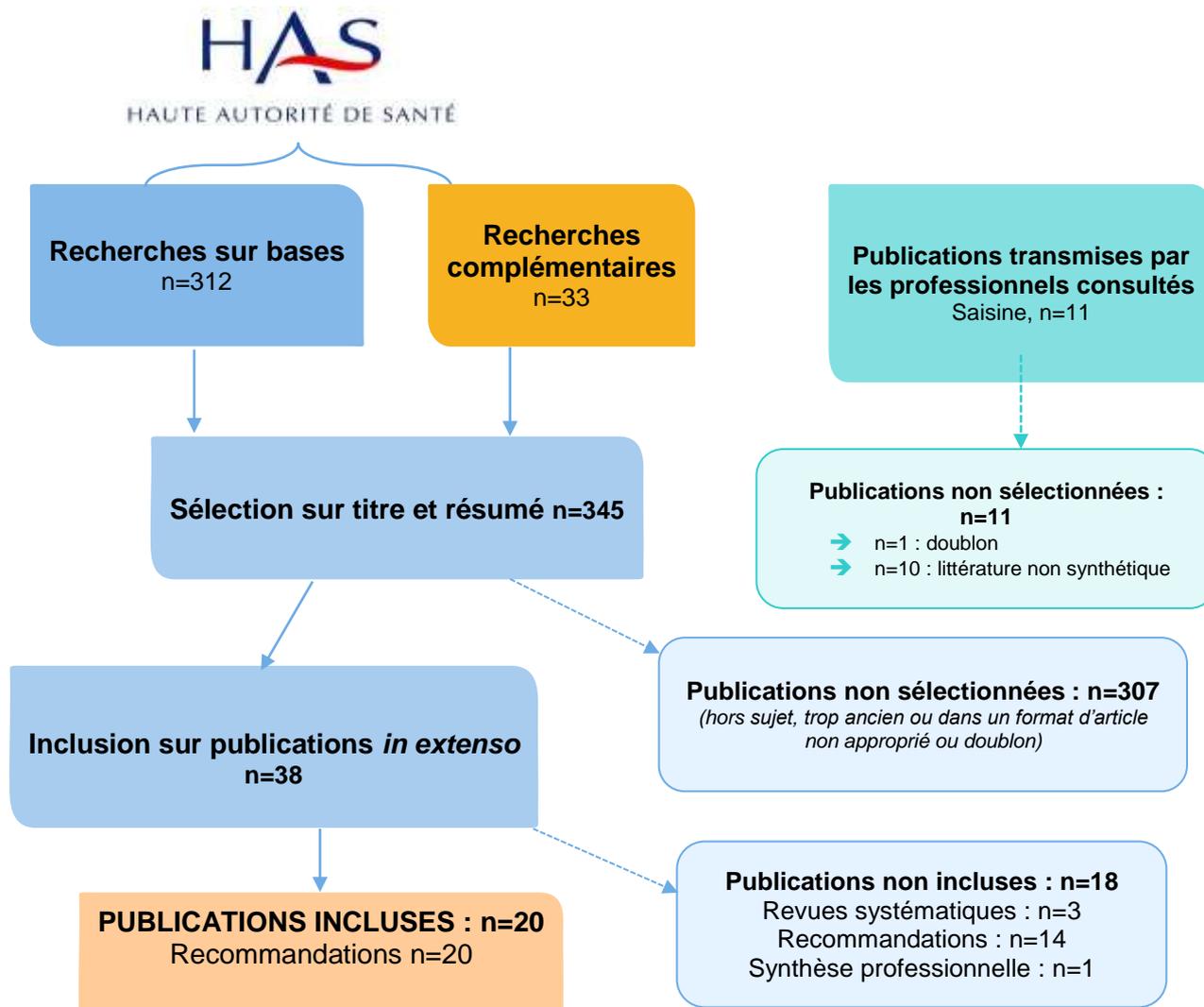
- les revues Cochrane, conduites avec l'OMS pour évaluer les performances des tests ICG de recherche des antigènes en zones d'endémie (40, 44), ont exclu les études réalisées sur les personnes non immunes (voyageurs, migrants), qui sont le cœur de la problématique du travail de la HAS ;
- deux documents portaient sur les performances des techniques de diagnostic dans les zones d'infection inframicroscopique dans le but d'éradiquer la maladie, hors champ de cette évaluation (31, 57).
- ont également été exclus :
 - les documents uniquement descriptifs sur la gestion des cas de paludisme d'importation, sans présentation de méthode d'élaboration (14, 58-64) ;
 - les commentaires ou les reprises textuelles, sans expertise complémentaire dans le contexte local, de recommandations déjà existantes, notamment celles de l'OMS (65-68) ou de la Commission Européenne (69) ;

- les documents relatifs au diagnostic différentiel de fièvre avec une conduite à tenir incluant la recherche du paludisme, mais qui ne fournissaient aucune information sur la méthode d'élaboration de la stratégie diagnostique (70).

Cette sélection a abouti à retenir vingt documents, tous des recommandations de bonne pratique (RBP).

L'ensemble du processus de sélection est résumé dans le schéma (Figure 1) ci-dessous.

Figure 1. Diagramme de sélection des références bibliographiques analysées



2.2.3 Analyse méthodologique de la littérature sélectionnée

La qualité méthodologique des vingt RBP sélectionnées a été analysée en s'appuyant sur des items adaptés pour ce sujet du « Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations », en ligne sur le site de la HAS (71), et sur la grille globale « Global rating scale » - GRS pour les évaluations rapides (limitée à 4 items) développée par le consortium international AGREE (« grille AGREE II - GRS ») (72), traduite librement en français. La grille AGREE II-GRS et ses items (73) sont présentés en Annexe 2.

2.3 Consultation des parties prenantes

2.3.1 Organismes professionnels consultés

Cette consultation a été menée conformément à la procédure de consultation des parties prenantes mise en place par la HAS²², auprès des groupes concernés, ou susceptibles de l'être, par les conséquences de cette évaluation sur les modifications apportées à la NABM pour les actes évalués dans cet argumentaire. Ont été consultés la responsable du CNR paludisme et des organismes professionnels suivants (Tableau 8) :

Tableau 8. Organismes professionnels contactés pour les consultations de parties prenantes

Disciplines	Organismes
Réanimation	Conseil national professionnel d'anesthésie-réanimation (CNPAR)
Médecine infectieuse (parasitologie)	Conseil national professionnel - Fédération française d'infectiologie (CNP-FFI)
Médecine d'urgence	Collège français de médecine d'urgence (Conseil national professionnel) (CFMU)
Médecine générale	Collège de la médecine générale (CMG)
Médecine des armées	Service de santé des armées
Médecine tropicale	Société de pathologie exotique (SPE)
Médecine tropicale	Société de médecine des voyages (SMV)
Biologie médicale (parasitologie-mycologie)	Société française de biologie clinique
Médecine tropicale	Centre national de référence (CNR) du paludisme

2.3.2 Modalités de consultation des parties prenantes

En pratique, le président de chacun des organismes concernés a été directement sollicité afin que le groupe professionnel qu'il représente exprime son point de vue argumenté dans l'intérêt général de ses membres. À cette fin, un questionnaire ouvert standardisé rédigé par la HAS lui a été adressé, ainsi qu'un exemplaire du document de travail (argumentaire provisoire) contenant une présentation du contexte et de l'analyse bibliographique réalisés conformément à la méthode décrite au chapitre 2.2. Cette sollicitation a été envoyée le 13 juillet 2016 aux parties prenantes. Les retours des questionnaires complétés se sont étagés entre le 5 août et le 18 septembre 2016. Seul, le Collège de la médecine générale n'a pas répondu à la sollicitation de la HAS.

Le CNR - sa responsable et un autre de ses membres - a également été destinataire de ces documents avant l'audition orale, qui s'est déroulée le 23 septembre 2016 dans les locaux de la HAS. Cette audition a fait l'objet d'un compte rendu rédigé par la HAS, validé ensuite par le CNR.

Le compte rendu *in extenso* de l'audition du CNR et les réponses aux consultations écrites des autres parties prenantes sont disponibles en annexes 5 à 12 de l'argumentaire. Une synthèse des éléments de réponse apportés par les parties prenantes, réalisée par la HAS, est intégrée au chapitre suivant de l'argumentaire (cf. chapitre 3.2).

²² Procédure de consultation des parties prenantes de la HAS, juin 2014. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-09/c_2014_0115_adoption_procedure_parties_prenantes.pdf.

3. Résultats de l'évaluation

3.1 Analyse de la littérature

Suite à la recherche bibliographique et après la sélection opérée selon les critères exposés précédemment (chapitre 2.2, figure 1), vingt RBP sélectionnées ont été analysées.

3.1.1 Qualité méthodologique des recommandations sélectionnées

Globalement la qualité de ces vingt RBP, évaluée avec la grille AGREE II - GRS (voir *supra* chapitre 2.2.3) est acceptable à faible en particulier pour les recommandations sur la prévention et la prise en charge du paludisme chez le voyageur, par l'absence de transparence :

- sur la manière, notamment dont ont été élaborées les préconisations fondées sur avis d'experts, qui n'est pas présentée, sauf dans un cas où l'élaboration est détaillée et la notion de consensus est chiffrée à un taux de 85 % (74) ;
- sur les modalités de la recherche bibliographique pour en garantir l'exhaustivité lors de l'élaboration de la RBP, qui ne sont pas décrites hormis dans deux cas (4, 9) ; néanmoins, les auteurs des dix RBP sélectionnées pour l'évaluation des méthodes diagnostiques relataient se baser sur une revue systématique de la littérature de preuve pour actualisation les données, mais sans autre précision ;
- sur le système de gradations de niveau de preuve et/ou de force de recommandation, sauf dans trois RBP (4, 9, 75)²³.

Finalement, une dernière distinction a été faite sur les critères méthodologiques énoncés ci-dessus :

- dix RBP, dont la qualité globale était acceptable selon les critères principaux de la grille AGREE-GRS, ont été conservées pour l'évaluation des méthodes diagnostiques ;
- les dix autres RBP n'ont été examinées que pour les données sur les conditions de réalisation et les critères relatifs à la qualité et à la formation aux techniques diagnostiques du paludisme, car l'apport de ces documents au regard de cette problématique n'était pas négligeable.

À noter que la faible qualité méthodologique des recommandations aux voyageurs a été pareillement soulignée par les auteurs d'une étude d'évaluation effectuée en 2014 à l'aide de la méthode AGREE II portant sur celles de langue anglaise (76).

3.1.2 Indications des méthodes diagnostiques du paludisme sélectionnées

► Présentation des recommandations de bonne pratique sélectionnées

Ces dix recommandations, dont une de l'OMS, abordent la prise en charge du paludisme dans des pays non situés en zones d'endémie, c'est-à-dire en Europe, Amérique du nord et Australie (Tableau 9) :

- la plupart traitent de la chimioprophylaxie et du traitement du paludisme chez les voyageurs, le diagnostic étant abordé, mais de façon moins détaillée. Le suivi de l'efficacité du traitement et la surveillance de l'éradication parasitaire chez le sujet y sont assez souvent rapportés ;
- il existe également des recommandations pour d'autres contextes :
 - l'Australie a édicté des recommandations pour le dépistage des trois maladies les plus importantes sur le globe terrestre (paludisme, sida et tuberculose) chez les réfugiés arrivant sur son territoire²⁴ (74) ;

²³ Toutefois, dans une de ces trois, (75), les parties relatives à l'objectif de ce travail (diagnostic) n'étaient pas gradées, devenant des simples préconisations.

²⁴ Environ 25 000 réfugiés migrent en Australie chaque année dans le contexte mondial actuel et selon le plan d'accueil mis en place dans ce pays.

- des RBP spécifiques à la gestion du paludisme chez la femme enceinte et le nouveau-né ont été établies dans certains pays comme le Royaume-Uni ou l'Australie (9, 77).

Tableau 9. Recommandations de bonne pratique relatives aux méthodes diagnostiques du paludisme

Titre de la RBP / référence	Organisme / pays	Année de parution
Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à <i>Plasmodium falciparum</i> : recommandations pour la pratique clinique 2007 (Révision de la conférence de consensus 1999) (2)	Société de pathologie Infectieuse de langue française (SPILF) France	2007
<i>Management of imported malaria in Europe</i> (12)	<i>European Society for Clinical Microbiology and infectious Diseases : Study group on Clinical Pathology Europe</i>	2012
Recommandations canadiennes pour la prévention et le traitement du paludisme (malaria) chez les voyageurs internationaux (CATMAT) (8)	Agence de santé publique du Canada / <i>Public Health Agency of Canada</i> Canada	2014
<i>Guidelines for malaria prevention in travellers from the UK 2015</i> (78)	<i>Public Health England</i> Royaume-Uni	2015
<i>Guidelines for the treatment of malaria</i> (4)	<i>World Health Organization / OMS</i>	2015
<i>Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain : Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health</i> (7)	Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI) Espagne	2015
<i>Recommendations for comprehensive post-arrival health assessment for people from refugee-like backgrounds</i> (74)	<i>Australasian Society for Infectious Diseases and Refugee Health Network of Australia</i> Australie	2016
<i>UK malaria treatment guidelines 2016</i> (Laloo DG.) (75)	<i>The British Infection Association</i> Royaume-Uni	2016
<i>The diagnosis and treatment of malaria in pregnancy</i> (9)	<i>Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG)</i> Royaume-Uni	2010
<i>Clinical guideline: Malaria in pregnancy (V3.0)</i> (77)	<i>Department for Health and Ageing, Government of South Australia</i> Australie	2015

► Synthèse des recommandations sur le diagnostic biologique du paludisme

Les principales conclusions et préconisations des dix recommandations sélectionnées pour cette évaluation sont synthétisées dans le Tableau 11 en annexe 4. Plusieurs éléments peuvent être soulignés :

- Le **diagnostic du paludisme chez un patient fébrile est une urgence**, d'autant plus qu'il est non immun vis-à-vis du parasite ou présente un état immunitaire plus fragile (jeune enfant, femme enceinte, ...) ; les dix RBP rappellent de plus que les résultats doivent être donnés dans un laps de temps très court (1 à 4 heures suivant la RBP) ;

- Les **techniques de recherche des parasites par examen direct au microscope** après coloration (frottis sanguin mince et goutte épaisse) sont **les techniques de référence de diagnostic du paludisme**. La réserve énoncée est que ces techniques sont dépendantes de l'expérience et de l'entraînement du microscopiste (huit des dix RBP), tout particulièrement la goutte épaisse qui est une technique utilisée exclusivement en parasitologie, dont l'intérêt est la très bonne sensibilité (7). La lecture d'un frottis mince quant à elle permet :
 - la confirmation de l'espèce / des espèces ;
 - la quantification de la parasitémie qui est un facteur de gravité dans les infections sévères (4, 79) ;
 - l'identification des stades parasitaires (12, 75) ;
- La technique de **recherche d'antigènes plasmodiaux par ICG** est très facile à réaliser, ne nécessite pas d'expertise spécifique et fournit les résultats très rapidement, mais elle n'est que qualitative. Elle peut permettre d'identifier des infections palustres mixtes - selon les types d'Ag recherchés par le test (cf. chapitre 1, Tableau 4).
- Selon six RBP, cette technique de recherche d'antigènes plasmodiaux en ICG par tests de diagnostic rapide **est une alternative, en urgence, lorsque les techniques au microscope sont inaccessibles**, avec notamment les arguments suivants :
 - l'ICG est sensible pour détecter *P. falciparum*, ce qui permet notamment d'initier très rapidement un traitement pour ces infections présentant la plus forte morbidité et un taux de mortalité précoce notable (12, 75). L'OMS relate que des ICG ciblant l'Ag HRP-2 sont utiles pour détecter un paludisme chez des patients ayant reçu un traitement incomplet contre *P. falciparum* pour lesquels le FS sera négatif (4) ;
 - les performances des ICG ciblant *P. vivax* sont plus débattues dans ces RBP, mais l'OMS²⁵ recommande des TDR d'ICG avec deux Ag cibles, dont la Pv pLDH ;
- **Les 10 RBP soulignent de ne pas employer uniquement l'ICG pour établir le diagnostic et la stratégie thérapeutique en raison de performances techniques imparfaites**, en particulier une faible sensibilité pour détecter *P. malariae* et *P. ovale* (4, 74) et recommandent de procéder également à un examen microscopique (*a minima* un FS), si nécessaire dans un autre laboratoire, plus spécialisé :
 - cinq des dix recommandations avancent **l'association simultanée d'emblée d'une analyse microscopique et d'une ICG**, quelle que soit la compétence des biologistes :
 - pour identifier avec certitude une infection par *P. falciparum* (4, 7, 74) ;
 - chez la femme enceinte (9, 77) ;
 - cinq RBP utilisent le terme de « *Gold standard* » pour la recherche des hématozoaires au microscope et préconisent ces techniques comme premier outil diagnostique :
 - toutefois, quatre de ces RBP considèrent que l'ICG est un complément possible d'aide diagnostique à la microscopie (8, 12, 75, 78) ;
 - seule la recommandation française de 2007 (la plus ancienne des RBP sélectionnées) soutient un schéma diagnostique basé uniquement sur les techniques microscopiques en première intention, l'ICG n'étant utilisée qu'en cas de négativité des deux lectures au microscope dans un contexte clinique évocateur (49) ; ce schéma est un des deux proposés par le demandeur ;
- À noter qu'aucune des dix RBP ne précise explicitement de ne faire la goutte épaisse que si le frottis est négatif comme proposé dans la demande.

²⁵ L'OMS a indiqué que la qualité des tests pour *P. vivax* augmentait au fil de ses campagnes de pré-qualification (34).

- Toutes les RBP soulignent la nécessité de répéter les tests de recherche directe (au microscope ou à défaut par ICG) au moins trois fois sur 48 heures à 72 heures dans un contexte clinique évocateur de paludisme avant d'**exclure ce diagnostic** ; la RBP européenne (12) recommande l'association des trois techniques, répétée si nécessaire sur 3 jours, en cas de négativité initiale dans un contexte clinique de forte suspicion.
- Selon cinq des dix RBP qui l'évoquent, **le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique** doit être effectué par frottis sanguin (et goutte épaisse pour la recommandation française), dont la fréquence dépend de la parasitémie initiale et de l'espèce, la surveillance étant logiquement plus importante dans les infections à *P. falciparum* et devant se prolonger dans tous les cas sur un mois après l'initiation du traitement. Les RBP indiquent que les antigènes recherchés par l'ICG pour *P. falciparum*, en particulier l'HRP-2, demeurent détectables pendant 15 à 28 jours après disparition du parasite, ce qui explique l'inutilité de l'ICG pour vérifier l'efficacité d'un traitement antimalarique.
- Deux des dix recommandations (9, 77) ont ciblé la **situation spécifique des femmes enceintes et de la transmission verticale aux nouveau-nés**. Cette situation de la femme enceinte n'est pas évoquée dans la demande de la CNAMTS :
 - ▶ ces RBP consignent la difficulté d'obtenir une confirmation de la présence parasitaire par les techniques de recherche au microscope sur sang périphérique, car les parasites (*P. falciparum*) sont séquestrés au niveau du placenta, soutenant leur préconisation d'utiliser d'emblée les trois techniques du diagnostic d'urgence (FS, GE, ICG) ;
 - ▶ elles relatent la nécessité de rechercher l'occurrence d'une transmission verticale au nouveau-né, par recherche microscopique dans le sang du cordon et dans le placenta au moment de la délivrance, ainsi que dans le sang périphérique du nouveau-né. Un examen histo-pathologique du placenta est également préconisé dans les deux RBP ;
 - ▶ elles préconisent que le paludisme chez la femme enceinte et le nouveau-né soit pris en charge (diagnostic et thérapeutique) par un centre expert du paludisme.
- Aucune des recommandations sélectionnées ne positionne les **techniques d'amplification génique** dans le diagnostic initial d'urgence du paludisme, du fait du délai nécessaire à l'obtention des résultats²⁶ ; sept RBP évoquent également des considérations d'accessibilité et de coût. Leur très bonne sensibilité les fait préconiser dans les laboratoires spécialisés.
- Le recours aux **techniques de détection des Ac sériques spécifiques** n'est que très rarement évoqué, par deux RBP : la RBP espagnole (7), dans le contexte de recommandations pour des voyageurs occidentaux, et par la RBP de l'OMS (4). Considérées comme non pertinentes lors d'un accès aigu dans les deux publications, elles sont recommandées par la RBP espagnole dans le diagnostic rétrospectif et la splénomégalie hyperactive palustre. L'OMS signale leur utilité en épidémiologie et dans une note explicative (46) dans les formes chroniques dues à des espèces autres que *P. falciparum*, notamment *P. vivax*, ou dans le suivi de l'élimination des parasites dans une population. Seules les techniques immuno-enzymatiques sont citées par l'OMS, mais la RBP espagnole indique l'utilisation possible de l'IFI (7) ; ces données sont en cohérence avec la demande sur l'utilité des tests de détection des Ac et les techniques appropriées.

► Conditions de réalisation des méthodes de diagnostic biologique du paludisme

Huit des dix RBP évaluées ci-dessus mettent en avant les conditions contribuant à améliorer la qualité de réalisation des techniques et les performances des tests, donc la fiabilité des résultats des laboratoires adressés aux cliniciens pour la prise en charge des patients. Il apparaît ainsi que

²⁶ L'OMS a récemment relaté leur intérêt en situations plus complexes de parasitémie inframicroscopique (submicroscopique) dans les zones de semi-endémie, mais en pointant en parallèle les manquements en matière de standardisation des techniques et en assurance qualité (47).

cet aspect est essentiel dans le diagnostic du paludisme. Le recours à l'ICG seule en première intention (cf. *supra*) est limité dans les RBP, qui le proposent, à l'impossibilité de la réalisation d'un examen microscopique par une personne compétente dans un délai contraint, et est assujéti à l'envoi en parallèle d'un échantillon sanguin à un centre de référence, qui complétera la stratégie diagnostique. Dans ce contexte de compétences spécialisées limitées sur un territoire, beaucoup d'organismes publics nationaux ont mis en place des outils pratiques d'aide au diagnostic au paludisme à destination des professionnels.

Les publications correspondantes (n=10), en complément des dix RBP évaluées ci-dessus, portent un éclairage sur les difficultés techniques du diagnostic de paludisme et le haut niveau de qualité et d'expertise qu'il exige des professionnels.

L'OMS en premier lieu publie des documents de formation pour les professionnels de terrain, basés sur l'établissement d'un système d'assurance qualité pour la réalisation des tests diagnostiques. Parmi ceux-ci, des recommandations (80) (version actualisée publiée en 2016) à destination du personnel de biologie décrivent les éléments primordiaux à respecter :

- au niveau local (laboratoire) pour les techniques microscopiques (système d'assurance qualité et procédures dédiées, contrôle qualité) et dans une moindre mesure pour l'ICG, avec respect des conditions de conservation et d'utilisation, enregistrements des résultats et traçabilité, formation du personnel ;
- au niveau national (contrôles inter-laboratoires, certification des professionnels, accréditation des laboratoires).

Ces recommandations fournissent également des check-lists pour les éléments clés à respecter dans les audits internes (ou externes) relatifs aux examens microscopiques. D'autres documents pratiques de l'OMS, disponibles en français, sont des guides à la formation et la maîtrise de ces techniques, principalement à destination des pays d'endémie (29, 38, 81). Ce niveau de préconisation prend en considération la grande hétérogénéité des infrastructures sanitaires sur la planète, du niveau d'éducation, y compris des professionnels de santé et de l'accès aux soins. Mais, l'OMS énonce également des règles applicables à l'organisation du dépistage et des soins dans les zones exemptes du vecteur parasitaire, où la rareté des besoins peut avoir d'autres conséquences en matière de risque pour les individus porteurs de la maladie (38). Elle donne par ailleurs les éléments décisionnels clés (sous forme de check-lists) pour évaluer les qualités générales et la praticité des kits d'ICG disponibles et pour choisir ceux appropriés au besoin de chaque état selon son statut vis-à-vis de la maladie et les espèces en cause (34, 35).

Aux USA, les CDC procurent des éléments d'aide au diagnostic des diverses espèces de *Plasmodium* pour la prise en charge de chaque type de paludisme : préparation des frottis et coloration, clichés de frottis avec diverses formes et stades de *Plasmodium* (48, 82). Le centre CDC dédié réalise une assistance 24 h/24 aux cliniciens pour la gestion des cas de suspicion de paludisme²⁷.

Au Royaume-Uni, des recommandations du Comité anglais de standardisation en hématologie (*British Committee for Standards in Haematology*) ont été élaborées pour encourager les laboratoires à adopter et maintenir le niveau de qualité appliqué aux techniques et de compétence du personnel pour le diagnostic biologique du paludisme (83). Le gouvernement, à travers le laboratoire national de référence du paludisme, tient aussi des guides à disposition²⁸. D'autres RBP britanniques à destination des médecins et autres professionnels de santé incluent des circuits de gestion des prélèvements pour évaluation de lames en centre spécialisé (84) ou préconisent la prise en charge de la femme enceinte et du nouveau-né (diagnostic et thérapeutique) par un centre expert du paludisme (78).

²⁷ CDC. Malaria Diagnosis & Treatment in the United States. 2015. http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/index.html.

²⁸ Malaria RL: reference, diagnostic and advisory services. 2007. <https://www.gov.uk/guidance/mrl-reference-diagnostic-and-advisory-services>.

Des programmes de contrôle de compétences ou de formation existent aussi dans ce domaine dans plusieurs pays, sous divers supports²⁹³⁰.

La présentation faite dans ce dernier paragraphe relève la difficulté des techniques d'identification directe au microscope mises en œuvre pour le diagnostic du paludisme, lorsque l'occurrence de la maladie est plus rare et l'expérience des professionnels moins aguerrie pour détecter et identifier *de visu* un parasite intraérythrocytaire. Ce paramètre a un impact décisionnel dans la stratégie diagnostique du paludisme décrite dans les RBP évaluées.

► Synthèse de l'évaluation des données de la littérature sélectionnée

Méthodes diagnostiques du paludisme préconisées

Concernant les examens de recherche directe (frottis sanguin, goutte épaisse et ICG)

Les données des dix RBP sélectionnées sont cohérentes avec la demande sur :

- l'urgence d'un diagnostic biologique du paludisme dont les résultats doivent être obtenus par les cliniciens entre 1 et 4 heures après le prélèvement sanguin ;
- la primauté de la recherche directe des parasites *Plasmodium* responsables du paludisme lors d'accès fébrile chez une personne revenant de zone d'endémie par techniques microscopiques :
 - par **frottis sanguin** qui permet l'identification d'espèce(s), l'évaluation de la parasitémie et des stades parasitaires ;
 - par la technique de **la goutte épaisse**, plus délicate à réaliser, dont l'intérêt réside dans sa plus grande sensibilité pour les très faibles parasitémies (échec de prophylaxie, sujet semi-immun) ;
- cinq RBP présentent l'association d'emblée des techniques microscopiques et de l'ICG pour poser le diagnostic, en particulier dans les situations les plus dangereuses : infections à *P. falciparum* et chez la femme enceinte ;
- six RBP sur les dix sélectionnées proposent la possibilité de faire appel à **la recherche d'antigènes plasmodiaux par ICG en première intention** :
 - soit par défaut, en absence de compétence immédiate et locale de microscopistes ;
 - soit avec l'objectif d'identification rapide d'une infection à *P. falciparum* ;
- les RBP confortent ainsi la proposition d'inscription de l'ICG à la NABM ;
- elles rejoignent également la demande sur le fait que la recherche des protéines plasmodiales par ICG ne peut constituer le seul examen permettant un bilan parasitaire complet de paludisme et qu'elle doit être complétée par une analyse microscopique, sur frottis sanguin au minimum.
 - toutefois, hormis la RBP française de 2007, les RBP sont en divergence en matière de stratégie diagnostique avec la demande qui ne positionne la technique d'ICG qu'en deuxième intention après la réalisation des deux techniques de lecture au microscope, d'abord sur frottis mince, puis par goutte épaisse.
- Les RBP sont homogènes avec la demande en ce qui concerne la non-pertinence à suivre le traitement par ICG (du fait de la persistance des protéines plasmodiales dans la circulation sanguine).

²⁹ CDC. Test Your Knowledge About Malaria. 2015

http://www.cdc.gov/malaria/references_resources/interactive_training/index.html

³⁰ IMT. Paludisme : l'IMT opte résolument pour l'élimination par la connaissance. 2013

<http://www.itg.be/itg/GeneralSite/Default.aspx?WPID=688&MIID=637&IID=279&L=F>

Concernant la recherche des anticorps (Ac) sériques

Seules deux des dix RBP examinent l'utilité de la recherche d'Ac sériques. Elles sont homogènes avec la demande, en ce qui concerne ses indications dans le paludisme : cet acte n'est pas à utiliser lors des situations d'urgence fébrile, mais dans deux autres indications en zone non endémique, le **diagnostic rétrospectif et les infections chroniques de personnes ayant séjourné en zone d'endémie**.

S'agissant des techniques utilisées pour cet acte, ces deux RBP ne mentionnent pas l'utilisation de la technique de l'électrosynérèse, ce qui va dans le sens de la demande, qui propose de supprimer cette technique de la NABM, pour obsolescence. Les RBP préconisent les **techniques immuno-enzymatiques et l'IFI**, également en cohérence avec la demande.

Conditions de réalisation du diagnostic biologique du paludisme

Les RBP sélectionnées pour cet aspect soulignent que la **compétence et la pratique du biologiste** sont fondamentales dans la réalisation du diagnostic microscopique du paludisme. Il ressort de cette analyse que ce paramètre a un impact décisionnel pour **la fiabilité des résultats et pour la stratégie diagnostique du paludisme** décrite par les RBP évaluées. Plusieurs recommandations fournissent des supports en ligne à l'intention des professionnels de santé et proposent des **circuits de transfert vers des centres spécialisés** (prélèvements ou patient) **pour l'examen microscopique et la confirmation diagnostique** ou la prise en **charge de la femme enceinte et du nouveau-né**.

3.2 Point de vue des parties prenantes sur les données concernant le diagnostic biologique du paludisme et sur l'analyse de la HAS

3.2.1 Parties prenantes sollicitées

Pour rappel, neuf organisations professionnelles ont été sollicitées par la HAS ; huit par un questionnaire et le CNR paludisme par une audition. La HAS a reçu les réponses argumentées au questionnaire de la part des sept parties prenantes suivantes sur les huit sollicitées :

- les Conseils nationaux professionnels d'anesthésie-réanimation (CNPAR) et d'infectiologie - Fédération française d'infectiologie (CNP-FFI) ;
- le Collège français de médecine d'urgence (CFMU) ;
- le Service de santé des armées, à travers l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA) ;
- les Sociétés de pathologie exotique (SPE), de biologie clinique (SFBC) et de médecine des voyages (SMV).

Les éléments de réponse apportés par l'ensemble des parties prenantes sur les problématiques du diagnostic biologique du paludisme sont synthétisés ci-dessous.

3.2.2 Synthèse de l'avis des parties prenantes sollicitées

Le questionnement a été segmenté par chapitres, chacun relatif à un type de techniques et comprenant plusieurs questions.

A / Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG),

Sept questions portaient sur la technique d'ICG, également dénommée « test TDR ». Il apparaît que pour **toutes les parties prenantes (PP)** consultées, cette technique a sa place dans la stratégie actuelle de diagnostic du paludisme, en particulier pour la détection de *P. falciparum*.

Les avantages rapportés sont la simplicité et la rapidité de réalisation des tests de détection antigénique du paludisme (SMV), avec des résultats indépendants de l'expérience du réalisateur (SFAR), ne nécessitant aucune spécialisation dans la recherche de *Plasmodium* et permettant dans certaines circonstances de débiter un traitement plus rapidement.

Les insuffisances relevées sont le caractère uniquement qualitatif du résultat et les performances analytiques différentes selon l'espèce recherchée (risque de faux positifs et de faux négatifs) : les mauvaises performances de détection de *P. malariae* et *P. ovale* sont notamment pointées. Dans l'idéal, l'ensemble des espèces devraient être détectées de manière discriminée en ICG (IRBA, SMV) et selon le CNR, des kits de détection de *P. malariae* et *P. ovale* aux performances analytiques améliorées sont attendus prochainement sur le marché.

- **L'ICG est placée en première ligne par trois PP**, dans tous les cas (SPE) ou dans les cas d'absence d'expertise spécialisée d'un laboratoire et pendant les gardes sans parasitologue (SMV, CNP-FFI). Toutefois, **l'ensemble des PP souligne que l'ICG ne doit pas devenir la seule technique à réaliser en cas de suspicion de fièvre palustre, car elle ne permet pas d'écartier un diagnostic de paludisme essentiellement par son manque de sensibilité.**
- C'est une technique d'appoint du biologiste pour affiner l'identification d'une espèce, parce qu'elle est rapide et facile à réaliser dans les conditions d'utilisation conformes au mode d'emploi (en 10 à 15 min, 21 min et jusqu'à 30 min pour une PP (SMV)).
- **L'ICG doit être utilisée en association avec au minimum la lecture d'un frottis sanguin (FS).** Celui-ci est nécessaire pour d'une part, confirmer l'espèce, et d'autre part, évaluer la parasitémie et les stades parasitaires, surtout pour *P. falciparum* (SPE). Selon le CNR, une recherche de paludisme associant conjointement un FS et une ICG couvre au moins 90-95 % des cas de paludisme rencontrés en France.

Les PP s'accordent sur le **choix de tests d'ICG ciblant au minimum deux Ag dont obligatoirement la protéine HRP-2** - parce qu'elle est spécifique de *P. falciparum* et de très bonne sensibilité - le deuxième Ag pouvant être une pLDH (pan) ou l'aldolase (pan), présentes dans toutes les espèces. **Ceci permet de faire en premier lieu la distinction entre *P. falciparum* et les autres espèces de *Plasmodium* pour une prise en charge thérapeutique adaptée.** Les mutations de la protéine HRP-2 identifiées récemment en Amérique du Sud et en Asie peuvent entraîner des faux négatifs pour cet Ag. Étant donné la primauté des souches africaines dans le paludisme d'importation en France, ce risque de faux négatif n'est pas à l'heure actuelle très prégnant (CNR) et la possibilité de détection par d'autres protéines pf pLDH (spécifique de *falciparum*) ou p LDH (pan) dans le kit est une réponse à ce risque.

Le biologiste médical doit exprimer les résultats d'une IGG Ag par Ag, avec l'interprétation correspondante.

Deux PP (CNR, SFBC) précisent que pour la recherche du paludisme, **le même laboratoire doit réaliser en parallèle les deux actes de première intention, c.-à-d. FS et ICG, pour fonder son interprétation sur les résultats obtenus par ces deux techniques** (en exprimant les résultats d'une IGG Ag par Ag, avec l'interprétation correspondante). Ceci permet de garder une cohérence et une garantie de qualité dans l'analyse des données pour établir le diagnostic biologique.

En réponse à la proposition de la demande sur deux situations précises de recours à une ICG, les justifications des PP sont les suivantes :

- l'utilité de recourir à une ICG après la détection de *Plasmodium* autres que *falciparum* par FS et/ou GE est rapportée par cinq des PP (CNP-FFI, SMV, SPE, SFBC et CNR) : un test ciblant au moins deux Ag permet d'identifier une co-infection par *P. falciparum* de faible parasitémie par la détection de l'Ag HRP-2 et/ou de corriger des confusions ou des doutes sur les formes morphologiques observées ;

- l'intérêt de réaliser la recherche d'antigènes par ICG après une recherche négative par FS et GE est réel, car elle peut être positive en cas de parasitémie faible après une prophylaxie ou un traitement mal conduits, grâce à une meilleure sensibilité dans ce contexte de paludisme décapité - surtout pour *P. falciparum* (SMV, CNR) - ou à cause d'une lecture microscopique inopérante liée à l'inexpérience du professionnel (SPE, IRBA, CFMU).

La proposition du CNR est de ne pas considérer l'ICG comme un acte isolé, mais comme une « technique complémentaire à l'examen microscopique ». Néanmoins, les deux conditions de mise en œuvre proposées par l'assurance maladie ne sont pas à spécifier, le recours à l'ICG devant être laissé à la discrétion du biologiste (situations de garde par un non-parasitologue, un interne, ...).

Les PP ont ajouté que **l'ICG n'a aucune place dans le suivi de l'efficacité thérapeutique d'un traitement antipaludique**, car les Ag, notamment HRP-2, persistent dans le sang plusieurs semaines après la destruction du parasite.

Le CNR a expliqué que la stratégie d'utilisation des TDR d'ICG ne peut être identique sur tout le territoire français, en particulier dans deux départements d'Outre-mer, la Guyane et Mayotte, connaissant des situations particulières : foyers d'endémie avec migrations de territoires transfrontaliers endémiques et zones isolées avec moyens insuffisants (pas de microscope / d'électricité). Ainsi, un décret spécifique publié en 2007 autorise la pratique de l'ICG par TDR par un professionnel non biologiste médical dans un centre de santé, la prise en charge financière ne relevant pas dans ce cas de la NABM (85). Cependant, l'utilisation de tests d'ICG peut rencontrer des difficultés d'interprétation particulières (antigénicité résiduelle d'un accès antérieur *versus* réinfection) dans ces zones (SMV, SPE, IRBA), et les TDR disponibles manquent de spécificité et de discrimination dans les zones d'infestation par *P. vivax* en Guyane (IRBA).

B / Techniques de recherche directe de *Plasmodium* au microscope : frottis sanguin mince et goutte épaisse

Les PP estiment que **le FS doit être réalisé systématiquement** et débuté, sans attendre les résultats d'un éventuel test d'ICG effectué par TDR. **Ainsi, pour une infection par *P. falciparum*, la valeur de parasitémie que seule la technique du FS est actuellement capable d'estimer, est indispensable** pour décider de la stratégie thérapeutique. Le FS permet également de visualiser les formes caractéristiques de chaque espèce de *Plasmodium* et les stades parasitaires asexués colonisant les hématies, indicateur important pour les cliniciens. Sa pratique est plus fréquente et plus facile pour les biologistes du fait de ses indications hématologiques, que celle de la GE. Cette dernière peut être débutée d'emblée (SMV, SPE) et/ou n'être lue que si le FS est négatif (IRBA, SMV).

Selon les PP interrogées, la qualité de réalisation de ces deux techniques dépend du niveau d'expertise du laboratoire : ces techniques sont en effet délicates, manuelles et exigent un entraînement régulier pour rester performant. Ceci est encore plus vrai pour la GE. Les temps de réalisation estimés sont respectivement (trois PP) :

- frottis sanguin mince : de 20 à 40 min (20 min minimum de recherche selon les recommandations françaises) ;
- goutte épaisse : 20 à 30 min.

Cependant, la SFBC précise que ces temps n'incluent pas la préparation (étalement, séchage) et que « *sur le plan technique, il est plus facile d'effectuer les colorations des gouttes épaisses au cours du 2^e temps de coloration des frottis (Giemsa)* ».

Un faible niveau d'expertise, lié à un enseignement universitaire insuffisant et à la faible prévalence des cas en France, peut engendrer de faux négatifs ou des erreurs d'espèces, très préjudi-

ciables pour une prise en charge adéquate et la sécurité du patient, surtout si la personne est atteinte par *P. falciparum*. Le CNR souligne que les centres spécialisés pour la maladie ont l'obligation de maintenir la réalisation de la GE et leur niveau de compétence sur cette technique, qui reste la plus sensible dans les délais de l'urgence (recours en cas de FS négatif par faible parasitémie). Il rappelle que le diagnostic du paludisme est une compétence inscrite dans les pré-requis professionnels du biologiste médical et fait partie des diagnostics d'urgence et insiste sur la possibilité pour les LBM de maintenir leur niveau d'expertise des deux techniques microscopiques, ou *a minima* du FS, grâce aux programmes spécifiques de certains organismes de formation, à la mise en place des échantillothèques préconisées pour le contrôle de qualité interne (CQI) quant à l'identification des espèces. Les dernières recommandations du Comité qualité (QUAMIC) de la Société française de microbiologie exposent les critères de qualité que les biologistes doivent appliquer, y compris la qualité des colorants et de la coloration elle-même (86).

Les PP estiment la recherche au microscope possible en 2 heures. Toutefois, en prenant en compte l'acheminement des prélèvements qui est souvent long (SMV, SPE, CNP-FFI, IRBA, SFAR), le délai global d'obtention des résultats diagnostiques est porté à 3 à 4 heures (SMV).

Les PP ajoutent que les techniques microscopiques permettent le suivi thérapeutique de façon quantitative, à répéter très fréquemment au début dans les atteintes graves, sinon à J3, J7 et J 28.

C / Techniques de biologie moléculaire (PCR)

La place actuelle des techniques d'amplification génique (PCR) est citée en deuxième ligne de la stratégie diagnostique du paludisme par les PP, dans des cas difficiles : dissociation clinico-biologique, discordance entre GE négative et ICG positive, suspicion d'infection pluri-espèces, parasitémie très faible de paludisme décapité avec problème d'identification d'espèce(s). Elles présentent « *une sensibilité supérieure aux techniques microscopiques* » (SFAR), mais restent réservées, vu la lourdeur de l'investissement et le coût, à des laboratoires spécialisés pour l'IRBA, la SMV, SFBC et la SPE. Il s'agit en revanche de la technique qui, faite dans de bonnes conditions, en cas de négativité, réfute un paludisme avec quasi-certitude (CNP-FFI, SMV, SPE, IRBA, CNR). La SPE et la SMV indiquent que de nouvelles techniques en temps réel sont commercialisées, d'utilisation facile de bonne sensibilité, ce qui « *permet d'envisager à moyen terme leur usage en routine, en complément des techniques microscopiques, notamment pour écarter avec certitude un diagnostic de paludisme dans le diagnostic des fièvres ou dans le cadre du don d'organe* » (SMV).

Le CNR précise que les techniques de PCR actuellement proposées pour *Plasmodium* ne sont pas quantitatives et n'identifient pas le stade³¹, comme la lecture microscopique qui demeure indispensable. Les pratiques sont encore non standardisées et l'interprétation des résultats positifs peut s'avérer délicate et nécessite un dialogue clinico-biologique approfondi. L'amplification génique est inscrite au RIHN, ce qui permet aux centres spécialisés de la réaliser en fonction de la pertinence dans chaque contexte individuel.

D / Recherche d'anticorps sériques

Pour les PP, les indications actuelles de la recherche d'Ac spécifiques de *Plasmodium* apparaissent limitées et réservées :

³¹ La note de commentaire du RIHN v2016 expose : « le caractère eucaryote de ces pathogènes rend souvent plus complexe ces approches moléculaires ».

- au diagnostic rétrospectif après un traitement antipaludique présomptif ou mal conduit d'un épisode fébrile en zone exposée (CFMU, SMV, SPE, CNR, SFAR) ;
- au diagnostic des formes chroniques de paludisme (SPE), pendant lesquelles la parasitémie est souvent trop faible pour être observée au microscope (CNR, IRBA).

Concernant les diverses techniques disponibles, les réponses obtenues indiquent que la technique d'électrosynérèse a été abandonnée devant le manque de standardisation des Ag utilisés (six PP). Les techniques immuno-enzymatiques sont recommandées par les six PP qui se sont prononcées, alors que l'IFI est préconisée par cinq (CNR, SMV, SPE, SFBC, CNP-FFI), mais considérée obsolète par l'IRBA.

Par ailleurs, les PP relatent que la recherche des Ac est aussi utilisée dans les tests de qualification biologique des dons de sang et de cellules hématopoïétiques recueillies dans la moelle osseuse et au criblage des dons d'organes.

E / Autres questions relatives au diagnostic du paludisme et commentaires divers

Selon les PP, en zone non endémique, les situations évocatrices d'un paludisme devant entraîner une investigation biologique sont :

- toute fièvre ou histoire de fièvre récente, ainsi que des symptômes fébriles, digestifs, pseudo-grippaux, un état confus chez un sujet ayant séjourné en zone endémique palustre, même plusieurs mois après son retour ; sur le plan biologique, une thrombopénie sans hyperleucocytose (CNR), une hyperbilirubinémie, des stigmates d'hémolyse (SFAR) ;
- toute fièvre avec thrombopénie et absence d'hyperleucocytose pour un sujet vivant à proximité d'un aéroport ou d'un port (SMV) ;
- l'exploration en seconde ligne d'une fièvre sans cause déterminée (SPE, CNR) ;
- par ailleurs, personne avec antécédent de paludisme d'une espèce autre que *falciparum* (IRBA).

Les pratiques actuelles de stratégie diagnostique en urgence semblent différer en fonction des organisations sanitaires et des compétences locales (présence d'un parasitologue ou non), mais les trois méthodes (FS, GE et ICG) sont citées, et « *chacune des techniques frottis, goutte épaisse et ICG sont nécessaires et se complètent mutuellement. Elles participent ensemble à un diagnostic le plus exact possible dans un délai le plus court possible* », selon la SFBC. Les PP précisent que les tests de parasitologie sont à refaire dans les 12 à 24 heures suite à un résultat négatif et en l'absence de diagnostic alternatif.

Dans le cas d'une suspicion de paludisme chez une femme enceinte, l'ICG est intéressante car les parasites de *P. falciparum* sont séquestrés dans le placenta et ne sont donc pas visibles au microscope dans un échantillon de sang périphérique (IRBA, SMV). Le CNR relate que le nombre de cas annuels de paludisme en France chez des femmes enceintes est faible (environ 30) et qu'en plus la transmission verticale est exceptionnelle. À l'accouchement, la recherche microscopique du parasite est à réaliser à partir du placenta (après apposition sur lame et coloration) et du sang du cordon (IRBA, SMV). Chez le nouveau-né, un suivi sanguin (à la naissance, J4 et J14) s'impose par microscopie et en ICG (SMV), surtout lorsque la mère est « naïve » pour le paludisme, en distinguant « le paludisme congénital asymptomatique (hématies infectées de la mère) du rare paludisme congénital symptomatique (enfant infecté) » (SMV). Toute fièvre chez un nouveau-né dans ce contexte doit faire évoquer le paludisme et le biologiste médical, averti, doit être vigilant dans son analyse de l'ensemble du bilan biologique (CNR).

Pour la SPE, le CNP-FFI et la SMV, « *il serait également souhaitable de recommander qu'en France métropolitaine l'obligation soit faite pour les laboratoires souhaitant inscrire la recherche de paludisme dans leur catalogue (document obligatoire en termes d'accréditation) de pouvoir réaliser*

les 3 examens (FS, GE, TDR) et d'être habilité pour le rendu et l'interprétation des résultats (réalisation régulière de contrôle de qualité), ou sinon, de disposer d'un circuit accrédité permettant de transmettre le prélèvement en urgence vers un centre habilité pour une telle recherche ».

À titre d'information, la SMV, l'IRBA et le CNR signalent que la SPILF a mandaté un groupe de travail pour actualiser ses recommandations de 2007 (49) sur la prise en charge du paludisme d'importation, et que le texte court, qui comprend notamment un chapitre sur le diagnostic, devrait être disponible fin 2016 - début 2017 et refléter les positions présentement exprimées³².

Il est à noter que l'argumentaire (provisoire daté du 12/07/2016) de la HAS n'a pas fait l'objet de critiques engendrant des modifications de son contenu quant à l'analyse de la littérature synthétique, qui est considérée comme complète, cohérente et objective par l'ensemble des PP.

► Conclusions du point de vue des PP

Au total, les positions des parties prenantes s'avèrent être globalement homogènes entre elles pour le diagnostic biologique du paludisme permettant d'énoncer les points conclusifs suivants :

La consultation est en faveur de l'inscription de la technique d'immunochromatographie (ICG) de recherche des protéines plasmodiales dans le sang :

- en France, les tests d'ICG utilisés doivent permettre de détecter en premier lieu une infection à *P. falciparum* grâce au choix des antigènes plasmodiaux ciblés, comprenant obligatoirement **la protéine HRP-2 spécifique de *P. falciparum* et au moins un autre Ag commun aux cinq espèces** ;
- cette technique (ICG), même en biologie d'urgence, **ne peut suffire seule à faire le diagnostic biologique. C'est un acte complémentaire de l'examen direct du sang au microscope sur frottis mince, qui doit être réalisé en parallèle et dans le même laboratoire**, et, lorsque cela est réalisable, en goutte épaisse, car **ces deux techniques microscopiques demeurent la référence pour ce diagnostic d'urgence, en fournissant des éléments cliniquement importants (espèce(s), valeur de parasitémie, stades parasitaires asexués)** ;
- une recherche de paludisme associant conjointement un FS et une ICG (choisie selon les critères énoncés ci-dessus) permet de couvrir au moins 90-95 % des cas de paludisme rencontrés en France métropolitaine. Si nécessaire, en cas de difficulté / doute diagnostique, le laboratoire peut adresser un échantillon à un laboratoire spécialisé afin de procéder dans les meilleurs délais à une recherche par une technique plus sensible (goutte épaisse, PCR) ;
- afin de faciliter le dialogue clinico-biologique, l'interprétation d'un bilan diagnostique doit être fournie en détaillant les résultats obtenus par chaque technique et par ICG, pour chaque Ag recherché ;
- le délai global d'obtention des résultats d'un diagnostic au microscope est **de 3 à 4 heures**, en prenant en compte **l'acheminement des prélèvements qui est souvent long** ;
- dans les zones isolées d'endémie qui persistent dans les DOM de Guyane et de Mayotte, la réglementation dispose d'une utilisation spécifique de tests d'ICG en diagnostic d'urgence. L'ICG peut y rencontrer des difficultés d'interprétation particulières (antigénicité résiduelle *versus* réinfection) ;
- la pratique de la goutte épaisse connaît un déclin trouvant son origine dans l'insuffisance de l'enseignement hospitalo-universitaire, mais surtout dans le caractère limité de son utilisation en routine et la difficulté de sa pratique manuelle, qui nécessite un entraînement

³² A la date de validation de l'argumentaire, ces recommandations ne sont pas encore publiées.

régulier et du temps dédié ; toutefois, **la GE doit être maintenue, en particulier dans la compétence des laboratoires spécialisés, du fait de sa grande sensibilité** ;

- **l'ICG n'a aucune place dans le suivi de l'efficacité thérapeutique** d'un traitement anti-paludique, qui est réalisé quantitativement par techniques microscopiques, très fréquemment à l'initiation dans les affections graves, et jusqu'à J28 du traitement.

Les caractéristiques et le niveau d'investissement élevé des techniques actuelles de biologie moléculaire (PCR) ne permettent pas d'envisager leur utilisation en pratique courante et les réservent aux laboratoires spécialisés.

La recherche d'anticorps sériques spécifiques du genre *Plasmodium*, bien que rare, est nécessaire en dehors de l'urgence, **au diagnostic rétrospectif après traitement présomptif et aux formes chroniques**, comme le paludisme viscéral évolutif. Cet acte est réalisable par techniques immuno-enzymatiques et d'immunofluorescence, alors que l'électrosynérèse est obsolète.

4. Discussion et conclusions

Dans le cadre de l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS) a sollicité, en septembre 2015, l'avis de la HAS sur la révision de la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) concernant trois actes de diagnostic du paludisme, dont les agents infectieux sont des parasites hématozoaires du genre *Plasmodium* (cinq espèces pour l'homme).

Suite à cette demande, la HAS a évalué les principaux examens de biologie médicale pouvant concourir au diagnostic et au suivi du paludisme : les techniques microscopiques (FM et GE), la recherche des protéines plasmodiales par ICG, la recherche des Ac sériques et l'amplification génique.

Cette évaluation a consisté en une analyse critique de la littérature synthétique identifiée suite à une recherche systématique, puis sélectionnée sur des critères explicites, ainsi qu'au recueil de la position argumentée des organismes professionnels, interrogés comme parties prenantes.

Deux contextes cliniques ont été mis en évidence dans cette évaluation :

► **L'urgence diagnostique dans un contexte clinique d'accès fébrile de retour, récent ou depuis quelques mois, d'une zone d'endémie palustre.**

Cette parasitose peut être mortelle par défaut d'identification et d'une prise en charge adéquates en urgence, en présence d'une infection à *P. falciparum* (neuropaludisme) qui constitue 87 % des cas diagnostiqués en France métropolitaine, avec une répartition assez ubiquitaire sur le territoire. Avec 5 000 cas annuels, la France est de loin le premier pays occidental en matière de paludisme d'importation, en majorité d'Afrique où sévit principalement *P. falciparum*, et en augmentation régulière, ce qui justifie l'exigence d'un niveau de qualité élevé pour un diagnostic biologique en urgence.

Dans ce contexte, seules sont actuellement inscrites à la NABM les techniques microscopiques dans un seul libellé : « recherche des hématozoaires (*Plasmodium*) sur frottis et en goutte épaisse ». Or, ces techniques microscopiques représentent un travail manuel de préparation, une lecture visuelle, longue, difficile sans entraînement régulier, surtout pour la goutte épaisse utilisée uniquement en parasitologie. De plus, le diagnostic peut être sollicité par des cliniciens lors de périodes de garde non couvertes par un biologiste expert en parasitologie. Aussi, l'assurance d'une compétence dans un LBM pour l'identification d'un paludisme n'est pas toujours garantie.

Les données recueillies au cours de cette évaluation rapportent que la technique d'immunochromatographie (ICG) de recherche de protéines plasmodiales dans le sang fait partie des outils de la stratégie diagnostique actuelle de l'identification d'un paludisme (détection et caractérisation d'espèces, surtout les plus fréquentes, *P. falciparum*, la plus dangereuse, et *P. vivax*). Des avantages pratiques (gain de temps, plus grande facilité de mise en place sans procédure d'assurance qualité distincte ni expertise spécifique, lecture objective des résultats) sont liés à l'utilisation d'une technique d'ICG, qui se présente en tests commercialisés.

Sur la base de cette évaluation, la HAS conclut que :

En situation d'urgence, la recherche d'une infection palustre est réalisée par une technique microscopique, par frottis sanguin mince en premier lieu - car, ayant également des indications en hématologie, il est souvent mieux maîtrisé par les laboratoires polyvalents - et si nécessaire par goutte épaisse. En cas d'infection par *P. falciparum*, la quantification de la parasitémie effectuée sur frottis sanguin (ou GE) est indispensable, afin de débiter un traitement curatif adapté selon le taux de contamination sanguine.

En complément, peuvent être recherchées les protéines plasmodiales dans le sang par technique d'ICG. Dans ce cas, la préparation de l'examen microscopique et l'ICG doivent être débutés de façon simultanée, sans préjudice des résultats de l'autre analyse. En France, il convient de réaliser

des tests d'ICG (TDR) ciblant au moins deux antigènes plasmodiaux, dont obligatoirement la protéine HRP-2, spécifique de *P. falciparum* et de très bonne sensibilité, et un autre Ag commun aux cinq espèces de *Plasmodium*, pour permettre de détecter les parasites, en discriminant en premier lieu une infection à *P. falciparum*.

Le délai d'obtention des résultats d'un diagnostic de paludisme ne doit pas dépasser 3 à 4 heures. Dans son interprétation d'un bilan diagnostique, le biologiste médical doit détailler dans le compte rendu les résultats de chaque technique (et pour l'ICG, antigène par antigène) afin de faciliter le dialogue clinico-biologique.

Si nécessaire, en cas de difficulté / doute diagnostique, un recours à une technique plus sensible (GE, PCR) a lieu, le cas échéant en adressant un échantillon à un laboratoire spécialisé, afin de procéder dans les meilleurs délais à cette recherche. La technique de la GE, qui présente une très bonne sensibilité, doit être maintenue dans l'arsenal biologique, principalement des laboratoires experts du paludisme. Les techniques actuelles de biologie moléculaire n'ont pas encore leur place en pratique courante et sont à réserver aux laboratoires spécialisés.

La prise en charge diagnostique d'une suspicion de paludisme chez une femme enceinte et d'un nouveau-né est à préconiser dans un centre ayant une expertise dans le paludisme (le nombre de ces cas est très faible en France, de l'ordre de 30 par an selon le CNR). L'ICG ciblant *P. falciparum* présente un intérêt renforcé chez la femme enceinte, parce que le parasite peut être absent du sang périphérique et séquestré dans le placenta. Pour cette même raison, la recherche du parasite en microscopie n'est pas limitée au sang périphérique (mère et nouveau-né), mais s'étend au placenta, au sang placentaire et au sang du cordon. La surveillance clinique et en parasitologie du nouveau-né est répétée lors du premier mois.

La recherche de protéines plasmodiales dans le sang par ICG n'a pas d'utilité dans le suivi du traitement antimalarique, qui est à réaliser par une méthode quantitative, comme le frottis sanguin.

À titre complémentaire, il est préconisé que les LBM métropolitains maintiennent un niveau d'expertise sur la recherche de *Plasmodium* par technique microscopique, en particulier sur le frottis sanguin, utilisé dans diverses indications non parasitaires, et ce, grâce aux programmes spécifiques de certains organismes de formation et aux contrôles de qualité internes et externes maintenant en place.

► La recherche du paludisme hors des situations d'urgence constitue une autre situation diagnostique.

Parce que l'immunité spécifique ne s'établit que tardivement, après l'épisode fébrile, la recherche d'anticorps sériques contre les *Plasmodium* n'est pas utilisée en situation d'urgence diagnostique. Cette recherche trouve néanmoins sa place dans le diagnostic des formes chroniques de paludisme, notamment le paludisme viscéral évolutif, et pour le diagnostic rétrospectif (après traitement présomptif).

Les données recueillies montrent que les techniques utilisées actuellement sont l'IFI et l'ELISA (dans une moindre mesure en France), et que la technique d'électrosynérèse (ELS) n'est plus utilisée car obsolète. La HAS confirme la possibilité de supprimer de la NABM la technique d'ELS de recherche d'Ac qui semble obsolète.

D'autres indications de la recherche d'Ac de *Plasmodium* ne relèvent pas de l'inscription à la NABM (qualification biologique des dons de sang, d'organes ou cellules, recherche clinique, épidémiologie).

Annexe 1. Recherche documentaire

Bases de données bibliographiques automatisées

- Medline (National Library of Medicine, États-Unis) ;
- The Cochrane Library (Wiley Interscience, États-Unis) ;
- BDSP Banque de Données en Santé Publique ;
- Science Direct (Elsevier) ;
- National Guideline Clearinghouse (Agency for Healthcare Research and Quality, États-Unis) ;
- HTA Database (International Network of Agencies for Health Technology Assessment).

Tableau 10. Stratégie de recherche documentaire

Type d'étude / sujet / Termes utilisés		Période de recherche	Nombre de références
Recommandations			
Étape 1	"Malaria/diagnosis"[Mesh] OR OR "Malaria, Cerebral/diagnosis "[Mesh] OR "Malaria, Falciparum/diagnosis "[Mesh] OR "Malaria, Vivax/diagnosis "[Mesh] OR [("Aldehyde-Lyases/blood"[Mesh] OR "L-Lactate Dehydrogenase/blood"[Mesh]) AND "Malaria "[Mesh]] OR [(Malaria or falciparum or plasmodium) AND (diagnos* or test*)]	01/2000-04/2016	
ET			
Étape 2	Guidelines as Topic[Majr] OR Practice Guidelines as Topic[Majr] OR Guideline[Publication Type] OR "Standard of Care"[Mesh] OR "Consensus"[Majr] OR "Consensus Development Conferences as Topic"[Majr] OR "Consensus Development Conferences, NIH as Topic"[Majr] OR "Consensus Development Conference, NIH" [Publication Type] OR "Consensus Development Conference" [Publication Type] Or consensus OR guideline* OR recommend* Field: Title		48
Méta-analyses, revues systématiques			
Étape 1		01/2000-04/2016	
ET			
Étape 3	"Meta-Analysis as Topic"[Mesh] OR "Meta-Analysis "[Publication Type] OR "Review Literature as Topic"[Mesh] OR "Meta Analysis" OR "systematic Review" OR "Literature review" Or "Quantitative Review" OR "pooled analysis" Field: Title/Abstract		62
Qualité des tests diagnostiques			
Étape 1		01/2000-04/2016	
ET			

Étape 4	Sensitivity and Specificity[Majr] OR Predictive Value of Tests[Majr] OR False Negative Reactions[Majr] OR False Positive Reactions[Majr] OR Diagnostic Errors[Majr] OR Observer Variation[Majr] OR Reproducibility of Results[Majr] OR Reference Standards[Majr] OR quality control[Majr] Or quality control Or false-positive OR false negative OR sensitivity or specificity or observer Or performance OR quality assurance [title]		172
Nombre total de références obtenues :			282

Une recherche complémentaire de recommandations portant sur la prise en charge du paludisme dans les pays non endémiques, avec des thématiques / mots clés supplémentaires, a été conduite dans *Medline* : 27 références supplémentaires ont été obtenues.

Les organismes européens ont été contactés afin de colliger les recommandations officielles nationales n'ayant pas fait l'objet de publications disponibles dans des revues scientifiques.

Une veille bibliographique a été maintenue sur le sujet jusqu'au terme du dossier.

En complément, les sommaires des revues suivantes ont été dépouillés tout au long du projet : *Annals of Internal Medicine, Archives of Internal Medicine, British Medical Journal, Canadian Medical Association Journal, JAMA, Lancet, New England Journal of Medicine, Presse Médicale.*

Les sites internet internationaux des sociétés pertinentes cités ci-dessous ont été explorés en complément des sources interrogées systématiquement :

Adelaide Health Technology Assessment

Agencia de Evaluación de Tecnología e Investigación Médicas de Cataluña

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Galicia

Agency for Healthcare Research and Quality

Agency for Healthcare Research and Quality / National Quality Measures Clearinghouse

Agency for Healthcare Research and Quality / Patient Safety Network

Alberta Heritage Foundation for Medical Research

American College of Physicians

American Medical Association

Australian Government - Department of Health and Ageing

Blue Cross Blue Shield Association - Technology Evaluation Center

Bibliothèque médicale Lemanissier

Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health

Centers for Disease Control and Prevention

California Technology Assessment Forum

Centre de national de référence du Paludisme,

Centre fédéral d'expertise des soins de santé

CISMeF (CHU Rouen)

CMAInfobase

Collège des Médecins du Québec

Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales
Cochrane Library Database
Centre for Review and Dissemination databases
Developpement et santé (ex Ledamed)
Department of Health (UK)
ECRI Institute
Evaluation des Technologies de Santé pour l'Aide à la Décision)
European commission
European Centre for Disease Prevention and Control,
Euroscan
GIN (Guidelines International Network)
Haut conseil de la Santé Publique
Haute Autorité de santé
Horizon Scanning
Institute for Clinical Systems Improvement
Institut National d'Excellence en Santé et en Services Sociaux
Institut scientifique de santé publique
Institut de veille sanitaire / Santé publique France
Instituto de Salud Carlos III / Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias
Iowa Healthcare collaborative
Malariasite
National Coordinating Centre for Health Technology Assessment
National Horizon Scanning Centre
National Health and Medical Research Council
National Health committee
National Institute for Health and Clinical Excellence
National Institutes of Health
National institute for Infectious Diseases,
New Zealand Guidelines Group
Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias OSTEBA
Ontario Health Technology Advisory Committee
Public Health Agency of Canada
Scottish Intercollegiate Guidelines Network
Singapore Ministry of Health
Société de pathologie infectieuse de langue française
Société de pathologie exotique
Société de réanimation de langue française

Société française de médecine des Voyages

Tripdatabase

West Midlands Health Technology Assessment Collaboration

World Health Organization

Annexe 2. Liste des tableaux, graphiques, organigrammes, schémas, etc.

Tableau 1. Recommandations françaises de chimioprophylaxie du paludisme 2016 chez l'adulte et l'enfant (BEH du 31 mai 2016, Paludisme tableau 6).....	13
Tableau 2. Molécules utilisée dans le traitement curatif du paludisme en France.....	14
Tableau 3. Type d'antigènes de <i>Plasmodium</i> utilisables dans la technique ICG (TDR).....	17
Tableau 4. Différents types de TDR disponibles selon l'OMS (technique ICG sur Ag plasmodiaux)	19
Tableau 5. Actes de diagnostic du paludisme remboursés par la CNAMTS	23
Tableau 6. Résultats comparés d'identification d'espèces plasmodiales sur frottis sanguin dans le cadre du CNQ.....	24
Tableau 7. Stratégie d'interrogation documentaire dans les bases et résultats.....	27
Tableau 8. Organismes professionnels contactés pour les consultations de parties prenantes	29
Tableau 9. Recommandations de bonne pratique relatives aux méthodes diagnostiques du paludisme	31
Tableau 10. Stratégie de recherche documentaire	45
Tableau 11. Analyse sur critères méthodologiques des publications (recommandations de bonne pratique) portant sur les tests diagnostiques d'infection par un Plasmodium	51

Annexe 3. Grille d'évaluation AGREE II-GRS*

Méthode d'élaboration des recommandations*
Domaines de spécialité des auteurs et compétence en méthodologie ? Recherche bibliographique systématique et exhaustive bien décrite ? Pertinence des grilles d'évaluation utilisées pour estimer le corpus d'évidences scientifiques du document (niveau de preuve formulé par question clinique et non par étude originale) ? Adéquation du corpus d'évidences avec le grade de recommandation retenu ? Exhaustivité des critères de jugement retenus ?
Clarté de présentation des recommandations
Compréhension rapide du lecteur concernant l'information utile du document ? Hiérarchisation évidente des stratégies pour le lecteur ?
Qualité de l'argumentaire scientifique
Transparence et reproductibilité du travail et de ses conclusions ? Prise en compte de la position de l'ensemble des parties prenantes concernées ?
Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique
Démonstration évidente de son utilité en vie réelle ? La population cible est-elle pertinente ?

* traduction libre de l'anglais : AGREE Research Trust. AGREE II-Global rating scale (AGREE II-GRS) Instrument [En ligne] 2013 (73)

Annexe 4. Tableau 11. Analyse sur critères méthodologiques des publications (recommandations de bonne pratique) portant sur les tests diagnostiques d'infection par un *Plasmodium*

Qualité méthodologique du document (recommandations)	Préconisations des auteurs	Commentaires
Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à <i>Plasmodium falciparum</i> : recommandations pour la pratique clinique 2007 (Révision de la conférence de consensus 1999). Société de pathologie Infectieuse (2)(SPILF), 2007, France		
<p>Méthode d'élaboration : établie selon une méthode de consensus avec Groupes multidisciplinaires de travail et de lecture.</p> <p>Clarté de présentation : bonne, gradation de chaque élément de recommandation. Bibliographie disponible (385 références).</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : algorithme de stratégie diagnostique présenté.</p> <p>Pertinence et applicabilité pour la pratique : bonne mais recommandations anciennes, élaborées avant le programme de pré-qualification de l'OMS sur les TDR</p>	<p><u>Diagnostic initial</u> : délai de diagnostic inférieur à 2 heures.</p> <p>« La démarche diagnostique idéale devrait associer la réalisation des examens microscopiques (frottis sanguin <u>et</u> goutte épaisse), suivie si nécessaire par un test rapide (HRP-2 + pLDH), afin de compenser l'absence de technique de référence. Cependant, elle ne doit pas faire retarder la mise en route du traitement spécifique dans un contexte clinique grave et épidémiologique évocateur ».</p> <p>En cas de recherche microscopique négative, refaire un prélèvement et un examen 6 à 12 heures après.</p> <p>« La positivité de la recherche d'antigène HRP-2 est un élément utile au diagnostic, y compris pour un diagnostic rétrospectif plusieurs jours après la mise sous traitement spécifique d'un patient fébrile ».</p> <p>La méthode de référence dans le cas de frottis et goutte épaisse négatifs, d'antigénémie positive et de forte suspicion de paludisme, est actuellement la PCR, méthode la plus sensible et dont la valeur prédictive négative est très élevée (mais réservée à des laboratoires spécialisés, avec difficulté de rendre les résultats en moins de 2 h).</p> <p><u>Suivi des patients</u> : la surveillance sous traitement est faire par frottis – goutte épaisse à J3, J7 et J28.</p> <p>PCR pas utilisable encore en routine, réservée aux cas complexes.</p>	<p>Financement et liens d'intérêts non présentés.</p> <p>Ne hiérarchise pas l'ordre de réalisation du frottis sanguin et de la goutte épaisse mais indique que les biologistes doivent suivre une formation continue sur ce diagnostic : en effet, en 2006 seuls 40 % des laboratoires français pratiquent la goutte épaisse (GE**).</p> <p>Positionnement des tests de recherche d'antigènes uniquement en 2^e intention en cas de doute diagnostique ou de traitement antipaludique préalable.</p>
Management of imported malaria in Europe. European Society for Clinical Microbiology and infectious Diseases Study group on Clinical Pathology EU (12), 2012		
<p>Méthode d'élaboration des recommandations : aucune précision, auteurs de la société savante européenne, issus de 12 pays européens.</p> <p>Modalités de financement et liens d'intérêts</p>	<p><u>Diagnostic initial*</u> : examen au microscope de frottis sanguin (frottis mince <u>et</u> goutte épaisse colorés au Giemsa).</p> <p>Un test rapide TDR peut être utilisé, si l'examen microscopique n'est pas disponible initialement ou utilisation</p>	<p>Positionne clairement la place des tests TDR d'ICG en première étape, par impossibilité de l'examen au microscope ou en complément.</p>

Qualité méthodologique du document (recommandations)	Préconisations des auteurs	Commentaires
<p>indiqués.</p> <p>Clarté de présentation des recommandations : moyenne, narrative (recommandations non gradées).</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : objectif déclaré de pragmatisme dans la prise en charge des patients, mais pas d'argumentaire basé sur la preuve.</p> <p>Bibliographie disponible.</p> <p>Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique : indiqué à l'usage des médecins non spécialistes, indications et population cible définies.</p>	<p>en parallèle, mais un suivi par microscopie est essentiel. Utilisation en parallèle possible.</p> <p>Trois recherches journalières successives (microscope et TDR) sont nécessaires avant d'exclure le paludisme.</p> <p><i>Si le TDR est négatif malgré une forte suspicion de paludisme et que la microscopie n'est pas possible, le patient sera transféré vers un centre expert pour cet examen.</i></p> <p><i>PCR non utilisable en routine.</i></p> <p><u>Suivi après le diagnostic</u> : frottis mince et goutte épaisse journaliers colorés au Giemsa. Si la compétence n'est pas présente, le patient sera transféré à un niveau permettant cet examen.</p>	<p>Indique que la sensibilité diagnostique au microscope est liée à l'expertise du lecteur.</p> <p>Pour <i>P. falciparum</i> indique que la sensibilité des TDR est de 100 %, jusqu'à 200 parasites / μl. Un phénomène de prozone négativant un TDR est possible pour une parasitémie élevée.</p> <p>Indique que le frottis permet mieux l'identification d'espèce que la GE*.</p> <p>Le transfert de patient atteint de paludisme vers un centre pouvant évaluer la parasitémie est préconisé.</p>
<p>Recommandations canadiennes pour la prévention et le traitement du paludisme (malaria) chez les voyageurs internationaux (CATMAT). Agence de santé publique du Canada (8), 2014</p>		
<p>Méthode d'élaboration : précisions sur la méthode d'élaboration : basée sur la médecine fondée sur les preuves.</p> <p>Modalités de financement indiquées et information sur les liens d'intérêts.</p> <p>Clarté de présentation : bonne, gradation de chaque élément de recommandation. Algorithme de stratégie de prise en charge. Bibliographie disponible.</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : bonne qualité méthodologique des recommandations.</p> <p>Classification : catégorie A : données suffisantes pour recommander l'utilisation.</p> <p>catégorie B : données acceptables pour recommander l'utilisation.</p> <p>I : données obtenues dans le cadre d'au moins un essai comparatif convenablement randomisé.</p> <p>II : données obtenues dans le cadre d'au moins un essai clinique bien conçu, sans randomisation,</p>	<p><u>Diagnostic initial</u> : un échantillon de sang devrait être transmis immédiatement pour un examen de détection du paludisme, si l'on soupçonne le paludisme. Si personne de compétent ne peut lire les frottis, on devrait avoir recours à une ICG par TDR pour le diagnostic et transmettre rapidement un échantillon de sang à un centre de référence.</p> <p>Le résultat du TDR ou du frottis sanguin initial devrait être disponible dans les deux heures suivant le prélèvement de sang (classé A III).</p> <p>Les résultats des TDR (tant positifs que négatifs) doivent être vérifiés par microscopie spécialisée ou PCR pour déterminer l'ampleur de la parasitémie et identifier l'espèce. Il est essentiel de connaître les concentrations du parasite dans le sang pour prendre en charge le patient atteint de paludisme à <i>P. falciparum</i> (classé A II).</p> <p>Les TDR sont des outils diagnostiques essentiels dans les régions du Canada où l'on ne peut obtenir les résultats de la microscopie pour le paludisme en moins de 2 h (classé B III).</p> <p>En cas de suspicion : réaliser immédiatement un frottis sanguin (et une GE), un test de diagnostic rapide, un hémogramme, une hémoculture, un dosage des enzymes</p>	<p>Positionne clairement la place des tests TDR d'ICG en première intention (par défaut).</p> <p>Relate la nécessité d'une expérience / expertise pour les examens au microscope, en particulier la GE : « Si le laboratoire n'est pas en mesure d'effectuer un frottis sanguin avec la technique de la goutte épaisse, il est quand même préférable d'effectuer un frottis mince ». Un diagnostic précoce et la mise en route rapide d'un traitement approprié sont des facteurs qui ont une incidence sur la survie des patients infectés par <i>Plasmodium falciparum</i>.</p> <p>Indique que les nouvelles méthodes de PCR devraient améliorer leur accessibilité.</p>

Qualité méthodologique du document (recommandations)	Préconisations des auteurs	Commentaires
<p>d'études de cohorte ou cas-témoins.</p> <p>III : opinions exprimées par des experts dans le domaine et reposant sur l'expérience clinique.</p> <p>Pertinence et applicabilité pour la pratique : document spécifique du paludisme du voyageur, complet, étayé.</p>	<p>hépatiques.</p> <p>Si le frottis initial est négatif et que les symptômes persistent, il faut refaire le frottis au moins deux fois dans les 12 à 24 heures suivantes</p>	
<p><i>Guidelines for malaria prevention in travellers from the UK 2015. (78), 2015, Royaume-Uni</i></p>		
<p>Méthode d'élaboration : groupe de travail du <i>Public Health England Advisory Committee for Malaria Prevention for UK Travellers</i> et sous-groupe <i>Advisory Committee on Malaria Prevention</i>.</p> <p>Basée sur l'actualisation de la littérature de médecine de preuve.</p> <p>Financement et liens d'intérêt indiqués.</p> <p>Clarté de présentation : moyenne, narrative (recommandations non gradées).</p> <p>Bibliographie disponible.</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : moyenne, par manque de gradation.</p> <p>Pertinence et applicabilité pour la pratique : document didactique, à destination des cliniciens, aides proposées en ligne.</p>	<p><u>Diagnostic initial*</u> : les cas suspects de paludisme doivent être dépistés par un frottis sanguin à réaliser en urgence. Un seul frottis sanguin ou une ICG par TDR négatifs n'excluent pas le diagnostic de paludisme.</p> <p>En cas de suspicion clinique, refaire des frottis tous les 12-24 heures pendant 3 jours en diagnostic différentiel. Si la négativité persiste malgré des signes évocateurs, faire appel à un spécialiste des maladies tropicales ou infectieuses.</p> <p>Les TDR ne sont pas un substitut aux examens microscopiques dans la pratique britannique, mais ils ont un rôle utile en complément aux tests de recherche directe par microscopie.</p> <p><u>Femme enceinte</u> : gestion des cas par spécialistes préconisée, car le diagnostic du paludisme à <i>P. falciparum</i> pendant la grossesse est particulièrement difficile en raison de la séquestration dans le placenta.</p>	<p>La RBP conseille de consulter le site de l'OMS relatif à son programme de pré-qualification pour éclairer la décision avant d'acheter des TDR.</p> <p>Le recours à des conseils spécialisés pour la prise en charge précoce des patientes enceintes avec suspicion de paludisme est indiqué comme primordial, car le parasite peut être séquestré dans le placenta : les parasites peuvent ne pas être détectables dans les frottis de sang périphérique.</p>
<p><i>Guidelines for the treatment of malaria. (4), OMS, 2015, Suisse</i></p>		
<p>Méthode d'élaboration : principes et processus détaillé (PICO, gradation avec échelle GRADE si possible, revue par groupe Cochrane spécialiste des maladies infectieuses (Liverpool)), gradation de la qualité des preuves.</p> <p>Modalités de financement indiquées (OMS) et information sur les liens d'intérêts.</p> <p>Clarté de présentation : bonne pour la recommandation principale, moyenne pour l'ensemble narratif.</p>	<p><u>Diagnostic initial*</u> : tous les cas de suspicion de paludisme doivent être confirmés par un test de parasitologie (microscope ou TDR), obtenu en moins de 2 heures (consensus d'experts, assertion de bonne pratique).</p> <p>Les deux techniques doivent être effectuées dans un cadre répondant à un système d'assurance qualité.</p> <p>Devant un résultat positif à un test diagnostic rapide, le résultat devrait être confirmé par examen microscopique ou amplification génique. Face à des symptômes sévères, la recherche au microscope est recommandée pour définir, l'espèce et évaluer des facteurs pronostiques, comme la</p>	<p>Le document fournit en annexe un tableau d'éléments de contexte à prendre en compte pour décider des techniques diagnostiques à entreprendre pour la microscopie et les TDR.</p> <p>Dans les régions à forte prévalence de <i>P. vivax</i>, sans accès au microscope, des TDR ciblant l'antigène spécifique (pLDH <i>vivax</i>) et/ou pan-antigéniques (aldolase et pan</p>

Qualité méthodologique du document (recommandations)	Préconisations des auteurs	Commentaires
<p>Qualité de l'argumentaire scientifique : bonne, basée sur revues systématiques pour les performances des TDR.</p> <p>Pertinence et applicabilité pour la pratique : il faut prendre en considération par ailleurs les multiples autres publications de l'OMS dédiées et complémentaires, ciblées par technique, contexte endémique.</p>	<p>parasitémie et les stades parasitaires présents. Mais l'utilisation d'un TDR permet une confirmation rapide et l'initiation du traitement.</p> <p>En cas de recherche directe négative chez un patient présentant une forte probabilité de paludisme, de nouvelles recherches (microscope ou TDR) sont à mener à 6 à 12 h d'intervalle.</p> <p><u>Suivi des patients</u> par examen à réaliser au microscope. Face à une maladie sévère ce suivi (parasitémie) sera rapproché : toutes les 12 h les 2-3 premiers jours de traitement.</p> <p>Les méthodes de diagnostic moléculaire (PCR ou LAMP) n'ont pas actuellement de place dans la gestion clinique du paludisme.</p>	<p>LDH) sont recommandés.</p> <p>Les examens au microscope nécessitent une compétence sur cette lecture.</p> <p>L'OMS -indique que les tests antigéniques ciblant la HRP-2 sont utiles chez des patients ayant reçu un traitement incomplet, chez qui la recherche au microscope peut être négative.</p> <p>- rapporte que les tests sérologiques de recherche d'Ac ont un intérêt dans les infections à <i>P. vivax</i>, mais pas à <i>P. falciparum</i>.</p>
<p>Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain: Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI). Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI), 2015 (7), 2015, Espagne</p>		
<p>Méthode d'élaboration : précisions sur la méthode, basée sur la littérature de preuve, à défaut par consensus d'experts.</p> <p>Modalités de financement indiquées et information sur les liens d'intérêts.</p> <p>Clarté de présentation : moyenne pour l'ensemble narratif, pas de gradation</p> <p>Bibliographie disponible.</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : qualité méthodologique, schéma de stratégie de diagnostic différentiel.</p> <p>Pertinence et applicabilité pour la pratique : assez bonne, tableaux d'aide à la décision, de facteurs pronostiques.</p>	<p><u>Diagnostic initial*</u> : le diagnostic doit être fait le plus tôt possible (en 3 h) par goutte épaisse ou test rapide et un frottis sanguin.</p> <p>La goutte épaisse est « le gold standard » pour le diagnostic du paludisme pour les faibles densités et voir les stades du parasite (si expertise et contrôle de qualité).</p> <p>Si la GE n'est pas possible, un TDR peut être fait en première intention pour sa réponse rapide, également dans les endroits où le diagnostic par microscopie n'est pas du tout possible (détection de la maladie et de l'espèce <i>P. falciparum</i>). Également comme méthode complémentaire à la microscopie</p> <p>Il ne doit pas remplacer la microscopie. Il existe un risque de faux négatif pour les espèces autres que <i>P. falciparum</i>.</p> <p>Le frottis sanguin permet l'identification de l'espèce ou des espèces en cas d'infection mixte et la parasitémie.</p> <p>En cas de résultat négatif, répéter l'examen jusqu'à trois fois, à 8-12 heures d'intervalle.</p> <p>PCR chère et réservée aux laboratoires spécialisés.</p>	<p>Positionne clairement la place possible des tests TDR d'ICG en première étape.</p> <p>Considère que la goutte épaisse nécessite une expertise et un contrôle qualité strict et n'est pas partout réalisable.</p> <p>Indique l'utilité des techniques sérologiques de recherche d'Ac ELISA et IFI, en dehors des situations fébriles d'accès aigus, pour la splénomégalie palustre hyperactive et les diagnostics rétrospectifs.</p> <p>Conseille de faire appel à un spécialiste de la pathologie, si suspicion forte non confirmée par parasitologie</p>

Qualité méthodologique du document (recommandations)	Préconisations des auteurs	Commentaires
Recommendations for comprehensive post-arrival health assessment for people from refugee-like backgrounds. Australasian Society for Infectious Diseases (ASID) (74) 2 ^e édition, 2016, Australie		
<p>Méthode d'élaboration : processus d'élaboration très détaillé : basé sur la littérature en particulier les revues systématiques, consensus (à 85 %) d'un groupe d'experts multidisciplinaires, consultation des parties prenantes externes, présence d'un système / gradation du NHMRC (National Health and Medical Research Council)³³.</p> <p>Financement et absence de conflits d'intérêt indiqués.</p> <p>Clarté de présentation : moyenne, encadré de recommandation, mais RBP narrative dans la partie « diagnostic » qui n'est pas gradée.</p> <p>Bibliographie disponible.</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : argumentaire peu développé, conduite à tenir.</p> <p>Pertinence et applicabilité pour la pratique : détaillées dans le contexte d'une population cible bien déterminée.</p>	<p><u>Diagnostic initial*</u> : effectuer un examen au microscope (frottis sanguin <u>et</u> goutte épaisse) <u>et</u> un test d'ICG par TDR, car l'ICG seule n'est pas assez sensible pour détecter des espèces autres que <i>P. falciparum</i>. La combinaison de l'examen au microscope et de TDR donne une bonne sensibilité pour <i>P. falciparum</i>.</p> <p>Répéter les frottis en cas de résultats microscopiques et/ou TDR initiaux négatifs et symptômes compatibles avec le paludisme. Rechercher des signes d'appel (anémie, anomalies hépatiques, atteinte rénale aiguë).</p> <p>Les infections mixtes sont identifiables au microscope.</p> <p>La PCR est réservée aux laboratoires référents, utile pour les personnes réfugiées semi-immunes avec parasitémie non détectable au microscope ou pour apprécier l'efficacité d'un traitement.</p> <p><u>Suivi après le diagnostic</u> : pendant un mois suivi de l'efficacité d'un traitement par frottis sanguin.</p>	<p>Document ayant une population cible particulière (réfugiés).</p> <p>Recherche du paludisme systématique si retour depuis moins de 3 mois, ou 12 mois en cas de fièvre.</p> <p>L'examen au microscope de frottis mince et goutte épaisse est le « gold standard ».</p> <p>Indique que l'emploi des TDR est fréquent dans les laboratoires australiens en complément du microscope.</p>
UK malaria treatment guidelines 2016. Lalloo DG et al (75), 2016, Royaume-Uni		
<p>Méthode d'élaboration : revue systématique de la littérature par groupe d'experts avec appui des documents / OMS ; indique l'utilisation de la méthode GRADE, mais les recommandations ne sont finalement pas gradées.</p> <p>Financement et absence de conflits d'intérêt indiqués.</p> <p>Clarté de présentation : moyenne, narrative (recommandations non gradées).</p> <p>Bibliographie disponible.</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : moyenne,</p>	<p><u>Diagnostic initial*</u> : prélèvements rapides et résultats attendus en 4 heures.</p> <p>Le diagnostic ne peut être exclu avant d'avoir réalisé trois examens sanguins à 12/24 h et 48 h.</p> <p>L'examen optimum est l'examen d'un frottis sanguin (frottis mince <u>et</u> goutte épaisse) très sensible et spécifique, fait par un expert qui identifiera le parasite.</p> <p>Si cela est impossible, les tests d'ICG sont faciles d'utilisation et presque aussi performants pour détecter des infections à <i>P. falciparum</i> ou <i>P. vivax</i> (moins sensibles et spécifiques pour les autres espèces). Ils sont un complément, mais ne</p>	<p>Constat d'expertise de microscopiste limitée sur le territoire britannique, notamment en urgence et attitude pragmatique préconisée vis-à-vis des TDR pour diagnostiquer surtout <i>P. falciparum</i> et aussi <i>P. vivax</i>.</p> <p>Paludisme sévère pris en charge par un professionnel compétent sur la maladie. Dans ce cas, si examen négatif trois fois par expert, exclusion du paludisme possible.</p>

³³ Disponibles sur https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/file/guidelines/developers/nhmrc_levels_grades_evidence_120423.pdf.

Qualité méthodologique du document (recommandations)	Préconisations des auteurs	Commentaires
<p>par manque de transparence et de gradation. Pertinence et applicabilité pour la pratique : moyenne, synthétique.</p>	<p>peuvent remplacer l'examen direct qualitatif et quantitatif (si <i>P. falciparum</i> et <i>P. knowlesi</i>). La PCR est réservée aux laboratoires référents, n'est pas à faire en routine.</p>	
<p>The diagnosis and treatment of malaria in pregnancy. <i>Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG)</i> (9), 2010, Royaume-Uni</p>		
<p>Méthode d'élaboration : détaillée, recherche bibliographique systématique, classification standardisée des preuves [1++ (le mieux) à 4] et gradation des recommandations [A (le mieux) à D]. Bibliographie disponible. Clarté de présentation : bonne, encadrés gradés, algorithme de stratégie diagnostique et thérapeutique. Qualité de l'argumentaire scientifique : bonne, basé sur la littérature, gradé. Pertinence et applicabilité pour la pratique : détaillée dans le contexte d'une population cible bien identifiée, modalités d'aide au diagnostic fournies.</p>	<p>Chez la femme enceinte :</p> <p><u>Diagnostic initial*</u> : diagnostic urgent (délai de 1 heure) sur sang périphérique si fièvre ou maladie, à réaliser par technique microscopique (frottis et GE) et TDR. Le frottis permet l'identification de l'espèce, l'évaluation de la parasitémie et un traitement approprié : grade A. Les TDR sont à utiliser, mais peuvent être négatifs en cas de faible parasitémie, qui est fréquente pendant la grossesse et ils sont relativement peu sensibles pour <i>P. vivax</i> : grade C. Les TDR positifs doivent être suivis d'un frottis pour calculer la parasitémie, confirmer l'espèce et le stade des parasites, ne peuvent remplacer le frottis. Le paludisme est improbable chez une patiente fébrile après trois frottis sanguins négatifs sur 48 h : grade C. <u>Suivi après le diagnostic</u> : sous traitement, parasitémie journalière préconisée. Frottis sanguin de placenta et du cordon à effectuer.</p> <p>Chez le nouveau-né :</p> <p>Si le frottis sanguin de placenta et du cordon sont positifs et l'infection présente chez la mère à la naissance, le risque de transmission verticale est élevé : grade B Tout nouveau-né de mère ayant développé un paludisme au cours de sa grossesse, sera testé par frottis sanguin et goutte épaisse hebdomadaire à la naissance et pendant 28 jours : grade D.</p>	<p>Recommandation accréditée par le NICE. Les auteurs indiquent que les données proviennent majoritairement de zones d'endémie. Si nécessaire, les frottis seront adressés à un laboratoire référent. Suivi par un spécialiste du paludisme fortement encouragé. Histopathologie du placenta préconisée à la délivrance, car plus sensible que les tests sanguins (GE négative). Annexe d'aide à la préparation des échantillons pour techniques microscopiques. Coordonnées internet fournies pour aide au diagnostic.</p>

Qualité méthodologique du document (recommandations)	Préconisations des auteurs	Commentaires
<i>Clinical guideline: Malaria in pregnancy (V3.0). Department for Health and Ageing, Government of South Australia (77), 2015, Australie</i>		
<p>Méthode d'élaboration : recherche bibliographique et opinion d'experts multidisciplinaires indiquée, mais non détaillée.</p> <p>Clarté de présentation : moyenne, narrative, pas de gradation des preuves et des recommandations ni d'algorithme décisionnel. Présentation synthétique claire.</p> <p>Bibliographie disponible.</p> <p>Qualité de l'argumentaire scientifique : argumentaire limité, renvoi à autres recommandations (RCOG).</p> <p>Pertinence et applicabilité pour la pratique : réelle dans le contexte d'une population cible identifiée (femme enceinte avec fièvre ayant voyagé en zone d'endémie).</p>	<p>Chez la femme enceinte</p> <p>Diagnostic initial* : diagnostic fait par techniques microscopiques (frottis <u>et</u> goutte épaisse) et un TDR (un TDR négatif n'exclut pas le paludisme).</p> <p>Le paludisme est improbable chez une patiente fébrile après trois frottis sanguins négatifs sur 24 h.</p> <p>Chez le nouveau-né</p> <p>Une transmission verticale est possible, notamment si le frottis sanguin de placenta et du cordon sont positifs et l'infection présente chez la mère à la naissance.</p> <p>Détection par frottis sanguin du cordon et du sang périphérique.</p>	<p>Suivi par un spécialiste du paludisme encouragée. Bilan biologique complet nécessaire (formule sanguine, glycémie,...).</p> <p>Histopathologie du placenta préconisée.</p>

* Traduction libre.

** GE : goutte épaisse.

Annexe 5. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel d'anesthésie-réanimation (CNPAR)

A – Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG), aussi appelés tests TDR

Cet examen a-t-il actuellement sa place dans une stratégie de diagnostic du paludisme ?

A1 Réponse :

Oui. La lecture de l'ensemble de la littérature ainsi que la pratique routinière indique la place de cet examen dans la stratégie diagnostique. De notre point de vue, l'indépendance de ce test de l'expérience de l'opérateur est un élément fort dans le contexte actuel.

Si oui, quelle est sa position vis-à-vis des examens microscopiques (frottis mince et goutte épaisse) ?

A2 Réponse :

Un des deux examens (frottis ?) doit rester dans la stratégie diagnostique routinière.

Quelle(s) espèce(s) de *Plasmodium* doivent être reconnues par cet examen ? S'il s'agit de plusieurs espèces, le résultat doit-il être discriminant ?

A3 Réponse :

*Essentiellement *P. falciparum*, du fait de sa fréquence.*

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont négatifs pour tout *Plasmodium* ?

A4 Réponse :

Du fait des compétences requises pour ces deux tests, il nous semble que le TDR présente un intérêt en cas de négativité des deux tests en France métropolitaine.

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont positifs à une espèce de *Plasmodium* autre que *falciparum* ?

A5 Réponse :

Probablement non.

Existe-t-il une différence sur les points précédents entre les zones non endémiques et endémiques du territoire français ?

A6 Réponse :

La compétence dans les examens réalisés au niveau des laboratoires est probablement différente. Toutefois, nous argumentons pour des pratiques homogènes afin d'éviter les dysfonctionnements.

Avez-vous d'autres remarques au sujet de cet examen (avantages, inconvénients, résultat qualitatif/quantitatif, conditions de réalisation, possibilité de faux négatif pour *P. falciparum* suite à la délétion du gène des protéines HRP-2/3) ?

A7

Réponse :

Non.

B – Techniques de recherche directe de *Plasmodium* au microscope (frottis sanguin mince et goutte épaisse)

B1

Dans le cadre de la recherche d'un paludisme en urgence, il est préconisé, notamment par la recommandation française, d'avoir le résultat de l'examen dans les 2 heures. Ceci est-il possible avec les techniques de recherche directe au microscope ? Si oui, à quelles conditions ?

Réponse :

Le regroupement des laboratoires rend à ce jour ces délais difficilement crédibles (ceci accentué par les compétences nécessaires à ces techniques).

B2

Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour garantir la qualité de ces techniques de lecture au microscope (prélèvement, transport, coloration, réalisation en elle-même, formation du microscopiste...) ?

Réponse :

Pas de compétence sur cette question.

B3

Le frottis et la goutte épaisse doivent-ils être réalisés simultanément ou l'un après l'autre ? Dans cette seconde hypothèse, dans quel ordre et suite à quel résultat du premier examen réalisé ?

Réponse :

Le frottis semble être le premier choix dans la majorité des recommandations.

B4

Ce schéma diagnostique est-il différent en zone d'endémie et pourquoi (conditions de réalisation, formation du microscopiste, ...) ?

Réponse :

Non.

B5

Le frottis mince et/ou la goutte épaisse sont-ils utilisés pour effectuer le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, à quel moment, à quelle fréquence de réalisation ?

Réponse :

Mesure de la parasitémie à J3.

B6

Quelle est la durée moyenne de réalisation totale (préparation, lecture...) d'une goutte épaisse, d'un frottis et de la recherche des protéines par ICG ?

Réponse :

Non compétent.

C – Recherche d'anticorps sériques

Quelles sont les indications actuelles de la recherche d'anticorps sériques anti-*Plasmodium* ?

C1

Réponse :

*fièvre d'origine indéterminée après prophylaxie irrégulière ;
centre de transfusion sanguine en zone non endémique ;
études épidémiologiques.*

Cette recherche a-t-elle une place dans le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, quand et à quelle fréquence ?

C2

Réponse :

Non compétent.

Les indications de la sérologie sont-elles différentes entre zones endémiques et non endémiques ?

C3

Réponse :

Oui (cf. C1).

Quelle(s) technique(s) sérologique(s) sont validées aujourd'hui ? Quelle(s) technique(s) sont obsolète(s) ?

C4

Réponse :

Non compétent.

D – Autres questions

Quelle(s) sont les situations évocatrices d'un paludisme et devant entraîner une investigation biologique, en zone non endémique ?

D1

Réponse :

Fièvre au retour d'un pays exposé.

Quelle est la stratégie diagnostique actuellement mise en œuvre en France métropolitaine pour détecter un paludisme en urgence ? Quel est son rationnel (performances techniques, accessibilité de la technique, ...) ?

D2

Réponse :

Frottis et goutte épaisse (rapidité, efficacité, diagnostic d'espèce).

Pensez-vous que les situations de certains DOM, en particulier la Guyane et Mayotte nécessitent des modalités de diagnostic et de suivi différentes en tant que zones de potentielle endémie ? Précisez lesquelles et avec quelle(s) technique(s).

D3

Réponse :

Non compétent.

D4 Quelles techniques sont à effectuer dans le cas de suspicion chez une femme enceinte ? A l'accouchement, la recherche du parasite est-elle à réaliser à partir du placenta, du sang du cordon, un autre prélèvement ? Si oui, avec quelles techniques ? Qu'en est-il pour le nouveau-né ?

Réponse :

Non compétent.

D5 La littérature cite les techniques d'amplification génique (PCR/LAMP) pour le diagnostic du paludisme : quelle est la place actuelle de ces techniques ?

Réponse :

Sensibilité supérieure aux techniques microscopiques.

Épidémiologie / Détermination d'espèce si doute.

D6 Quel(s) sont les résultats(s) biologique(s) (nature, fréquence...) qui permettent de réfuter avec certitude un paludisme ?

Réponse :

Détection d'antigène.

E – Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

E1 Estimez-vous que le document transmis reflète les données publiées dans la littérature ?

Veillez préciser dans le cas contraire les données non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés pages 26-27 de l'argumentaire provisoire.

Réponse :

Oui.

E2 Avez-vous connaissance de recommandations existantes non citées dans le rapport ?

Réponse :

Non.

E3 L'analyse présentée dans ce rapport vous semble-t-elle cohérente, objective et précise ?

Réponse :

Oui.

E4 En termes de lisibilité et de forme du rapport provisoire, avez-vous des remarques ou propositions à faire ?

Veillez préciser dans le cas contraire les éléments à clarifier.

Réponse :

Non.

E5

Avez-vous connaissance de recommandations en cours d'élaboration ? Si oui, quelle est la date de publication prévisionnelle et présentent-elles d'autres algorithmes que ceux présentés dans les recommandations analysées dans l'argumentaire ?

Réponse :

Non.

E6

Souhaitez-vous émettre un commentaire complémentaire ?

Réponse :

Non.

Annexe 6. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Collège français de médecine d'urgence (CFMU)

A – Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG), aussi appelés tests TDR

Cet examen a-t-il actuellement sa place dans une stratégie de diagnostic du paludisme ?

Réponse :

A1

Le diagnostic de paludisme est une urgence diagnostique et thérapeutique et une recherche de paludisme doit pouvoir être demandée par toute structure d'urgence H24. Le rendu du résultat d'un TDR étant moins personne- ou expérience-dépendants que le frottis ou la GE, ils ont toute leur place (en complément des examens microscopiques) dans les laboratoires de biologie ayant une faible activité de recherche de paludisme, afin d'augmenter la sensibilité de la recherche de Plasmodium notamment en cas de faible parasitémie.

Si oui, quelle est sa position vis-à-vis des examens microscopiques (frottis mince et goutte épaisse) ?

Réponse :

A2

Les TDR sont un complément des examens microscopiques qui restent les examens de référence et permettent, outre le diagnostic d'espèce, la quantification de la parasitémie. Les TDR, en association aux examens microscopiques, sont à même d'améliorer la sensibilité de ces derniers lorsqu'ils sont pratiqués par du personnel de laboratoire moins expérimenté et/ou quand la charge parasitaire (parasitémie) est faible.

Quelle(s) espèce(s) de Plasmodium doivent être reconnues par cet examen ? S'il s'agit de plusieurs espèces, le résultat doit-il être discriminant ?

Réponse :

A3

La prise en charge clinique (hospitalisation ou traitement ambulatoire) et thérapeutique différant selon les espèces plasmodiales, il est nécessaire aux urgences de disposer au minimum pour ces tests d'un résultat discriminant les infestations à Plasmodium falciparum des autres espèces plasmodiales.

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont négatifs pour tout Plasmodium ?

Réponse :

A4

La probabilité d'accès palustre en cas de frottis et de goutte épaisse négatifs réalisés par du personnel de laboratoire entraîné est très faible et témoignerait d'une parasitémie minime pour laquelle l'urgence thérapeutique pourrait être discutable. Il existe probablement une place des TDR dans ce cas de figure (FGE négatifs) lorsque le personnel ayant réalisé les examens microscopiques manque d'expérience, afin d'augmenter la sensibilité de la recherche de paludisme (le FGE restant un examen sinon subjectif, du moins personne-dépendant).

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont positifs à une espèce de *Plasmodium* autre que *falciparum* ?

A5 Réponse :

*Sous réserve d'une expérience suffisante du personnel de laboratoire réalisant le FGE pour la détermination de l'espèce plasmodiale, il n'y a pas d'intérêt à réaliser un TDR dans le cas d'un FGE rendu positif à une espèce autre que *falciparum*.*

Existe-t-il une différence sur les points précédents entre les zones non endémiques et endémiques du territoire français ?

A6 Réponse :

Non.

Avez-vous d'autres remarques au sujet de cet examen (avantages, inconvénients, résultat qualitatif/quantitatif, conditions de réalisation, possibilité de faux négatif pour *P. falciparum* suite à la délétion du gène des protéines HRP-2/3) ?

A7 Réponse :

*Le TDR ne peut être proposé comme seul test diagnostique au cours d'une recherche de paludisme, du fait de certaines délétions du gène des protéines HRP-2/3 pour *P. falciparum* (risque de faux négatif) et de l'impossibilité de quantifier la parasitémie (qui a une valeur pronostique).*

Le principal inconvénient des TDR est la positivité du test persistant plusieurs semaines après l'épisode aigu même traité. De ce fait, il ne semble pas opportun de réaliser ces TDR chez un patient déjà traité correctement pour un accès palustre les semaines précédant le test. Dans ce cas de figure et chez un patient restant symptomatique, seuls les examens microscopiques seront à même d'imputer le tableau clinique à un accès toujours évolutif.

B – Techniques de recherche directe de *Plasmodium* au microscope (frottis sanguin mince et goutte épaisse)

Dans le cadre de la recherche d'un paludisme en urgence, il est préconisé, notamment par la recommandation française, d'avoir le résultat de l'examen dans les 2 heures. Ceci est-il possible avec les techniques de recherche directe au microscope ? Si oui, à quelles conditions ?

B1

Réponse :

NA³⁴.

Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour garantir la qualité de ces techniques de lecture au microscope (prélèvement, transport, coloration, réalisation en elle-même, formation du microscopiste...) ?

B2

Réponse :

NA.

³⁴ « Questions ne relevant pas de notre spécialité ou expertise ».

B3 Le frottis et la goutte épaisse doivent-ils être réalisés simultanément ou l'un après l'autre ? Dans cette seconde hypothèse, dans quel ordre et suite à quel résultat du premier examen réalisé ?

Réponse :
NA.

B4 Ce schéma diagnostique est-il différent en zone d'endémie et pourquoi (conditions de réalisation, formation du microscopiste, ...) ?

Réponse :
NA.

B5 Le frottis mince et/ou la goutte épaisse sont-ils utilisés pour effectuer le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, à quel moment, à quelle fréquence de réalisation ?

Réponse :
NA.

B6 Quelle est la durée moyenne de réalisation totale (préparation, lecture...) d'une goutte épaisse, d'un frottis et de la recherche des protéines par ICG ?

Réponse :
NA.

C – Recherche d'anticorps sériques

C1 Quelles sont les indications actuelles de la recherche d'anticorps sériques anti-*Plasmodium* ?

Réponse :
Diagnostic a posteriori de paludisme chez un sujet qui était non immun avant séjour en zone d'endémie.

C2 Cette recherche a-t-elle une place dans le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, quand et à quelle fréquence ?

Réponse :
Non, en dehors peut-être du paludisme viscéral évolutif.

C3 Les indications de la sérologie sont-elles différentes entre zones endémiques et non endémiques ?

Réponse :
NA.

C4 Quelle(s) technique(s) sérologique(s) sont validées aujourd'hui ? Quelle(s) technique(s) sont obsolète(s) ?

Réponse :
NA.

D – Autres questions

Quelle(s) sont les situations évocatrices d'un paludisme et devant entraîner une investigation biologique, en zone non endémique ?

Réponse :

D1

Dans les 4-8 semaines de retour d'un séjour en zone d'endémie palustre, et quel que soit la prophylaxie suivie, l'un ou plusieurs des signes cliniques ou biologiques suivants :

- fièvre, syndrome pseudo-grippal, arthromyalgies, céphalées, ictère, syndrome confusionnel ;
- thrombopénie, stigmates biologiques d'hémolyse, hyperbilirubinémie.

Quelle est la stratégie diagnostique actuellement mise en œuvre en France métropolitaine pour détecter un paludisme en urgence ? Quel est son rationnel (performances techniques, accessibilité de la technique, ...) ?

Réponse :

D2

La stratégie de référence comporte la réalisation d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse afin de fournir en urgence les 3 informations essentielles à la prise en charge :

- diagnostic positif de paludisme ;
- diagnostic d'espèce plasmodiale ;
- taux d'infestation des hématies (parasitémie) pour les inf à *P. falciparum*.

Ces 2 examens microscopiques sont parfaitement standardisées et très sensibles si le lecteur est suffisamment entraîné.

Dans les centres moins expérimentés à la lecture des examens microscopiques pour le diagnostic de paludisme (FGE), la réalisation concomitante d'un TDR (non lecteur-dépendant) peut permettre de rattraper certains faux négatifs du FGE liés à des erreurs qualitatives de lecture au microscope.

Pensez-vous que les situations de certains DOM, en particulier la Guyane et Mayotte nécessitent des modalités de diagnostic et de suivi différentes en tant que zones de potentielle endémie ? Précisez lesquelles et avec quelle(s) technique(s).

D3

Réponse :

NA.

Quelles techniques sont à effectuer dans le cas de suspicion chez une femme enceinte ? A l'accouchement, la recherche du parasite est-elle à réaliser à partir du placenta, du sang du cordon, un autre prélèvement ? Si oui, avec quelles techniques ? Qu'en est-il pour le nouveau-né ?

D4

Réponse :

NA.

La littérature cite les techniques d'amplification génique (PCR/LAMP) pour le diagnostic du paludisme : quelle est la place actuelle de ces techniques ?

D5

Réponse :

Pas d'indication en routine, diagnostic de formes frustres à très faible parasitémie.

- D6** Quel(s) sont les résultats(s) biologique(s) (nature, fréquence...) qui permettent de réfuter avec certitude un paludisme ?
- Réponse :
FGE + TDR tous négatifs.

E – Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

- E1** Estimez-vous que le document transmis reflète les données publiées dans la littérature ?
- Veillez préciser dans le cas contraire les données non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés pages 26-27 de l'argumentaire provisoire.*
- Réponse :
Oui.

- E2** Avez-vous connaissance de recommandations existantes non citées dans le rapport ?
- Réponse :
Non.

- E3** L'analyse présentée dans ce rapport vous semble-t-elle cohérente, objective et précise ?
- Réponse :
Oui tout à fait.

- E4** En termes de lisibilité et de forme du rapport provisoire, avez-vous des remarques ou propositions à faire ?
- Veillez préciser dans le cas contraire les éléments à clarifier.*
- Réponse :
Non, présentation claire, concise et didactique.

- E5** Avez-vous connaissance de recommandations en cours d'élaboration ? Si oui, quelle est la date de publication prévisionnelle et présentent-elles d'autres algorithmes que ceux présentés dans les recommandations analysées dans l'argumentaire ?
- Réponse :
Non.

- E6** Souhaitez-vous émettre un commentaire complémentaire ?
- Réponse :
Non.

Annexe 7. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA)

A – Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG), aussi appelés tests TDR

A1 Cet examen a-t-il actuellement sa place dans une stratégie de diagnostic du paludisme ?

Réponse :
Oui.

A2 Si oui, quelle est sa position vis-à-vis des examens microscopiques (frottis mince et goutte épaisse) ?

Réponse :
En complément des examens microscopiques, car test non quantitatif et performances techniques imparfaites actuellement (spécificité et sensibilité différent en fonction du type d'Ig reconnues).

A3 Quelle(s) espèce(s) de *Plasmodium* doivent être reconnues par cet examen ? S'il s'agit de plusieurs espèces, le résultat doit-il être discriminant ?

Réponse :
Toutes les espèces devraient être reconnues. Ce test se doit d'être discriminant, spécifique et suffisamment sensible.

A4 La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont négatifs pour tout *Plasmodium* ?

Réponse :
*Oui c'est un plus, en sachant que certains Ig reconnues comme HRP2 perdurent plusieurs semaines dans le plasma après traitement (Malar J 2010,9,28).
Intérêt en garde ou Point of Care avec personnel souvent peu expérimenté aux examens microscopiques.*

A5 La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont positifs à une espèce de *Plasmodium* autre que *falciparum* ?

Réponse :
Non.

A6 Existe-t-il une différence sur les points précédents entre les zones non endémiques et endémiques du territoire français ?

Réponse :
Non.

Avez-vous d'autres remarques au sujet de cet examen (avantages, inconvénients, résultat qualitatif/quantitatif, conditions de réalisation, possibilité de faux négatif pour *P. falciparum* suite à la délétion du gène des protéines HRP-2/3) ?

Réponse :

Avantages : facilité de réalisation, délai rapide, facilité de lecture

Inconvénients :

Possibilité de faux positifs :

1) la persistance d'HRP2 dans le sang plusieurs semaines après traitement. Ce qui se voit très souvent en Afrique. (Malar J. 2010,9,28) ;

2) la réaction croisée avec le facteur rhumatoïde (2 à 10 % des échantillons avec FR sont positifs en HRP2) (JCM 2014,52,3784) ;

3) la présence d'autoAC ;

A7

4) la présence d'autres parasites comme *Trypanosoma* (PLoS Neg Trop Dis 2013,7,2180) ;

5) la présence de *S typhi* (un cas d'HRP2+ sur une fièvre typhoïde sans autoAc et sans facteur rhumatoïde) (BMC Infect Dis 2014,14,377) ;

6) l'utilisation de réactif différent de ceux du kit (Malar J 2010,9,215). C'est arrivé à des infirmiers militaires en opération extérieure qui avaient fait tomber le diluant et remplacé par de l'eau : 100 % de positifs ;

7) une forte parasitémie en *P. falciparum* peut interférer sur *P. vivax* et allumer la bande pLDH ;

8) un problème de kit défectueux.

Possibilité de faux négatifs suite à la délétion ou modification des gènes *hrp2* et/ou *hrp3* (Med Sante Trop 2013,23,181 ; Malar J 2013,12,34). Dans certaines régions d'Amérique du Sud (Pérou), plus de 50 % de souches non reconnues par TDR à base HRP2 par délétion des gènes *hrp2* et/ou *hrp3* (PLoS One 2010,5,8091).

Manque de sensibilité des TDR à base LDH.

TDR actuels pas suffisamment discriminants pour les espèces autres que *P. falciparum*.

B – Techniques de recherche directe de *Plasmodium* au microscope (frottis sanguin mince et goutte épaisse)

B1

Dans le cadre de la recherche d'un paludisme en urgence, il est préconisé, notamment par la recommandation française, d'avoir le résultat de l'examen dans les 2 heures. Ceci est-il possible avec les techniques de recherche directe au microscope ? Si oui, à quelles conditions ?

Réponse :

Oui, deux heures à partir de la réception du prélèvement.

B2

Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour garantir la qualité de ces techniques de lecture au microscope (prélèvement, transport, coloration, réalisation en elle-même, formation du microscopiste...) ?

Réponse :

Prélèvement en ACD ou en EDTA, transport à 4°C, pH des solutions, formation des microscopistes au frottis et encore plus à la goutte épaisse.

B3 Le frottis et la goutte épaisse doivent-ils être réalisés simultanément ou l'un après l'autre ? Dans cette seconde hypothèse, dans quel ordre et suite à quel résultat du premier examen réalisé ?

Réponse :

Frottis en priorité. Si frottis négatif, alors réalisation de la goutte épaisse.

B4 Ce schéma diagnostique est-il différent en zone d'endémie et pourquoi (conditions de réalisation, formation du microscopiste, ...) ?

Réponse :

Oui, de moins en moins de microscopistes formés en zone d'endémie. Abandon des examens microscopiques au profit des TDR en zone d'endémie.

B5 Le frottis mince et/ou la goutte épaisse sont-ils utilisés pour effectuer le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, à quel moment, à quelle fréquence de réalisation ?

Réponse :

Oui pour avoir une réponse quantitative. J0, J1, J2, J3, J7 et J28 et lors de d'un échec thérapeutique.

B6 Quelle est la durée moyenne de réalisation totale (préparation, lecture...) d'une goutte épaisse, d'un frottis et de la recherche des protéines par ICG ?

Réponse :

Frottis sanguin : 5 minutes de réalisation + 5 à 15 minutes de lecture en fonction de la parasitémie.

Goutte épaisse en technique rapide : 10 minutes de réalisation + 15 minutes de lecture.

TDR : 21 minutes réalisation + lecture.

C – Recherche d'anticorps sériques

C1 Quelles sont les indications actuelles de la recherche d'anticorps sériques anti-*Plasmodium* ?

Réponse :

Pour évaluer les formes chroniques dues aux espèces autres que *P. falciparum*.

Lors d'études épidémiologiques évaluant le risque d'exposition au paludisme.

Pour mesurer l'efficacité d'une stratégie de lutte antivectorielle.

Pour cribler les poches de sang lors des dons de sang.

Intérêt dans les zones d'endémie de faible transmission ou dans les zones de pré-élimination ou d'élimination du paludisme où les parasitémies peuvent être submicroscopiques.

C2 Cette recherche a-t-elle une place dans le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, quand et à quelle fréquence ?

Réponse :

Difficile pour évaluer l'efficacité thérapeutique lors d'un traitement d'un accès mais pourrait

être utilisé dans le cadre d'essai clinique pour évaluer l'efficacité d'une prophylaxie antipaludique.

Les indications de la sérologie sont-elles différentes entre zones endémiques et non endémiques ?

C3

Réponse :

Intérêt dans les zones d'endémie de faible transmission ou dans les zones de pré-élimination ou d'élimination du paludisme où les parasitémies peuvent être submicroscopiques. Peu d'intérêt dans des zones de forte transmission où les personnes sont pré-immunes.

Quelle(s) technique(s) sérologique(s) sont validées aujourd'hui ? Quelle(s) technique(s) sont obsolète(s) ?

C4

Réponse :

Techniques ELISA validées.

IFI, electosynérèse obsolètes.

D – Autres questions

Quelle(s) sont les situations évocatrices d'un paludisme et devant entraîner une investigation biologique, en zone non endémique ?

D1

Réponse :

Fièvre au retour des tropiques.

Fièvre chez personnes ayant séjourné en zone d'endémie (même plusieurs mois après retour).

Chez personnes ayant un antécédent de paludisme dû à un autre plasmodium que *P. falciparum*.

Quelle est la stratégie diagnostique actuellement mise en œuvre en France métropolitaine pour détecter un paludisme en urgence ? Quel est son rationnel (performances techniques, accessibilité de la technique, ...) ?

D2

Réponse :

En pratique TDR + frottis.

Performances techniques TDR déjà détaillées.

Frottis nécessite microscopistes qui sont maintenant regroupés au sein de laboratoires fédérés pour les laboratoires hospitaliers (délai supplémentaire d'acheminement des échantillons). Manque de compétences dans les laboratoires privés.

Pensez-vous que les situations de certains DOM, en particulier la Guyane et Mayotte nécessitent des modalités de diagnostic et de suivi différentes en tant que zones de potentielle endémie ? Précisez lesquelles et avec quelle(s) technique(s).

D3

Réponse :

Mayotte : pas de différence pour diagnostic mais suivi différent. Éliminer réinfection lors d'un échec thérapeutique supposé.

Guyane : *P. vivax* préférentiel à *P. falciparum*. TDR actuels peu recommandés par

manque de spécificité et discrimination. Éliminer réinfection lors d'un échec thérapeutique supposé.

D4

Quelles techniques sont à effectuer dans le cas de suspicion chez une femme enceinte ? A l'accouchement, la recherche du parasite est-elle à réaliser à partir du placenta, du sang du cordon, un autre prélèvement ? Si oui, avec quelles techniques ? Qu'en est-il pour le nouveau-né ?

Réponse :

Difficulté diagnostic par microscopie car souvent séquestration des formes circulantes au niveau du placenta. Intérêt des TDR.

Recherche à l'accouchement sur placenta et sang du cordon.

D5

La littérature cite les techniques d'amplification génique (PCR/LAMP) pour le diagnostic du paludisme : quelle est la place actuelle de ces techniques ?

Réponse :

Méthode de biologie moléculaire à utiliser en deuxième ligne en cas de goutte épaisse négative, si goutte épaisse négative et TDR positif, si parasitémie très faible et difficulté à identifier espèce, si suspicion de plusieurs espèces.

Inconvénients : réservées actuellement à des laboratoires spécialisés.

Quelques kits commercialisés mais sensibilité et spécificité encore limitées ne permettant pas d'espérer une utilisation en première ligne.

D6

Quel(s) sont les résultats(s) biologique(s) (nature, fréquence...) qui permettent de réfuter avec certitude un paludisme ?

Réponse :

Goutte épaisse négative + TDR négatif + PCR d'espèce négative.

E – Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

E1

Estimez-vous que le document transmis reflète les données publiées dans la littérature ?

Veillez préciser dans le cas contraire les données non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés pages 26-27 de l'argumentaire provisoire.

Réponse :

Oui.

E2

Avez-vous connaissance de recommandations existantes non citées dans le rapport ?

Réponse :

Non.

E3

L'analyse présentée dans ce rapport vous semble-t-elle cohérente, objective et précise ?

Réponse :

Oui.

En termes de lisibilité et de forme du rapport provisoire, avez-vous des remarques ou propositions à faire ?

E4

Veillez préciser dans le cas contraire les éléments à clarifier.

Réponse :

Non.

Avez-vous connaissance de recommandations en cours d'élaboration ? Si oui, quelle est la date de publication prévisionnelle et présentent-elles d'autres algorithmes que ceux présentés dans les recommandations analysées dans l'argumentaire ?

E5

Réponse :

Groupe de travail mise au point des recommandations de prise en charge et prévention du paludisme d'importation sous l'égide de la SPILF en cours, publication en 2017).

Souhaitez-vous émettre un commentaire complémentaire ?

E6

Réponse :

Non.

Annexe 8. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de la Société de pathologie exotique (SPE)

A–Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG), aussi appelés tests TDR

Cet examen a-t-il actuellement sa place dans une stratégie de diagnostic du paludisme ?

Réponse :

- A1** *Oui, en distinguant les laboratoires qui ont une expertise du paludisme, et ceux qui sont rarement confrontés à ce diagnostic (incluant les laboratoires de garde – nuits / jours fériés - avec biologistes non parasitologues). L'ICG retire la part importante de subjectivité des techniques classiques appliquées par des biologistes peu expérimentés. Elle doit devenir obligatoire dans l'analyse « Recherche de paludisme ».*

Si oui, quelle est sa position vis-à-vis des examens microscopiques (frottis mince et goutte épaisse) ?

Réponse :

- A2** *L'ICG doit être obligatoire en première ligne sur tous sites, quel que soit le niveau d'expertise du laboratoire. Tout examen positif doit être confirmé par un frottis sanguin pour confirmation de l'espèce (si Pan-LDH ou aldolase positif) et évaluer la parasitémie si *P. falciparum*.*

Quelle(s) espèce(s) de *Plasmodium* doivent être reconnues par cet examen ? S'il s'agit de plusieurs espèces, le résultat doit-il être discriminant ?

Réponse :

- A3** *Toutes les espèces plasmodiales – *P. falciparum* et non *falciparum* – devraient être détectées (plutôt que « reconnues », terme ambigu), si possible de façon discriminante. Avec les tests dont on dispose actuellement, l'avantage de détecter « autres espèces » est d'obliger à identifier l'espèce sur frottis sanguin.*

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont négatifs pour tout *Plasmodium* ?

Réponse :

- A4** *Oui, dans des centres ayant peu d'expérience où la sensibilité du TDR est supérieure à celle du frottis sanguin + goutte épaisse (FS+GE). C'est pourquoi ces centres devraient utiliser le TDR en première ligne, la réalisation et la lecture en étant beaucoup plus aisées. Dans les centres expérimentés où le FS+GE reste plus sensible, la réalisation d'un TDR peut avoir un intérêt (surtout avec l'HRP2) lorsqu'il y a eu un auto-traitement ou un traitement mal conduit qui a éliminé provisoirement les hématozoaires érythrocytaires.*

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont positifs à une espèce de *Plasmodium* autre que *falciparum* ?

Réponse :

- A5** *Oui éventuellement, grâce à la bande spécifique « Pf » qui peut mettre en évidence une association à *P. falciparum* passée inaperçue en cas de faible parasitémie.*

Existe-t-il une différence sur les points précédents entre les zones non endémiques et endémiques du territoire français ?

Réponse :

- A6** *Oui, la persistance d'une antigénémie détectable par TDR pendant quelques jours à quelques semaines (selon les tests) après l'accès palustre peut rendre l'interprétation délicate en cas de reprise de la fièvre : s'agit-il des « anciens antigènes » ou de « nouveaux antigènes » ? Cela souligne d'intérêt du FS+GE réalisés et interprétés par une personne expérimentée.*

Avez-vous d'autres remarques au sujet de cet examen (avantages, inconvénients, résultat qualitatif/quantitatif, conditions de réalisation, possibilité de faux négatif pour *P. falciparum* suite à la délétion du gène des protéines HRP-2/3) ?

Réponse :

- A7**
- avantages : rapide, de réalisation aisée, possible au lit du malade, nécessitant un minimum de formation, à présent peu onéreux, spécificité et sensibilité élevées (mais non de 100 % comme revendiqué parfois), la lecture objective lève de très nombreux doutes sur l'interprétation d'examen « limites », les délais d'instauration du traitement sont raccourcis ;
 - inconvénients : performances non supérieures au FS-GE, existence de faux positifs et de faux négatifs (d'où l'importance de la clinique dans la décision thérapeutique), pas d'évaluation quantitative (ou à la rigueur semi-quantitative seulement) ce qui rend difficile l'interprétation pronostique et le suivi thérapeutique, peu validé et/ou efficace pour *P. ovale* et *P. malariae* (ce qui nécessite de continuer à l'associer aux autres techniques), risque de perte de l'expertise microscopique s'il venait à supplanter le FS+GE.

B- Techniques de recherche directe de *Plasmodium* au microscope (frottis sanguin mince et goutte épaisse)

Dans le cadre de la recherche d'un paludisme en urgence, il est préconisé, notamment par la recommandation française, d'avoir le résultat de l'examen dans les 2 heures. Ceci est-il possible avec les techniques de recherche directe au microscope ? Si oui, à quelles conditions ?

B1

Réponse :

Oui, délai largement suffisant, si l'on ne considère que le temps entre l'arrivée de l'échantillon au laboratoire et le rendu du résultat ; or le temps d'acheminement au labo est souvent très (trop) long.

Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour garantir la qualité de ces techniques de lecture au microscope (prélèvement, transport, coloration, réalisation en elle-même, formation du microscopiste...) ?

B2

Réponse :

Un protocole clair, une formation des techniciens, des réactifs de qualité et une grande expérience sont nécessaires pour un diagnostic sûr. C'est là tout l'intérêt du TDR qui est beaucoup moins « technique-dépendant ». Les techniques morphologiques ne sont lisibles et interprétables que si la qualité est impeccable d'un bout à l'autre de la réalisation, et

c'est ce qui explique la grande majorité des problèmes rencontrés dans les zones d'endémie « défavorisées » avant l'arrivée des TDR.

Le frottis et la goutte épaisse doivent-ils être réalisés simultanément ou l'un après l'autre ? Dans cette seconde hypothèse, dans quel ordre et suite à quel résultat du premier examen réalisé ?

B3

Réponse :

La réalisation du FS et de la GE devrait être simultanée car ils sont complémentaires. Toutefois, peu de laboratoires situés en zone non endémique ont la maîtrise de la GE (confection et lecture), d'autant que le diagnostic d'espèce est difficile. Si l'utilisation des TDR est généralisée, il faut surtout conserver la pratique systématique du FS.

Ce schéma diagnostique est-il différent en zone d'endémie et pourquoi (conditions de réalisation, formation du microscopiste, ...) ?

B4

Réponse :

Oui, assurément en dehors des zones d'endémie françaises, ce qui pose le problème de la prise en charge globale du paludisme dans de nombreux pays du sud où le manque de moyens conduit souvent à la réalisation d'un « frottis épais », sorte de mélange entre FS et GE. Mais dans l'idéal, ce schéma ne devrait pas être différent car la prise en charge du paludisme devrait être partout la même.

Le frottis mince et/ou la goutte épaisse sont-ils utilisés pour effectuer le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, à quel moment, à quelle fréquence de réalisation ?

B5

Réponse :

Oui, FS+GE à J3, J7, J28, et plus souvent au cours des 48-72 premières heures dans les formes graves (en prenant en compte une possible élévation paradoxale de la parasitémie sans valeur pronostique péjorative) ou en cas d'évolution défavorable, même si cela est difficile à obtenir en pratique.

Quelle est la durée moyenne de réalisation totale (préparation, lecture...) d'une goutte épaisse, d'un frottis et de la recherche des protéines par ICG ?

B6

Réponse :

*- FS+GE : préparation 15 mn et lecture fonction de la parasitémie (en moyenne 30 mn pour la GE et 40 mn pour la FS) ;
- TDR : variable selon les techniques, entre 15 et 30 mn.*

C-Recherche d'anticorps sériques

Quelles sont les indications actuelles de la recherche d'anticorps sériques anti-Plasmodium ?

C1

Réponse :

*- diagnostic rétrospectif d'une fièvre (en particulier si elle est survenue en zone d'endémie ne disposant pas de méthode de diagnostic fiable et a été étiquetée « paludisme ») ;
- paludisme viscéral évolutif ;
- dépistage chez les donneurs de sang ou d'organe, même si peu utile en pratique : un*

*sujet qui serait porteur de parasites (à risque pour le receveur du sang) ne portant pas (encore) d'anticorps ;
- aucun intérêt pour le diagnostic d'une fièvre aiguë.*

C2

Cette recherche a-t-elle une place dans le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, quand et à quelle fréquence ?

Réponse :

Non, aucune place.

C3

Les indications de la sérologie sont-elles différentes entre zones endémiques et non endémiques ?

Réponse :

Oui, la fréquence du portage d'anticorps dans les populations très exposées réduit l'intérêt de la sérologie en zone d'endémie ; elle pourrait cependant servir à suivre l'efficacité de mesures de contrôle ou d'élimination de la maladie (disparition progressive des anticorps dans une classe d'âge déterminée), par exemple dans les DOM endémiques (Guyane et Mayotte).

C4

Quelle(s) technique(s) sérologique(s) sont validées aujourd'hui ? Quelle(s) technique(s) sont obsolète(s) ?

Réponse :

Immunofluorescence et ELISA. L'électrosynérèse ne semble plus devoir être retenue compte tenu du manque de standardisation des antigènes.

D – Autres questions

D1

Quelle(s) sont les situations évocatrices d'un paludisme et devant entraîner une investigation biologique, en zone non endémique ?

Réponse :

Toute fièvre (si possible documentée) actuelle ou récente (dans les 48 h précédentes) chez un sujet ayant séjourné plus ou moins récemment en zone d'endémie palustre ; en seconde ligne pour l'exploration d'une fièvre sans cause déterminée.

D2

Quelle est la stratégie diagnostique actuellement mise en œuvre en France métropolitaine pour détecter un paludisme en urgence ? Quel est son rationnel (performances techniques, accessibilité de la technique, ...) ?

Réponse :

Dans un contexte clinique et/ou épidémiologique compatible avec D1 (ci-dessus), la démarche chronologique est la suivante :

- réalisation d'un FS et d'une GE ;

- lecture du FS ;

*- si FS positif, transmission du résultat et contrôle ultérieur de la GE pour détection d'une éventuelle association d'espèce ; pas de TDR sauf en cas de résultat positif pour une espèce autre que *P. falciparum* et suspicion d'un éventuel biparasitisme ;*

- si FS négatif : réalisation du TDR ;
- si TDR positif : transmission du résultat (avec les réserves devant cette dissociation) et contrôle ultérieur de la GE ;
- transmission finale du résultat définitif avec les 2 ou 3 techniques réalisées.

Pensez-vous que les situations de certains DOM, en particulier la Guyane et Mayotte nécessitent des modalités de diagnostic et de suivi différentes en tant que zones de potentielle endémie ? Précisez lesquelles et avec quelle(s) technique(s).

Réponse :

- D3** *Non, mais il faut prendre en compte les différentes catégories de population. Une personne qui vit à Cayenne ou à Mamoudzou et fait épisodiquement un week-end de dépaysement est peu différente d'une personne métropolitaine qui fait un séjour en zone d'endémie. Par contre, les personnes qui vivent en zones défavorisées sont peu différentes des populations des zones d'endémie. Pour ces dernières, les réserves quant à l'interprétation du TDR (cf. A6) doivent être prises en considération.*

Quelles techniques sont à effectuer dans le cas de suspicion chez une femme enceinte ? A l'accouchement, la recherche du parasite est-elle à réaliser à partir du placenta, du sang du cordon, un autre prélèvement ? Si oui, avec quelles techniques ? Qu'en est-il pour le nouveau-né ?

Réponse :

- D4** *Mêmes techniques chez la femme enceinte et sur sang du nouveau-né, plutôt que sur le sang de cordon (risque de contamination de ce dernier par le sang maternel au moment de la délivrance, ce qui perturbe l'interprétation). L'apposition de placenta est possible en cas de doute chez la mère, mais le plus souvent pour documenter le dossier. Un suivi clinique de l'enfant s'impose, surtout s'il s'agit d'une primipare et d'une mère « naïve » pour le paludisme (expatriée, touriste, ...).*

La littérature cite les techniques d'amplification génique (PCR/LAMP) pour le diagnostic du paludisme : quelle est la place actuelle de ces techniques ?

Réponse :

- D5** *Ces techniques permettent de détecter des parasitémies beaucoup plus faibles que les autres techniques et ont donc un intérêt théorique en cas de paludisme décapité. La lourdeur des techniques actuelles en réduisent l'usage au CNR et à quelques laboratoires de recherche. En routine, leur intérêt pratique se limite à l'étude de quelques cas difficiles (discordances entre différentes techniques, dissociations clinico-biologiques, problème d'identification d'espèces). Toutefois, de nouveaux kits arrivent sur le marché, permettant des diagnostics en moins d'une heure avec une excellente sensibilité, requérant un minimum de préparation, n'exigeant pas de grande expérience en biologie moléculaire, et dont il faudra tenir compte dans les stratégies diagnostiques.*

Quel(s) sont les résultats(s) biologique(s) (nature, fréquence...) qui permettent de réfuter avec certitude un paludisme ?

Réponse :

- D6** *En pratique, la négativité répétée de la PCR au moment de l'accès, sous réserve qu'elle soit faite dans de bonnes conditions (contrôles positif et négatif, sensibilité satisfaisante, détection d'éventuels inhibiteurs), permet d'éliminer un paludisme avec une quasi-certitude.*

E-Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

Estimez-vous que le document transmis reflète les données publiées dans la littérature ?

Veillez préciser dans le cas contraire les données non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés pages 26-27 de l'argumentaire provisoire.

Réponse :

E1

Les données générales concernant les données actuelles sur le paludisme semblent en accord avec la littérature. Toutefois, la sélection des « Parties prenantes » (p. 31) est étonnante : alors qu'il s'agit de rendre un avis très technique sur des méthodes de biologie parasitaire très spécialisées et parfois complexes, le seul avis biologique est sollicité auprès d'un groupe de biologie « global » (CNP de biologie médicale) et non directement auprès des deux Sociétés de biologie parasitaire que sont la Société française de Parasitologie et la collégiale Anofel qui regroupent tous les parasitologues. Même s'il est vrai que les professions de santé citées sont celles qui sont concernées par les résultats, des doutes peuvent être émis quant au nombre de personnes en capacité de répondre à ces questions techniques.

Avez-vous connaissance de recommandations existantes non citées dans le rapport ?

E2

Réponse :

Non.

L'analyse présentée dans ce rapport vous semble-t-elle cohérente, objective et précise ?

E3

Réponse :

Oui.

En termes de lisibilité et de forme du rapport provisoire, avez-vous des remarques ou propositions à faire ?

E4

Veillez préciser dans le cas contraire les éléments à clarifier.

Réponse :

Document complet, synthétique, dépassant même le cadre des questions posées.

Avez-vous connaissance de recommandations en cours d'élaboration ? Si oui, quelle est la date de publication prévisionnelle et présentent-elles d'autres algorithmes que ceux présentés dans les recommandations analysées dans l'argumentaire ?

E5

Réponse :

Non.

Souhaitez-vous émettre un commentaire complémentaire ?

E6

Réponse :

Il serait souhaitable de recommander qu'en France métropolitaine :

1 : la prescription d'un diagnostic biologique de paludisme s'effectue sous la forme de « Recherche de paludisme » et non plus « FS » ou « FS/GE », puisqu'il ne s'agit là que de

subtilités techniques spécialisées, potentiellement variables selon les circonstances ou les sites ;

2 : l'obligation soit faite pour les laboratoires souhaitant inscrire la recherche de paludisme dans leur catalogue (document obligatoire en termes d'accréditation) de pouvoir réaliser les 3 examens (FS, GE, TDR) et d'être habilité pour le rendu et l'interprétation des résultats (réalisation régulière de contrôle de qualité), ou sinon, de disposer d'un circuit accrédité permettant de transmettre le prélèvement en urgence vers un centre habilité pour une telle recherche.

Annexe 9. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de la Société de médecine des voyages (SMV)

A–Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG), aussi appelés tests TDR

Cet examen a-t-il actuellement sa place dans une stratégie de diagnostic du paludisme ?

Réponse :

A1

*Oui, impérativement, car retire une part importante de la subjectivité de la lecture des techniques classiques par des biologistes peu expérimentés. Sans entrer dans une distinction formalisée qui serait bien difficile à faire, il faut distinguer les sites ou laboratoires ayant une expertise du paludisme (qui reste une maladie rare) et ceux n'en ayant pas car rarement confrontés au diagnostic (ou laboratoire de garde – nuit/jours fériés - avec biologistes non parasitologues). Il est par contre important d'avoir recours à des tests mettant en évidence au moins deux Antigènes plasmodiaux et permettant la distinction *P. falciparum* – « *P. non falciparum* ».*

Doit devenir obligatoire dans l'analyse « Recherche de paludisme ».

Si oui, quelle est sa position vis-à-vis des examens microscopiques (frottis mince et goutte épaisse) ?

Réponse :

2 options :

1/ systématique en complément des deux techniques de référence ;

2/ 2 situations :

A2

- sites ou laboratoires ayant une expertise : en seconde ligne dans les situations où l'examen microscopique ne permet de distinguer les espèces ; ou si suspicion de résultat faussement négatif (paludisme décapité) ;
- sites ou laboratoires de faible expertise ou laboratoire de garde : en 1^{ère} ligne avec frottis ou goutte épaisse si positif (confirmation et évaluation de la parasitémie). Dans cette hypothèse chaque laboratoire se situerait dans l'une ou l'autre des 2 situations.

Quelle(s) espèce(s) de *Plasmodium* doivent être reconnues par cet examen ? S'il s'agit de plusieurs espèces, le résultat doit-il être discriminant ?

Réponse :

A3

- *P. falciparum* et espèces non *falciparum*

- discrimination : idéalement oui même si ça n'apparaît pas absolument indispensable notamment dans les sites ou laboratoires de faible expertise ou laboratoire de garde.

Idéalement toutes devraient être détectées et si possible de façon discriminante.

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis (F) et goutte épaisse (GE)) sont négatifs pour tout *Plasmodium* ?

A4

Réponse :

Oui : faible parasitémie non identifiable en MO (difficulté de lecture d'une GE) ; même si

les performances des TDR sont proches de celles de la GE, il n'est pas rare qu'un F-GE soit négatif et le TDR positif.

Surtout vrai pour *P. falciparum* (performances moins bonnes pour les autres espèces).

Réf. : Larréché S, Rapp C, Delacour H, Sanmartin N, Ficko C, Bigaillon C, Andriamanantena D, Pilo JE, Mérens A. Sensitivity of parasitological tests in imported *Plasmodium vivax* malaria in adults and impact of chemoprophylaxis and attack type. *J Travel Med.* 2014 May-Jun;21(3):195-200. doi: 10.1111/jtm.12116. Epub 2014 Mar 14.

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis et goutte épaisse) sont positifs à une espèce de *Plasmodium* autre que *falciparum* ?

A5 Réponse :

OUI, car la mise en évidence de HRP2, signe a priori la présence concomitante d'un *P. falciparum* associé non mis en évidence en raison d'une parasitémie faible ou, plus grave, redresse un diagnostic lors de la confusion des formes morphologiques de *P. falciparum* âgées avec *P. malariae* ou *P. vivax*.

Existe-t-il une différence sur les points précédents entre les zones non endémiques et endémiques du territoire français ?

A6 Réponse :

A priori non, compte tenu de l'épidémiologie actuelle dans des DOM « endémiques » à la limite près des zones (limitées) où la répétition des accès pourrait rendre délicate l'interprétation en cas d'une récurrence de la fièvre (persistance d'une antigénémie plusieurs semaines).

Avez-vous d'autres remarques au sujet de cet examen (avantages, inconvénients, résultat qualitatif/quantitatif, conditions de réalisation, possibilité de faux négatif pour *P. falciparum* suite à la délétion du gène des protéines HRP-2/3) ?

Réponse :

- avantages : simple, rapide, pas (peu) examinateur dépendant et demandant peu de formation, peu onéreux, pourrait dans certaines conditions et situations être fait au lit du malade par le clinicien (raccourcissement du délai réalisation du test/traitement) ;
- A7** - inconvénients : performances non supérieures au F-GE, faux positifs (notamment persistance de l'Ag résiduel sous traitement efficace) et faux négatifs possibles, pas d'évaluation quantitative (ou à la rigueur semi quantitative seulement), perte de l'expertise microscopique si venait à supplanter l'examen direct. Peu validé et/ou peu efficace pour *P. ovale* et *P. malariae* et doit donc continuer à être associé aux autres techniques.

Wurtz N, Briolant S, Lemarié D, Pommier de Santi V, Pascual A, Roodt T, Benoit N, Hupin C, Pradines B. Delayed diagnosis of *Plasmodium falciparum* in a soldier in Uganda: false-positive rapid diagnostic test associated with reduced repeats in *pfhrp2* *Med Sante Trop.* 2013 May 1;23(2):181-4. doi: 10.1684/mst.2013.0171.

B- Techniques de recherche directe de *Plasmodium* au microscope (frottis sanguin mince et goutte épaisse)

B1 Dans le cadre de la recherche d'un paludisme en urgence, il est préconisé, notamment par la recommandation française, d'avoir le résultat de l'examen dans

les 2 heures. Ceci est-il possible avec les techniques de recherche directe au microscope ? Si oui, à quelles conditions ?

Réponse :

Oui, à condition de ne comptabiliser que le temps arrivée au labo/rendu du résultat ; or le temps d'acheminement au labo est souvent très (trop) long.

Un délai global de 3 à 4 heures serait plus proche de la réalité médicale et logistique.

Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour garantir la qualité de ces techniques de lecture au microscope (prélèvement, transport, coloration, réalisation en elle-même, formation du microscopiste...) ?

B2

Réponse :

C'est la base même de ces techniques et c'est ce qui explique tout l'intérêt du TDR qui, lui, est moins « technique-dépendant ». Ces techniques morphologiques ne sont lisibles et interprétables que si la qualité est impeccable d'un bout à l'autre de la réalisation.

La réponse à cette question relève de l'accréditation.

Le frottis et la goutte épaisse doivent-ils être réalisés simultanément ou l'un après l'autre ? Dans cette seconde hypothèse, dans quel ordre et suite à quel résultat du premier examen réalisé ?

Réponse :

2 options :

B3

- frottis d'abord, puis GE si négatif (pas de GE si frottis positif) ;

- goutte épaisse d'emblée (mais technique et lecture plus difficile si expérience limitée), puis frottis si difficulté d'identification d'espèce.

Les parasitologues préfèrent souvent réaliser le frottis et la goutte épaisse dans le même temps.

(à noter qu'il peut y avoir de rares cas de GE négative et frottis positif dans des parasitémies très faibles impliquant des trophozoïtes jeunes pouvant se décoller).

Ce schéma diagnostique est-il différent en zone d'endémie et pourquoi (conditions de réalisation, formation du microscopiste, ...) ?

B4

Réponse :

En zone d'endémie française d'outre-mer : non.

En zone d'endémie « non française » : oui, car problématiques différentes, moyens logistiques différents.

Le frottis mince et/ou la goutte épaisse sont-ils utilisés pour effectuer le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, à quel moment, à quelle fréquence de réalisation ?

B5

Réponse :

Oui à J3, J7, J28 et plus souvent, si forme grave (notamment au début et en prenant en compte une possible élévation paradoxale de la parasitémie sans valeur pronostique péjorative) ou si évolution défavorable.

Quelle est la durée moyenne de réalisation totale (préparation, lecture...) d'une goutte épaisse, d'un frottis et de la recherche des protéines par ICG ?

B6

Réponse :

- frottis : 30 à 40 mn (lecture de 20 mn avant de rendre négatif) ;

- GE : 20 à 30 mn ;
- TDR : 10 à 15 mn.

C – Recherche d'anticorps sériques

Quelles sont les indications actuelles de la recherche d'anticorps sériques anti-*Plasmodium* ?

C1

Réponse :

*Diagnostic rétrospectif ; paludisme viscéral chronique évolutif ; (à visée épidémiologique).
Jamais en diagnostic d'une fièvre aiguë.*

En dehors du diagnostic clinique : dépistage en banque du sang / don d'organe.

Cette recherche a-t-elle une place dans le suivi de l'efficacité d'un traitement antipaludique ? Si oui, quand et à quelle fréquence ?

C2

Réponse :

Aucune place.

Les indications de la sérologie sont-elles différentes entre zones endémiques et non endémiques ?

C3

Réponse :

Oui, intérêt nul à limité en zone d'endémie du fait de la prémunition : ceci étant, l'évolution épidémiologique favorable dans les DOM endémiques (Guyane et Mayotte), et si elle se poursuit, va rendre caduque à terme cette réserve.

Quelle(s) technique(s) sérologique(s) sont validées aujourd'hui ? Quelle(s) technique(s) sont obsolète(s) ?

C4

Réponse :

IFI, deux trousse commercialisées, et ELISA.

L'électrosynérèse ne semble plus devoir être retenue, compte tenu du manque de standardisation des antigènes.

D – Autres questions

Quelle(s) sont les situations évocatrices d'un paludisme et devant entraîner une investigation biologique, en zone non endémique ?

D1

Réponse :

*- toute fièvre ou histoire de fièvre récente si retour (ou séjour) en zone de transmission ;
par extension, toute sensation fébrile avec troubles digestifs et/ou malaise si retour (ou séjour) en zone de transmission ;*

- toute fièvre ou histoire de fièvre récente associée à une thrombopénie +/- absence d'hyperleucocytose chez un patient vivant à proximité d'un aéroport ou d'un port.

Quelle est la stratégie diagnostique actuellement mise en œuvre en France métropolitaine pour détecter un paludisme en urgence ? Quel est son rationnel (performances techniques, accessibilité de la technique, ...) ?

Réponse :

D2

Histoire clinique compatible (cf. supra), a fortiori si renforcée par des anomalies biologiques non spécifiques (thrombopénie, absence d'hyperleucocytose, anémie même minime, hyperbilirubinémie libre) → F et/ou GE +/- TDR.

En pratique, beaucoup de centres non spécialisés et laboratoires multidisciplinaires de garde font un débrouillage au TDR : si +, poursuite par F et/ou GE (parfois seulement le lendemain) ; si négatif, arrêt des investigations.

Les tests parasitologiques sont à refaire dans les 12 à 24 heures en l'absence de diagnostic alternatif.

Pensez-vous que les situations de certains DOM, en particulier la Guyane et Mayotte nécessitent des modalités de diagnostic et de suivi différentes en tant que zones de potentielle endémie ? Précisez lesquelles et avec quelle(s) technique(s).

D3

Réponse :

L'évolution épidémiologique va plutôt dans le sens d'une stratégie identique avec la réserve que beaucoup de paludismes sont en fait importés de zones endémiques proches (notamment à Mayotte) ou le TDR peut être mis en défaut (faux + par Ag résiduel).

Quelles techniques sont à effectuer dans le cas de suspicion chez une femme enceinte ? A l'accouchement, la recherche du parasite est-elle à réaliser à partir du placenta, du sang du cordon, un autre prélèvement ? Si oui, avec quelles techniques ? Qu'en est-il pour le nouveau-né ?

Réponse :

D4

Mêmes techniques avec intérêt plus particulier des TDR (non validé dans le cadre du paludisme d'importation), du fait de la séquestration des GR parasités dans le placenta ; recherche sur sang du cordon (mais risque de contamination lors de l'accouchement) ou mieux sang du nouveau-né (à la naissance, à J4 et J14) / mêmes techniques (hors PCR puisque pas concernée par cette demande). Chez le nouveau-né, distinguer le paludisme congénital asymptomatique (hématies infectées de la mère) du rare paludisme congénital symptomatique (enfant infecté).

NB : apposition de placenta possible en cas de doute diagnostic chez la mère, mais souvent plus à titre de documentation d'un dossier ; suivi clinique de l'enfant, d'autant plus s'il s'agit d'une primipare, et d'autant plus s'il s'agit d'une mère « naïve » pour le paludisme (Expatriée, touriste, ...).

La littérature cite les techniques d'amplification génique (PCR/LAMP) pour le diagnostic du paludisme : quelle est la place actuelle de ces techniques ?

Réponse :

D5

Permet de détecter des parasitémies beaucoup plus basses que les autres techniques = intérêt théorique dans le paludisme décapité ; en pratique compte tenu de la lourdeur des techniques actuelles, intérêt limité en routine.

C'est donc réservé pour l'instant au CNR ou à quelques centres très spécialisés (équipe de recherche...) dans l'étude des cas problématiques : dissociation des différentes techniques ou dissociations clinico-biologiques, problème d'identification d'espèces, ...

L'apparition de kit d'extraction-amplification en temps réel permet d'envisager à moyen terme leur usage en routine, en complément du FGE, notamment pour écarter avec

certitude un diagnostic de paludisme dans le diagnostic des fièvres ou dans le cadre du don d'organe.

Quel(s) sont les résultats(s) biologique(s) (nature, fréquence...) qui permettent de réfuter avec certitude un paludisme ?

D6

Réponse :

Dans l'absolu aucun ; en pratique une PCR faite dans de bonnes conditions et négative permet d'éliminer un paludisme avec une quasi-certitude. Ce n'est pas le cas des autres techniques (TDR, F-GE).

E-Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

Estimez-vous que le document transmis reflète les données publiées dans la littérature ?

Veillez préciser dans le cas contraire les données non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés pages 26-27 de l'argumentaire provisoire.

Réponse :

E1

Globalement oui, même si on peut toujours trouver des aspects secondaires discutables. Par ex. p. 10 : même si données en périphérie de la question posée, les facteurs de gravité évoqués ne prennent pas en compte les nouvelles données sur les déterminants génétiques du parasite et de l'hôte ; la notion de rythmicité différente selon les espèces est théorique et ne se rencontre guère en pratique (pas de synchronisation des cycles au début) ; p.33 : la persistance de l'Ag HRP2 peut excéder 21 jours.

Concernant les « Parties prenantes » (p31) : alors qu'il s'agit de rendre un avis très technique sur des méthodes de biologie parasitaire très spécialisées, le seul avis biologique est sollicité auprès d'un groupe de biologie « global » (CNP de biologie médicale) et non directement aux 2 Sociétés de biologie parasitaire que sont la Société française de Parasitologie et la collégiale Anofel qui regroupent tous les parasitologues. Même s'il est vrai que les professions de santé citées sont celles qui sont concernées par les résultats, les parasitologues auraient pu être sollicités es qualité.

Avez-vous connaissance de recommandations existantes non citées dans le rapport ?

E2

Réponse :

À ma connaissance, non.

L'analyse présentée dans ce rapport vous semble-t-elle cohérente, objective et précise ?

E3

Réponse :

Plutôt oui, mais le positionnement de l'HAS n'est pas encore affiché.

En termes de lisibilité et de forme du rapport provisoire, avez-vous des remarques ou propositions à faire ?

E4

Veillez préciser dans le cas contraire les éléments à clarifier.

Réponse :

Document plutôt très complet qui dépasse même le cadre des questions posées ; intérêt

des encadrés de synthèse.

Il ne semble cependant pas évident que ces questions techniques à propos du diagnostic biologique nécessitent obligatoirement la présence de tous ces rappels épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques, nécessaires principalement pour les personnes peu au fait de l'affection et qui auront donc du mal à apporter un avis circonstancié sur les aspects très techniques ...

Avez-vous connaissance de recommandations en cours d'élaboration ? Si oui, quelle est la date de publication prévisionnelle et présentent-elles d'autres algorithmes que ceux présentés dans les recommandations analysées dans l'argumentaire ?

Réponse :

E5

La SPILF a mandaté un groupe de travail pour actualiser les recommandations 2007 publiées en 2008, dans Médecine et maladies infectieuses. Le texte court qui comprend notamment un chapitre sur le diagnostic est bien avancé et devrait être disponible fin 2016 /début 2017. A priori les recommandations (sous forme de « Mise au point ») en matière de diagnostic ne devraient pas être très éloignées de ce qui ressort de l'argumentaire.

Souhaitez-vous émettre un commentaire complémentaire ?

Réponse :

E6

Il paraît important de bien prendre en compte la réalité de ce qui se fait et qui apparaît être assez décalé par rapport aux recommandations et la NABM (notamment très large utilisation des TDR) et de distinguer les laboratoires ayant une expertise en paludologie (pour être schématique les établissements de santé où existe spécifiquement une unité /service de parasitologie) des laboratoires polyvalents ou sans expertise en parasitologie où il est vraisemblable qu'un TDR utilisé en respectant les recommandations est plus efficace qu'un diagnostic microscopique fait par un examinateur peu expérimenté.

On pourrait recommander qu'en France métropolitaine :

1 : la prescription d'un diagnostic biologique de paludisme s'effectue sous la forme de « Recherche de paludisme » et non plus « FS » ou « FS/GE » puisqu'il ne s'agit là que de choix techniques spécialisés et, surtout, potentiellement variables selon les circonstances ou les sites.

2 : l'obligation soit faite pour les laboratoires souhaitant inscrire la recherche de paludisme dans leur catalogue (document obligatoire en terme d'accréditation) de pouvoir réaliser les 3 examens, et d'être habilité pour le rendu et l'interprétation des résultats (réalisation régulière de contrôle de qualité) ou sinon de disposer d'un circuit (accrédité) permettant de transmettre le prélèvement en urgence vers un centre habilité pour une telle recherche.

Annexe 10. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel - Fédération française d'infectiologie (CNP-FFI)

De: Christophe Strady
Envoyé: lundi 5 septembre 2016 18:53
À: HAS_SEAP_SECRETARIAT
Cc: 'Christian Rabaud'; 'France Roblot'; 'christophe rapp'; olivier.bouchaud
Objet: RE: Rappel: HAS - Consultation de la FFI-CNPI pour recueillir son point de vue sur l'évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium

Madame nous avons discuté avec le Pr Rabaud président du CNP infectiologie, du Pr Roblot présidente de la SPILF, du Pr Bouchaud président de la SMV et du Pr Rapp suite à votre demande auprès du CNP pour **recueillir son point de vue sur les actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium**

Le CNP d'infectiologie comprend notamment en son sein la SPILF, la SMV et le CMIT

Vous avez également sollicité la SMV pour répondre au même document.

Vous devez également savoir qu'une mise au point sur la prise en charge du paludisme d'importation est en cours avec un sous groupe spécifique pour le diagnostic biologique. Cette mise au point est organisée par le comité des recommandations de la SPILF. J'en ai la responsabilité en tant que membre du groupe recommandation avec un comité d'organisation comprenant notamment le Pr O.Bouchaud, PR C.Rapp, Pr E.Caumes et la responsable du CNR paludisme.

Les PR O.Bouchaud et C.Rapp ont déjà répondu à votre sollicitation au nom de la SMV (ils sont également membres de la SPILF et du CMIT autres composantes de notre CNP). Cette société savante, faisant partie intégrante du CNP des infectiologues : nous considérons après discussion les uns et les autres que cette réponse à toute légitimité pour représenter le CNP des infectiologues.

J'ai pu voir le texte qui est en parfaite adéquation avec notre texte de MAP en cours de relecture sur le diagnostic biologique.

Voici les éléments que nous tenions à vous transmettre

Cordialement

C.Strady

De : Christian Rabaud
Envoyé : vendredi 2 septembre 2016 12:31
À : HAS_SEAP_SECRETARIAT
Cc : Christophe Strady
Objet : Re: Rappel: HAS - Consultation de la FFI-CNPI pour recueillir son point de vue sur l'évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium

Bien reçu

Nous nous sommes saisi de cette question et il me semblait que le Pr Strady (en copie) vous avez adressé notre réponse – en lien avec celle de la société de médecine des voyages – membre aussi de notre CNP

Je laisse donc le Pr Strady apporté toute précision éventuelle

Restant à votre écoute

Pr Christian Rabaud
Président du Conseil National Professionnel – Fédération Française d'Infectiologie (CNP-FFI)
30 Boulevard Pasteur
75014 Paris

Annexe 11. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse de la Société française de biologie médicale (SFBC)

De : Marc DELPECH
Envoyé : dimanche 4 septembre 2016 11:55
À : HAS_SEAP_SECRETARIAT
Objet : RE: Rappel: HAS - Consultation de la SFBC pour recueillir son point de vue sur l'évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium

Bonjour,

J'ai eu beaucoup de mal à trouver un Collègue pour répondre à votre demande. Les vacances n'ont rien arrangé.

Finalement le Dr Nadine GODINEAU a accepté et elle devait m'adresser sa réponse vendredi dernier, mais je n'ai rien reçu. Cela sera sans doute lundi et je lui ai demandé de vous adresser directement sa réponse

Cordialement

Marc Delpech

De : Nadine Godineau
Date : 18 septembre 2016 à 17:13
Objet : Evaluation des actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium
À : veronique.daurat@has-sante.fr

Madame,

Je vous prie de m'excuser de n'avoir pu vous envoyer ce courrier plus tôt mais comme je vous le disais par téléphone, nous avons fait une réponse commune dans le cadre de la Société de Médecine des Voyages, réponse qui vous a été transmise par le Professeur O.Bouchaud, il y a déjà quelques semaines.

Toutefois, j'aurais souhaité ajouter quelques précisions au travail de synthèse qui vous est déjà parvenu, sur certains points plus techniques et que partagerons peut-être d'autres parasitologues:

A – Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG), aussi appelés tests TDR

Cet examen a-t-il actuellement sa place dans une stratégie de diagnostic du paludisme ? Si oui, quelle est sa position vis-à-vis des examens microscopiques (frottis mince et goutte épaisse) ?

Réponse :

Il semble effectivement important que les tests TDR restent toujours complémentaires des techniques microscopiques, car nous savons que même ceux qui sont les plus utilisés, peuvent parfois ne pas mettre en évidence l'antigène HRP2, nous avons un exemple dans un contrôle de qualité externe (CQE) récent où 36 % des utilisateurs du Binax Now Malariae n'ont pas mis en évidence le HRP2.

A2

La mise en place de 2 types de structure (sites ou laboratoires ayant une expertise et sites ou laboratoires de faible expertise ou laboratoire de garde) pourrait être intéressante avec un lien étroit des uns avec les autres, d'une part pour la formation continue, d'autre part pour qu'aucun diagnostic de paludisme ne puisse se faire qu'avec un simple test TDR. Se pose alors le problème du délai de rendu du résultat, le diagnostic du paludisme restant bien sûr un diagnostic d'urgence:

Quelle(s) espèce(s) de *Plasmodium* doivent être reconnues par cet examen ? S'il s'agit de plusieurs espèces, le résultat doit-il être discriminant ?

Réponse :

Une détection totale et discriminante des différentes espèces serait effectivement l'idéal, mais il est plus probable que seules les techniques de PCR (kit en temps réel) ont une sensibilité et une spécificité leur permettant une discrimination entre les différentes espèces autres que *P.falciparum*.

A3

Le diagnostic différentiel entre *Plasmodium falciparum* et autres *Plasmodium non falciparum* pourrait s'effectuer dans un 1^{er} temps et le diagnostic précis de l'espèce dans un 2^e temps par un laboratoire plus spécialisé.

Toutefois cette organisation demanderait une vigilance accrue des médecins de ville sur la bonne thérapeutique et surtout sur la compliance des patients dont dépend l'évolution vers la guérison, et non vers la forme grave. Il n'est pas rare de voir des patients arrivés avec un diagnostic établi en ville, mais un traitement insuffisant, parce qu'il n'a pas bien compris les posologies ou par simple négligence il n'a pris qu'un traitement partiel. Une thèse de pharmacie en cours à l'hôpital de Saint-Denis met clairement en évidence la méconnaissance totale de beaucoup de patients du caractère de gravité « potentiellement mortel » du paludisme.

La réalisation d'un TDR présente-elle un intérêt lorsque les examens microscopiques (frottis (F) et goutte épaisse (GE)) sont négatifs pour tout *Plasmodium* ?

Réponse :

A4

Régulièrement certains patients se présentent avec des symptômes évocateurs de paludisme, un frottis et une goutte épaisse négatifs et un TRD positif. Il n'est pas rare dans ce cas d'apprendre qu'ils reviennent d'une zone tropicale où ils ont été (plus ou moins bien) traités et ce qui parfois nécessite de compléter ou même de reprendre le traitement donné.

Avez-vous d'autres remarques au sujet de cet examen (avantages, inconvénients, résultat qualitatif/quantitatif, conditions de réalisation, possibilité de faux négatif pour *P. falciparum* suite à la délétion du gène des protéines HRP-2/3) ?

Réponse :

A7

Il ne paraît pas souhaitable de laisser au clinicien la responsabilité de l'antigénémie, non pour des raisons de compétence (ces tests sont très faciles à mettre en œuvre), mais d'une part pour toutes les difficultés d'interprétation des faux positifs, faux négatifs que n'aura pas obligatoirement à l'esprit un praticien traitant une urgence, d'autre part, parce que le délai de lecture est précis (15 minutes par ex. pour binax). Il faudra obligatoirement compléter le diagnostic biologique au laboratoire, et ce diagnostic partiel sera probablement souvent refait. Ce mode de diagnostic partiel risque ainsi d'être peu économique et comporte des risques d'interprétation.

B – Techniques de recherche directe de *Plasmodium* au microscope (frottis sanguin mince et goutte épaisse)

B3

Le frottis et la goutte épaisse doivent-ils être réalisés simultanément ou l'un après l'autre ? Dans cette seconde hypothèse, dans quel ordre et suite à quel résultat du premier examen réalisé ?

Réponse :

Sur le plan technique, il est plus facile d'effectuer les colorations des gouttes épaisses au cours du 2^d temps de coloration des frottis (Giemsa). La lecture des gouttes épaisses est plus délicate, mais elle apporte plus d'informations, car c'est une technique de concentration.

Avant d'affirmer la négativité les lames de frottis (2) et de gouttes épaisses (2) doivent être lues.

Quelle est la durée moyenne de réalisation totale (préparation, lecture...) d'une goutte épaisse, d'un frottis et de la recherche des protéines par ICG ?

B6 Réponse :

Les temps indiqués par le Pr Bouchaud ne concernent que les lectures, il faut, avant les lectures, étaler les lames, les laisser sécher et effectuer les lectures.

D – Autres questions

Quelle est la stratégie diagnostique actuellement mise en œuvre en France métropolitaine pour détecter un paludisme en urgence ? Quel est son rationnel (performances techniques, accessibilité de la technique, ...) ?

D2 Réponse :

Chacune des techniques frottis, goutte épaisse et ICG sont nécessaires et se complètent mutuellement. Elles participent ensemble à un diagnostic le plus exact possible dans un délai le plus court possible.

La littérature cite les techniques d'amplification génique (PCR/LAMP) pour le diagnostic du paludisme : quelle est la place actuelle de ces techniques ?

D5 Réponse :

Les kits d'extraction amplification génique sont très intéressants, mais on peut y voir 2 failles: leur prix (trop élevée par rapport aux techniques actuellement utilisée) et le grand risque d'une perte progressive des compétences. On sait que pour être performant, il faut regarder des lames de frottis et de goutte épaisse régulièrement, sinon on perd rapidement cette compétence. Or, je ne crois pas que l'on regardera aussi attentivement une lame si on a un diagnostic fait par PCR.

Souhaitez-vous émettre un commentaire complémentaire ?

E6 Réponse :

Je n'ai pas d'autres remarques à rajouter si ce n'est que le diagnostic du paludisme devrait être bien encadrés pour ne pas perdre l'intérêt majeur du recueil des dossiers épidémiologiques des nouveaux cas de Paludisme que nous remplissons et qui sont pour le centre national source de préparation des nouvelles zones de chimiorésistance qui elles serviront pour les praticiens prescrivant la chimio prophylaxie.

Annexe 12. Compte-rendu de l'audition du Centre National de Référence du paludisme (CNR paludisme)

Type de réunion : audition de partie prenante

Titre : *Évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium*

Date : 23 septembre 2016

CNR paludisme représenté par :

Professeure Sandrine HOUZÉ, responsable du CNR du paludisme, Service de Parasitologie-Mycologie, GH Paris Nord - hôpital Bichat (AP-HP) 75018 Paris.

Docteur Marc THELLIER, Pole Infection, Immunité, Inflammation, GH Pitié Salpêtrière (AP-HP) 75013 Paris.

Les représentants du CNR ont dans un premier temps donné les points clés et expliqué les problèmes spécifiques du diagnostic du paludisme en France.

Un élément indispensable qu'il faut avoir à l'esprit vis-à-vis des questions posées est que la France métropolitaine est de loin le premier pays occidental en termes de paludisme d'importation et que celui-ci est en augmentation (+ 35 % en 4 ans), les derniers chiffres consolidés du CNR faisant état de 4750 cas estimés pour l'année 2015. Pour la France ultramarine, le paludisme est encore endémique dans deux territoires à Mayotte et en Guyane. En dépit d'une diminution du nombre de cas autochtones, le paludisme n'y est pas encore éradiqué, principalement du fait des flux migratoires avec les pays voisins. La Grèce connaît assez régulièrement des alertes de cas autochtones (réintroduction) ; la présence de *P. knowlesi* s'intensifie en Asie (alors qu'aucun kit d'immunochromatographie (ICG) par test de diagnostic rapide (TDR) ne l'identifie spécifiquement : les kits peuvent être négatifs, ou positifs avec un antigène commun ou celui de *P. vivax*).

En France, le paludisme n'est pas toujours compris comme une urgence vitale absolue par les cliniciens ou les biologistes médicaux. Si le diagnostic n'est pas réalisé rapidement, un sujet cliniquement peu symptomatique infecté par *P. falciparum* peut s'aggraver de manière très brutale. Ceci est dû à un mécanisme physiopathologique d'hypoxie cellulaire entraînant une défaillance souvent brutale des organes (par cyto-adhérence des hématies parasitées sur les cellules endothéliales des capillaires) pouvant aboutir très vite à la mort (environ 20 décès annuels). Des facteurs de risque de gravité orientent la prise en charge du paludisme à *P. falciparum* : parmi eux, la parasitémie avec la limite définissant un accès grave fixée à 4 % d'hématies parasitées. La mesure de la parasitémie sur le frottis sanguin (FS) est dépendante de la méthode employée pour le comptage (approximation plus ou moins grande du nombre de globules rouges par champ microscopique examiné) et de l'expérience du microscopiste. Ceci génère une certaine imprécision : ainsi, un taux calculé de 3,9 % ou de 4,1 % ne conduit pas à la même prise en charge, avec un traitement *per os* possiblement en ambulatoire dans le premier cas, et une indication à un traitement intraveineux en réanimation dans le second cas.

A. Données pratiques sur les techniques de recherche directe de Plasmodium au microscope (frottis sanguin mince et goutte épaisse)

Les techniques de référence de la recherche du paludisme sont microscopiques : frottis sanguin mince (FS) et goutte épaisse (GE), qui doivent être réalisées par une personne entraînée. Le frottis sanguin est un examen de recherche des éléments anormaux dans le sang largement pratiqué (seuil de détection estimé entre 150 et 200 parasites / μ l), alors que la GE est spécifique à la recherche du paludisme. Elle permet d'augmenter de 10-15 % la sensibilité analytique de la re-

cherche au microscope (seuil de détection estimé entre 5 et 20 parasites/ μ l) par rapport au FS. Les deux techniques identifient les espèces et les stades parasitaires pour chaque espèce. Mais l'ensemble du processus de la technique de GE n'est pas standardisé, sans système de contrôle de qualité / bonnes pratiques de réalisation pour chacune des étapes (sang veineux ou capillaire, volume du sang, séchage, lyse, coloration). Un contrôle de qualité externe (CQE) propose la GE dans son catalogue, mais les lames envoyées sont déjà préparées et colorées et présentent des situations trop simples (test clairement négatif ou très positif). La qualité des colorants et de la coloration est un autre élément indispensable à la maîtrise de cet examen décrit dans les dernières recommandations du Comité qualité (QUAMIC) de la Société française de microbiologie.

La difficulté rencontrée est maintenant aussi organisationnelle : une automatisation générale s'est installée en hématologie comprenant 1 heure pour les colorations. Or, ces colorations automatisées ne sont pas appropriées à la recherche de *Plasmodium* dont la préparation et la lecture des lames restent manuelles, mobilisant du personnel technicien et biologiste. Aussi, certains LBM font en premier lieu un TDR, ce qui n'est pas une bonne pratique en raison essentiellement du manque de sensibilité de cette technique.

Le CNR fournit les données d'une enquête menée avec l'ANSM concernant l'année 2013 qui a eu 87,2 % de taux de réponses (986 / 1131 LBM) : les laboratoires, situés en métropole, ont déclaré réaliser à 100 % un FS, à 82 % un test TDR d'ICG et à 57 % une GE (plusieurs techniques sont utilisées pour un même cas). Parmi ces LBM, 43,7 % n'ont diagnostiqué aucun cas de paludisme dans l'année [367 LBM de ville (53,5 %) et 64 hospitaliers (21,3 %)]. Dans les années 2010-2011, la courbe de fréquence de réalisation entre GE et TDR s'est inversée et le nombre de LBM en capacité de réaliser une GE de diagnostic du paludisme est en nette diminution. Avec la réforme de la biologie médicale, un regroupement des LBM est constaté, ce qui est susceptible d'augmenter le niveau de qualité par la présence de spécialistes en leur sein. *A contrario*, les temps de transports obèrent la possibilité d'obtention des résultats en urgence, alors que pour le paludisme, le délai à respecter est actuellement de 2 heures. Pour rappel, dans la législation, le LBM qui reçoit le prélèvement est responsable des résultats, même s'il ne réalise pas lui-même l'analyse.

Dans certains groupes hospitaliers, une organisation avec deux niveaux de compétence s'est mise en place : tous les établissements ne font pas la GE par manque de compétence, mais ils associent systématiquement en première intention un FS et un TDR. Un tube est systématiquement envoyé à l'établissement expert du paludisme dans leur groupement, qui rend les résultats de GE en 24 heures minimum. L'alternative à la GE proposée par l'OMS est de préparer 4 lames de FS au lieu d'une et de lire 800 champs de 200 hématies au moins pour obtenir une sensibilité équivalente à celle de la GE (durée d'un FS avec 4 lames / 800 champs : 30 min par une personne très entraînée), ce qui a été mis en place dans certains hôpitaux en France.

B. Recherche des protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie (ICG)

Si la GE n'est plus largement réalisée, considérant la sécurité à maintenir vis-à-vis de la létalité de *P. falciparum*, un des deux représentants du CNR expose que seule une technique qui aurait une sensibilité équivalente à la GE pourrait être la nouvelle technique de référence et les deux participants indiquent que ce n'est pas le cas de l'ICG.

L'ICG est une technique d'appoint pour affiner l'identification d'une espèce, mais pas de première intention pour éliminer un diagnostic de paludisme. Seules la GE ou la PCR permettent d'écartier ce diagnostic, du fait de leur sensibilité analytique élevée. Toutefois, sur la base des données actuelles, les PP considèrent qu'une recherche de paludisme associant conjointement un FS et une ICG couvre au moins 90-95 % des cas de paludisme rencontrés en France. En effet, les cas de faux négatifs avec cette combinaison semblent rares, comme l'indiquent les données de l'étude du CNR (2013), avec moins de 2 % de discordance retrouvée - GE positive et TDR négatif -, qui correspond le plus souvent à une faible parasitémie ou à une espèce autre que *P. falciparum*. Dans ce cas de figure, il n'y a habituellement pas d'urgence pour un traitement immédiat d'un

éventuel paludisme et il est licite d'attendre les résultats de la GE pour conclure (sauf si le TDR est un faux négatif à *P. falciparum*) ; il faut répéter les examens à 24-48 heures si le doute diagnostique persiste au regard de la clinique.

Un des deux représentants du CNR souligne que les centres référents ont l'obligation de maintenir la réalisation de la GE et leur niveau de compétence sur la technique, puisqu'elle reste la mieux adaptée dans les délais de l'urgence (sensibilité, spécificité, stades parasitaires).

L'ICG est commercialisée sous de nombreux noms de marque dans des tests rapides dits « TDR ». Il existe des différences dans les résultats entre fabricants pour un même Ag et il faudrait raisonner par Ag cible et par fabricant, ensuite pour un fabricant par lots, car les performances d'un TDR donné peuvent varier dans le temps selon les lots. Avec l'internationalisation de la fabrication des différents composants présents dans un DMDIV (Inde, Australie, ...), la traçabilité est parfois difficile à établir, tout comme l'obtention de précisions techniques. De plus, l'humidité et les fortes températures peuvent altérer les TDR du paludisme. En France, un LBM a l'obligation de faire un contrôle sur chaque nouveau lot qu'il reçoit et il est soumis à un CQE périodique.

Les évaluations de pré-qualification de l'OMS sont perfectibles, car au vu d'une étude réalisée par le CNR, les échantillons de contrôle sont parfois en décalage au regard des performances revendiquées par le fabricant, en particulier pour leurs échantillons de contrôles congelés de *P. vivax*. Elles ne peuvent seules constituer une référence opposable.

Les tests TDR pour identifier *P. malariae* et *P. ovale* (Ag cible commun) ne présentent pas encore des performances satisfaisantes, et le biologiste doit tenir compte de l'existence de faux négatifs et faux positifs avec les TDR dans sa stratégie diagnostique. Sur le plan de l'analyse des données, il faut une certaine habitude pour bien interpréter des ICG qui contiennent plusieurs Ac spécifiques d'Ag cibles, dont certains sont ubiquitaires dans le genre et d'autres spécifiques d'une espèce. Le biologiste doit préciser lors du rendu des résultats d'une ICG, le résultat Ag cible par Ag cible avec l'interprétation correspondante.

L'utilité d'une ICG par TDR, lorsque le FS et la GE sont positifs est, selon le CNR, intéressante en particulier en cas de co-infections par plusieurs espèces, car le diagnostic différentiel d'espèces n'est pas toujours facile à faire au microscope dans la mesure où certaines formes parasitaires peuvent être confondues ou ignorées lorsqu'elles sont très minoritaires. L'ICG ciblant l'Ag HRP-2 peut être plus spécifique pour *P. falciparum* que les techniques microscopiques, ce qui peut conforter la recherche au microscope en cas de doute d'espèce pour affirmer le diagnostic d'espèce(s) et permettre une thérapie adaptée. L'utilité de l'ICG, lorsque le FS et la GE sont négatifs, concerne le paludisme décapité par un traitement médicamenteux (prophylaxie mal conduite ou traitement curatif dans le mois précédent). Néanmoins, les propositions de la demande précisant uniquement ces deux conditions d'utilisation d'une ICG sont trop restrictives (voir ci-dessous). À l'époque (il y a 5 ans pour la demande préparée avec les professionnels), la crainte était que les TDR supplantent les techniques microscopiques et que l'expérience sur la pratique de la GE se perde.

La responsable du CNR souligne que la biologie délocalisée³⁵ est entrée dans la réglementation française, mais que pour la recherche du paludisme, un seul LBM doit réaliser les deux actes, c.-à-d. FS et ICG, en parallèle, et élaborer son interprétation basée sur le résultat des deux techniques, afin de garder une cohérence et une garantie de qualité dans l'analyse des données du diagnostic biologique. Sont les plus utiles dans un diagnostic d'urgence les tests d'ICG comportant une recherche de l'Ag cible HRP-2 spécifique de *P. falciparum*, de très bonne sensibilité pour sa détection (comprise entre la GE et le FS), avec des résultats lisibles dans les 15 min. Les mutations de

³⁵ Arrêté du 13 août 2014 fixant les catégories de professionnels de santé autorisés à réaliser des prélèvements d'échantillons biologiques aux fins d'un examen de biologie médicale et la phase analytique de l'examen de biologie médicale en dehors d'un laboratoire de biologie médicale, ainsi que les lieux de réalisation de ces phases.

Arrêté du 1^{er} août 2016 déterminant la liste des tests, recueils et traitements de signaux biologiques qui ne constituent pas un examen de biologie médicale, les catégories de personnes pouvant les réaliser et les conditions de réalisation de certains de ces tests, recueils et traitements de signaux biologiques.

la protéine HRP-2 identifiées en Amérique du Sud et en Asie peuvent entraîner des faux négatifs pour les ICG ciblant cet Ag. Cependant, ces mutations n'affectent pas ou de manière très marginale les souches africaines qui présentent historiquement une plus grande diversité génétique. Or, dans le paludisme d'importation en France, la primauté des souches africaines fait que ce risque de faux négatif n'est pas à l'heure actuelle très prégnant, selon le CNR. La préoccupation première dans la recherche d'un paludisme est de ne pas passer à côté d'un *P. falciparum* ; aussi, il convient, en complément du FS :

- de choisir un kit ciblant au minimum deux Ag, dont toujours l'HRP-2, pour détecter en premier lieu et spécifiquement *P. falciparum*. Selon les données actuellement disponibles, le deuxième Ag peut être une pLDH (pan) ou l'aldolase (pan) [A noter que de nouveaux tests en cours de validation ont de meilleures performances] ;
- de choisir de compléter le résultat du FS réalisé en urgence par l'association de deux TDR ciblant l'Ag-HRP2 pour l'un et l'Ag Pf pLDH également spécifique de *P. falciparum* pour le second, afin de renforcer la sensibilité et la spécificité du diagnostic de *P. falciparum* ;
- si l'on choisit un TDR avec trois bandes d'Ag, de sélectionner un kit ciblant deux Ag de *P. falciparum* (pf pLDH) et un Ag commun au genre comme l'aldolase ou la pLDH.

Pour les raisons développées ci-dessus et considérant le principe de réalité, l'ICG est une technique qui a sa place dans les techniques à prendre en charge par la NABM, mais elle ne doit pas être utilisée seule pour cette indication (diagnostic de paludisme en urgence). Le diagnostic microscopique doit rester la technique de référence. Pour une infection par *P. falciparum*, la connaissance des stades parasitaires circulants (trophozoïtes, schizontes, gamétocytes) et la valeur de la parasitémie des stades asexués sont indispensables pour décider de la stratégie thérapeutique. Ainsi, comme indiqué précédemment, les données du FS sont nécessaires et ce dernier doit être débuté en parallèle et sans attendre les résultats de l'ICG effectuée par TDR. La proposition du CNR est de ne pas faire de l'ICG un acte isolé à la NABM et de préciser ces éléments dans le libellé. Le libellé proposé « Recherche de protéines plasmodiales dans le sang par immunochromatographie » est à garder en ajoutant « technique complémentaire à l'examen microscopique », mais les deux conditions de mise en œuvre proposées par l'assurance maladie ne sont pas à spécifier, le recours à l'ICG est à laisser à la discrétion du biologiste (indiquer que l'on peut y faire appel, en dehors des situations de routine (garde par interne, ...) ou en zone d'endémie).

C. Autres méthodes

La biologie moléculaire (PCR) ne fait pas partie de la demande de la CNAMTS, et c'est la raison pour laquelle ces techniques ne sont pas détaillées dans l'argumentaire HAS. Le CNR rappelle qu'elle est inscrite au RIHN et qu'il est encore prématuré de l'inscrire dans la NABM, car sa pratique est encore non standardisée et son interprétation délicate, nécessitant un dialogue clinico-biologique approfondi. Ainsi, en cas de PCR positive, dans tous les cas, il est important de déterminer le stade de la maladie par microscopie (visualisation des stades parasitaires dont les gamétocytes non pathogènes) et de quantifier la parasitémie qui est un élément indispensable pour les cliniciens pour décider la prise en charge thérapeutique adaptée.

Dans les techniques actuellement proposées pour *Plasmodium*, la PCR n'est pas quantitative et n'identifie pas le stade. Il faudrait rechercher l'ARN parasitaire, mais il est très instable dans le prélèvement et très souvent perdu lors des extractions. Pour obtenir une PCR quantitative, il faudrait surmonter les difficultés liées aux cycles parasitaires. En effet, pour avoir une bonne sensibilité, il faut cibler des gènes répétés dans le génome, mais pour *Plasmodium*, la répétition est variable selon l'espèce. De surcroît, une hématie peut être contaminée par vingt cellules du parasite (schizonte) qui s'y est multiplié, et la PCR comptera vingt noyaux parasitaires, alors que le comptage en microscopie sera d'une hématie parasitée.

La place de la PCR faite dans les LBM spécialisés n'est pas encore déterminée dans la stratégie. Elle peut être très utile dans un contexte clinico-biologique difficile : dans les portages chroniques asymptomatiques avec de très faibles charges parasitaires, dans le *paludisme viscéral évolutif*

(PVE) et dans des co-infections, lorsqu'une discordance est relevée avec les techniques directes de diagnostic (du type une ICG avec HRP-2 positive et un frottis identifiant une autre espèce que *P. falciparum*, à cause de morphologies peu spécifiques). À terme, si sa qualité s'améliore, elle pourrait devenir le premier test à réaliser pour exclure un diagnostic de paludisme, avant toute recherche microscopique, compte tenu de sa très grande sensibilité analytique. Dans le cadre du dispositif RIHN, l'étude clinique à mettre en place pourra répondre à plusieurs des questions posées sur l'utilité clinique / indications de la PCR et sa standardisation.

Par ailleurs, une détection est possible avec les automates d'hématologie qui repèrent une diffraction due au pigment malarique fabriqué au cours de la croissance parasitaire et mesurent également de l'ARN et de l'ADN parasitaire dans le globule rouge. Des alarmes peuvent permettre de signaler la présence de ces éléments, et donc rattraper un diagnostic de paludisme qui n'aurait pas été envisagé par le clinicien. Toutefois, le trophozoïte jeune de *P. falciparum* a très peu de pigment et un petit noyau, il est donc moins facilement détectable par ces systèmes automatisés, ce qui n'est pas satisfaisant pour une technique de première intention.

D. Recherche d'anticorps sériques

Pour les techniques existant dans la recherche des Ac spécifiques des Plasmodium, le CNR confirme que l'électrosynérèse n'est plus utilisée en pratique courante, car cette technique est spécifique, mais peu sensible. L'IFI n'est pas automatisable et n'est pas réalisée dans les LBM de 1^{ère} ligne en ville ; un seul fabricant la commercialise, mais plusieurs ruptures de stock sont à déplorer. Les techniques immuno-enzymatiques ont un coût élevé pour les LBM ne pratiquant que peu de tests (du fait des indications limitées, diagnostic rétrospectif et PVE), car les réactifs périssent très vite, aussi beaucoup de LBM sous-traitent cette analyse. Le seul kit ELISA commercialisé possède des performances moyennes, et des techniques « maison » sont réalisées par les LBM spécialisés en parasitologie (dont les laboratoires des deux représentants du CNR). Il existe des communautés antigéniques entre espèces de *Plasmodium* avec des réactions croisées probables dans les tests immuno-enzymatiques, ce qui permet de couvrir tous les besoins. Pour l'accréditation, les LBM ne vont probablement choisir chacun qu'une seule technique de recherche d'Ac dans un souci de simplification.

Les résultats de la recherche d'Ac sont quantitatifs, mais sont rendus en qualitatif : positif ou négatif. Toutefois pour le PVE, le titre élevé en Ac conforte le diagnostic, dans un tableau clinique compatible comprenant une splénomégalie, une anémie et une thrombopénie, ainsi qu'une charge parasitaire faible.

Le CNR indique qu'en France, pour les greffes de moelle osseuse, une sérologie palustre du donneur est prévue dans les contrôles de qualification de la greffe. C'est donc une indication de la recherche d'Ac du paludisme, en plus de celles déjà citées dans l'argumentaire comme le don de sang.

Depuis qu'il est possible de détecter des Ag dans le sang, le terme sérodiagnostic est devenu ambigu. Le CNR préconise d'utiliser le terme « détection indirecte du paludisme par recherche d'Ac » et de ne pas préciser de techniques à utiliser, comme cela est proposé dans la demande de l'assurance maladie.

E. Analyse des recommandations sélectionnées par la HAS dans l'argumentaire et le contexte français

Le CNR indique que les différences pointées dans les recommandations analysées dans l'argumentaire s'expliquent par les variations des textes régissant la pratique et l'organisation de la biologie entre les pays, y compris en Europe. Il est important de souligner dans le chapitre décrivant les préconisations à l'international, la première place de la France dans le paludisme d'importation, avec chaque année environ 5 millions de voyageurs vers les zones d'endémies selon les données de la Direction générale de l'aviation civile (DGAC), 50 000 demandes de dia-

gnostic et presque 5 000 cas avérés par an, ce qui justifie des exigences plus grandes par rapport à d'autres pays pour son diagnostic. En France métropolitaine, un biologiste doit toujours être présent dans un LBM et la compétence sur le diagnostic du paludisme est inscrite dans les pré-requis professionnels. Il peut y avoir plus de difficultés pendant les heures de garde.

La HAS indique que la littérature ne répond pas à la question de la recherche du paludisme sur les greffons. Pour les dons d'organes solides, le risque de transmission est plus grand pour le rein et le cœur, selon le CNR. En cas de suspicion de voyage du donneur en zone d'endémie, un FS et une GE sont réalisés et un traitement du receveur est mis en route en cas de positivité. Des conservations d'échantillons sont prévues sur le plan réglementaire pour réaliser si nécessaire une PCR ultérieurement (recommandation de l'Agence de Biomédecine).

La question du paludisme chez la femme enceinte et le nouveau-né est abordée : environ 30 cas de femmes enceintes infectées sont relevés chaque année en France, mais le paludisme congénital est très rare, même en zone d'endémie, puisqu'il faut conjointement au moment de l'accouchement une parasitémie positive et un passage du sang maternel au nouveau-né. Les femmes prémunies avant leur grossesse apportent une protection importante vis-à-vis de la transmission à leur enfant. Le suivi du nouveau-né se poursuit à J10 et J15 et le paludisme doit être envisagé par le pédiatre devant toute fièvre dans un tel contexte. Un rappel au biologiste peut être fait sur la vigilance à avoir sur une numération avec formule sanguine réalisée par un automate qui présenterait des formes anormales et une thrombocytopenie. Dans ce cas, un FS doit être effectué.

Le CNR indique que le texte court des recommandations élaborées sous l'égide de la SPILF sera publié début 2017 et devrait être en cohérence avec l'énoncé de l'argumentaire HAS en cours de finalisation.

Concernant la dernière recommandation de la SFBC sur la biologie d'urgence d'avril 2016 qui préconise en urgence absolue « un diagnostic du paludisme par goutte épaisse », le CNR explique que cette appellation est générique et synonyme de « diagnostic microscopique » qui englobe le FS et la GE. Ce texte est en lien avec un projet de décret sur la biologie d'urgence qui inclut le diagnostic du paludisme et prévoit un rendu des résultats dans un délai de 4 heures, au lieu de 2 préconisé actuellement, avec recherche sur lame et test unitaire antigénique possible dans les LBM acceptant les urgences.

F. Formation professionnelle sur les techniques de diagnostic (direct) du paludisme

Dans le cursus d'internat de biologie, certains CHU n'enseignent plus la goutte épaisse, même sur l'Île-de-France, ce qui est problématique dans le premier pays en termes de paludisme d'importation. Le CNR rappelle que l'examen cytologique est globalement difficile en hématologie comme en parasitologie. Une habilitation sur le diagnostic direct du paludisme peut être obtenue par un programme de 2 jours. Dans le cadre du développement professionnel continu (DPC), plusieurs organismes dont les enseignants sont des parasitologues universitaires, l'inscrivent à leur programme. Par contre, les examens de parasitologie ne sont plus inscrits dans le plan d'accréditation comme une famille spécifique, mais sont inclus dans la famille « microbiologie », ce qui a sans doute provoqué un désintérêt de certains biologistes dans les programmes de maintien des compétences pour ce domaine. Cependant les exigences actuelles avec la constitution d'échantillothèques permettent aux LBM d'avoir des lames de référence pour les lectures (guide QUAMIC rédigé par la SFM). Il est aussi possible d'en acheter pour constituer des outils de formation.

Le CNR en tant que tel n'organise pas de formation, mais il répond aux sollicitations et peut servir d'aide pour résoudre les problèmes de diagnostic, en complétant l'approche diagnostique par des GE et des PCR sur les échantillons reçus. Un délai de 24-48 h maximum pour l'envoi de prélèvements doit être respecté pour conserver la sensibilité de la microscopie, car les hématies s'altèrent vite, mais pour les méthodes de PCR, des délais allant jusqu'à 30 jours sont acceptables. Les cas

positifs identifiés par les LBM correspondants du CNR lui sont envoyés systématiquement pour colliger les données sur la pathologie.

G. Autres points

Les chiffres consolidés qui vont servir au rapport annuels du CNR 2015 seront transmis à la HAS afin d'enrichir la partie 2.2 « Contexte pathologique » de l'argumentaire. Un point est à corriger dans le paragraphe portant sur le CNQ de l'ANSM : ce ne sont pas 300 LBM qui participent au CNQ sur les examens directs de parasitologie, mais beaucoup plus, de l'ordre de 1100 LBM, chacun recevant un type d'examen à réaliser par campagne³⁶. Aucune autre remarque n'a été faite sur le contenu de l'argumentaire préparé par la HAS.

Le fait de vouloir regrouper la recherche des parasites dans le sang dans un seul acte à la NABM, comme proposé dans la demande de la CNAMTS « Recherche et identification de parasites sanguicoles ou tissulaires », ne pose pas de problème, le CNR précisant que la recherche des autres parasites est peu fréquente (microfilaires dans le sang) ou fait l'objet d'un libellé spécifique.

Pour la situation de Mayotte et en Guyane, où le paludisme est endémique dans quelques zones, en situations d'urgence où le microscope n'est pas accessible dans les délais, la recommandation de l'OMS d'utiliser les TDR en première intention s'applique. Toutefois, comme ils sont réalisés dans un centre de santé et par un professionnel non biologiste médical, leur prise en charge financière ne relève pas de la NABM et est effectuée par d'autres fonds. Un arrêté a été publié sur la pratique des tests du paludisme dans les centres de santé en Guyane, qui a modifié le Code de la santé publique³⁷.

³⁶ Note post-réunion : le contact pris à l'ANSM auprès de la personne responsable du CNQ fait état au 29/09/2016 de 921 LBM inscrits au dernier CNQ de parasitologie « recherche de parasites sanguins ». Les échantillons sont adressés au siège social avec un seul résultat attendu, y compris pour les LBM multi-sites, quel que soit le nombre de sites.

³⁷ Décret N° 2007-1131 du 23 juillet 2007, relatif aux examens biologiques réalisés dans certains sites isolés et modifiant le Code de la santé publique (articles R 6211-46 et 11-47).

Références

1. Haute Autorité de Santé. Modification de la Nomenclature des actes de biologie médicale pour les actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium (parasites responsables du paludisme). Feuille de route. Proposition de traitement de la demande. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2016. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-06/fdr_paludisme.pdf
2. Société de pathologie infectieuse de langue française, Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales, Société française de médecine des armées, Société française de parasitologie, Société française de pédiatrie, Société de médecine des voyages, *et al.* Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à Plasmodium falciparum : recommandations pour la pratique clinique 2007 (Révision de la conférence de consensus 1999) Texte long. Réanimation 2008;17(5):e1-54.
3. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie. Paludisme. Lille: Université Médicale Virtuelle Francophone; 2014. <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>
4. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO; 2015. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
5. Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales. Paludisme. UE6 n°166 ECN.PILLY Maladies infectieuses et tropicales [En ligne] 2016. <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/ecnpilly/ecnpilly2016-ue6-166-web-nov2015.pdf>
6. Haut conseil de la santé publique. Place de l'artésunate injectable dans le traitement du paludisme grave de l'adulte et de l'enfant. Avis et rapports. Paris: HSCP; 2013.
7. Sociedad Espanola de Medicina Tropical y Salud Internacional, Muñoz J, Rojo-Marcos G, Ramírez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Treviño B, *et al.* Diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España: recomendaciones del Grupo de Trabajo de Malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Enferm Infecc Microbiol Clin 2015;33(6):e1-e13.
8. Public Health Agency of Canada. Canadian recommendations for the prevention and treatment of malaria. An advisory committee statement (ACS) committee to advise on tropical medicine and travel (CATMAT). Ottawa: PHAC; 2014.
9. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The diagnosis and treatment of malaria in pregnancy. Green-top guideline No. 54b. London: RCOG; 2010.
10. Aubry P, Gauzère BA. Paludisme actualités 2015. Cours en ligne Médecine Tropicale [En ligne] 2015. <http://medecinetropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf>
11. Deluot AM, Levillayer H, Poirot JL. Diagnostic parasitologique du paludisme. Dévelop Santé [en ligne] 2008;(189).
12. Askling HH, Bruneel F, Burchard G, Castelli F, Chiodini PL, Grobusch MP, *et al.* Management of imported malaria in Europe. Malar J 2012;11:328.
13. Le Loup G, Malvy D. Paludisme d'importation. EMC Maladies infectieuses 2010;8-507-A-15.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Treatment of Malaria (Guidelines for clinicians). Atlanta: CDC; 2013. <https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/clinicalguidance.pdf>
15. World Health Organization. Malaria diagnostics technology and market landscape. Geneva: WHO; 2014.
16. Haut conseil de la santé publique. Avis relatif aux recommandations de prévention du paludisme pour les voyageurs. Paris: HCSP; 2015.
17. European Centre for Disease Prevention and Control, Albu C, Brusin S, Ciancio B, Marrama-Rakotorivony L, Sudre B, *et al.* Annual epidemiological report. Emerging and vector-borne diseases. ECDC surveillance report. Stockholm: ECDPC; 2014.
18. Caumes E, Camus D. Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2016. BEH 2016;Hors-série.
19. Petit-Sinturel M, Carvalho L, Andrieu A, Prince C, Abboud P, Djossou F, *et al.* Situation du paludisme en Guyane française en 2015. BVS 2016;(2):6-10.
20. Valance D, Vandroux D, Antok E, Winer A, Gaüzère BA. Caractéristiques cliniques du paludisme sévère d'importation de l'adulte à la Réunion de 2000 à 2011. Anesth Réanim 2015;1:305-12.
21. Migliani R, Pradines B, Michel R, Aoun O, Dia A, Deparis X, *et al.* Malaria control strategies in French armed forces. Travel Med Infect Dis 2014;12(4):307-17.
22. Larréché S, Rapp C, Delacour H, Sanmartin N, Ficko C, Bigaillon C, *et al.* Sensitivity of parasitological tests in imported Plasmodium vivax malaria in adults and impact of chemoprophylaxis and attack type. J Travel Med 2014;21(3):195-200.
23. De Laval F, Oliver M, Rapp C, Pommier de Santi V, Mendibil A, Deparis X, *et al.* The challenge of diagnosing Plasmodium ovale malaria in travellers: report of six clustered cases in French soldiers returning from West Africa. Malar J 2010;9:358.

24. Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales. Fièvre aiguë chez l'enfant et l'adulte. UE6 n°144 ECN.PILLY Maladies infectieuses et tropicales [En ligne] 2016.
<http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/ecnpilly/ecnpilly2016-ue6-144-web.pdf>
25. Haut conseil de la santé publique. Avis relatif à l'élargissement des prescriptions de la primaquine dans le cadre du traitement du paludisme à *P. vivax* et *P. ovale*. Paris: HCSP; 2008.
26. Société de pathologie infectieuse de langue française. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* : recommandations pour la pratique clinique 2007 (révision de la Conférence de consensus 1999). Texte court. Grenoble: SPLF; 2007.
http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/2007-paludisme-court.pdf
27. Castelli F, Dutoit E, Manca N. *Plasmodium* species. Dans: Société française de microbiologie, Cornaglia G, Courcol R, Hermann JL, Kahlmeter G, Peigne-Lafeuille H, *et al.*, ed. European manual of clinical microbiology. Paris: SFM; 2012. p. 389-96.
28. Kattenberg JH, Ochodo EA, Boer KR, Schallig HD, Mens PF, Leeflang MM. Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women. *Malar J* 2011;10:321.
29. Organisation mondiale de la santé. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme. Partie 1. Guide du stagiaire. Genève: OMS; 2014.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/924154782_0/fr/
30. Berry A, Iriart X, Magnaval JF. Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. *Rev Fr Lab* 2009;(416):65-70.
31. Kobayashi T, Gamboa D, Ndiaye D, Cui L, Sutton PL, Vinetz JM. Malaria diagnosis across the international centers of excellence for malaria research: Platforms, performance, and standardization. *Am J Trop Med Hyg* 2015;93(3 Suppl):99-109.
32. Paludisme. Chapitre 110. Dans: Société française de microbiologie, Société française de mycologie médicale, Société française de parasitologie, Bourlet T, Courol R, Hermann JL, *et al.*, ed. Rémic 5.1 - Référentiel en microbiologie médicale. Paris: SFM; 2015. p. 803.
33. Maslin J, Coton T, Martinaud C, Lignac D, Journaux L, Grassin F, *et al.* Test rapide de diagnostic du paludisme : une curieuse discordance. *Méd Armées* 2010;38(1):137-41.
34. World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 6 (2014–2015). Genève: WHO; 2015.
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/204118>
35. World Health Organization. Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic tests for malaria. WHO Global malaria programme. Genève: WHO; 2011.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44530/1/9789241501125_eng.pdf
36. Gillet P, Mori M, Van den Ende J, Jacobs J. Buffer substitution in malaria rapid diagnostic tests causes false-positive results. *Malar J* 2010;9:215.
37. Odaga J, Sinclair D, Lokong JA, Donegan S, Hopkins H, Garner P. Rapid diagnostic tests versus clinical diagnosis for managing people with fever in malaria endemic settings. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;4:CD008998.
38. Organisation mondiale de la santé. Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme. Manuel pratique. Genève: OMS; 2012.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/924154782_0/fr/
39. World Health Organization. Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests. Global malaria programme. Genève: WHO; 2016.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/rdt_selection_criteria/en/
40. Abba K, Kirkham AJ, Olliaro P, Deeks JJ, Donegan S, Garner P, *et al.* Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non *falciparum* or *Plasmodium vivax*. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;(12):CD011431.
41. Tanizaki R, Kato Y, Iwagami M, Kutsuna S, Ujiie M, Takeshita N, *et al.* Performance of rapid diagnostic tests for *Plasmodium ovale* malaria in Japanese travellers. *Trop Med Health* 2014;42(4):149-53.
42. Houzé S, Boutron I, Marmorat A, 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.
43. Lee JH, Jang JW, Cho CH, Kim JY, Han ET, Yun SG, *et al.* False-positive results for rapid diagnostic tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *J Clin Microbiol* 2014;52(10):3784-7.
44. Abba K, Deeks JJ, Olliaro P, Naing CM, Jackson SM, Takwoingi Y, *et al.* Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(7):CD008122.
45. World Health Organization. False-negative RDT results and implications of new reports of *P. falciparum* histidine-rich protein 2/3 gene deletions. Global malaria programme. Geneva: WHO; 2016.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who-hrm-gmp-2016.4.pdf>
46. Organisation mondiale de la santé. Programme mondial de lutte antipaludique. Note d'orientation sur le

- diagnostic du paludisme dans les contextes de faible transmission. Genève: OMS; 2014.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy-brief-diagnosis-low-transmission-settings/fr/>
47. World Health Organization. WHO evidence review group on Malaria diagnosis in low transmission settings. WHO Headquarters, Geneva, 16-18 December 2013. Genève: WHO; 2014.
http://www.who.int/malaria/mpac/mpac_mar2014_diagnosis_low_transmission_settings_report.pdf
48. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory diagnosis of malaria. Plasmodium vivax [En ligne]: CDC; 2016.
http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Pvivax_benchaidV2.pdf
49. Société de pathologie infectieuse de langue française. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à Plasmodium falciparum : recommandations pour la pratique clinique 2007 (révision de la Conférence de consensus 1999). Texte long. Grenoble: SPLF; 2007.
<http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/documents/consensus/2007-paludisme-long.pdf>
50. Delhaes Jeanne L, Berry A, Dutoit E, Leclerc F, Beaudou J, Leteurtre S, *et al.* Molecular method for the diagnosis of imported pediatric malaria. *Med Mal Infect* 2010;40(2):115-8.
51. Oriero EC, Okebe J, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Diagnostic performance of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the apicoplast genome for malaria diagnosis in a field setting in sub-Saharan Africa. *Malar J* 2015;14:396.
52. European Commission. Décision d'exécution de la commission du 8 août 2012 modifiant la décision 2002/253/CE établissant des définitions de cas pour la déclaration des maladies transmissibles au réseau communautaire en application de la décision n°2119/98/CE du Parlement européen et du Conseil. *Official Journal of the European Union* 2012;2012/506/EU.
53. Centre de national de référence du Paludisme. Rapport annuel d'activité. Année d'exercice 2014. Paris: CNR; 2015.
http://www.pasteur-cayenne.fr/wp-content/uploads/2015/06/2015-04-20-RA_CNR_Paludisme_2014.pdf
54. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale. Parasitologie : Frottis sanguin, Mycologie, Sérologie de la toxoplasmose. Enquête : recensement des cas de paludisme en France métropolitaine au cours de l'année 2013. Saint-Denis la Plaine: ANSM; 2015.
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/5afb1866fe4e0bb9a24796e636c1da06.pdf
55. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale. Parasitologie : Frottis sanguin et apposition de rate, Sérologie de la toxoplasmose, Sérologie du paludisme. Saint-Denis la Plaine: ANSM; 2016.
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/2645eb90c34a3c4367e6e949571dccb6.pdf
56. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Indicateur Qualité CNQ (IQCNQ) 2014. Saint-Denis la Plaine: ANSM; 2016.
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ea908829a9c6e67f257757d2ec704969.pdf
57. Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. *Curr Opin Infect Dis* 2015;28(5):446-54.
58. Ministry of Health. Malaria. Epidemiology in New Zealand. Wellington: Ministry of Health; 2012.
<https://www.health.govt.nz/system/files/documents/publications/cd-manual-malaria-may2012.pdf>
59. National Institute for Health Research. Point-of-care tests for malaria. Horizon Scan Report 0040. Oxford: NIHR Diagnostic Evidence Cooperative Oxford; 2015.
<http://www.oxford.dec.nihr.ac.uk/reports-and-resources/horizon-scanning-reports/horizon-scanning-report0040-poc-malaria.pdf>
60. Santé-voyages. Vaccinations et mesures antipaludiques. Recommandations état février 2016. *Bull OFSP* 2016;(10).
61. Northern Territory Government. Guidelines for Malaria. Casuarina: Northern Territory Government; 2012.
62. NHS Children's Acute Transport Service, Randle E, Shingadia D. Malaria. Clinical guidelines. London: CATS; 2013.
http://site.cats.nhs.uk/wp-content/uploads/2016/01/cats_malaria_2015.pdf
63. Wagner N, Posfay-Barbe KM, Chappuis F. Prise en charge du paludisme chez l'enfant en Suisse. *Rev Med Suisse* 2012;(8):1007-12.
64. Comité pour la santé des exilés. Migrants/étrangers en situation précaire. Soins et accompagnement. Guide pratique pour les professionnels. Kremlin Bicêtre: Le Comede; 2013.
<http://inpes.santepubliquefrance.fr/CFESBases/catalogue/pdf/1663.pdf>
65. Morch K, Myrvang B. Treatment of malaria in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2012;132(6):664-7.
66. Garcia Lopez Hortelano M, Fumado Perez V, Gonzalez Tome MI. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. *An Pediatr* 2013;78(2):124 e1-8.
67. Institut Catala de la Salut, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Malaria en pediatria. Protocolo diagnóstico-terapéutico Barcelona: Hospital Universitari Vall d'Hebron; 2015.

<http://www.upiip.com/sites/upiip.com/files/Malaria,%20diagnostico%20y%20tratamiento.%202015.pdf>

68. National institute for Infectious Diseases, Corpolongo A, De Nardo P, Gentilotti E, Ghirga P, Maritti M, *et al.* Procedura operativa per la gestione diagnostico terapeutica della malaria. Roma: INMI; 2013.

http://www.inmi.it/linee_guida/MALARIA/Protocollo_malaria_03_01_2013.pdf

69. Institut scientifique de santé publique. Paludisme (Malaria). Bruxelles: WIV-ISP; 2015.

<https://www.wiv-isp.be/matra/Fiches/Paludisme.pdf>

70. Johnston V, Stockley JM, Dockrell D, Warrell D, Bailey R, Pasvol G, *et al.* Fever in returned travellers presenting in the United Kingdom: recommendations for investigation and initial management. *J Infect* 2009;59(1):1-18.

71. Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé. Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations. Paris: ANAES; 2000.

<http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/analiterat.pdf>

72. Brouwers MC, Kho ME, Browman GP, Burgers JS, Cluzeau F, Feder G, *et al.* The Global Rating Scale complements the AGREE II in advancing the quality of practice guidelines. *J Clin Epidemiol* 2012;65(5):526-34.

73. AGREE Research Trust. AGREE II-Global rating scale (AGREE II-GRS) Instrument [En ligne] 2013.

<http://www.agreertrust.org/wp-content/uploads/2013/12/AGREE-II-GRS-Instument.pdf>

74. Australasian Society for Infectious Diseases and Refugee Health Network of Australia, Australasian Society for Infectious Diseases, National Tuberculosis Advisory Committee, Australasian College of Physicians, Australasian Chapter of Sexual Health Medicine. Recommendations for comprehensive post-arrival health assessment for people from refugee-like backgrounds. Surry Hills: Australasian Society for Infectious Diseases; 2016.

75. Laloo DG, Shingadia D, Bell DJ, Beeching NJ, Whitty CJ, Chiodini PL. UK malaria treatment guidelines 2016. *J Infect* 2016.

76. Kliner M, Poole K, Sinclair D, Garner P. Preventing malaria in international travellers: an evaluation of published English-language guidelines. *BMC Public Health* 2014;14:1129.

77. SA Maternal and Neonatal Clinical Network, SA Health Safety and Quality Strategic Governance. Malaria in pregnancy. Policy clinical guideline : Government of South Australia; 2015.

https://www.sahealth.sa.gov.au/wps/wcm/connect/d9ba0b004ee4f7c0966c9fd150ce4f37/Malaria+in+Pregnancy_July2015.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=d9ba0b004ee4f7c0966c9fd150ce4f37

78. Public Health England. Guidelines for malaria prevention in travellers from the UK 2015. London: PHE; 2015.

https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/461295/2015.09.16_ACMP_guidelines_FINAL.pdf

79. Agence de la santé publique du Canada. Recommandations canadiennes pour la prévention et le traitement du paludisme (malaria) chez les voyageurs internationaux. Une déclaration d'un comité consultatif (DCC) du comité consultatif de la médecine tropicale et de la médecine des voyages (CCMTMV). Ottawa; 2014.

http://publications.gc.ca/site/archivee-archived.html?url=http://publications.gc.ca/collections/collection_2014/aspc-phac/HP40-102-2014-fra.pdf

80. World Health Organization. Malaria microscopy. Quality assurance manual. Version 2. Genève: WHO; 2016.

<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549394/en/>

81. Organisation mondiale de la santé. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme. Partie 2. Guide de l'instructeur. Genève: OMS; 2014.

<http://apps.who.int/bookorders/francais/dartprt2.jsp?codlan=2&codcol=15&codcch=2778>

82. République démocratique du Congo. Planches pour le diagnostic microscopique du paludisme. Clifton Road: CDC.

http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Congo_Bench_Aid_vF.pdf

83. British Committee for Standards in Haematology, Bailey JW, Williams J, Bain BJ, Parker-Williams J, Chiodini PL. Guideline: the laboratory diagnosis of malaria. *Br J Haematol* 2013;163(5):573-80.

84. University College London Hospitals, NHS Foundation Trust, Gothard P, Bailey R, Behrens R, Brown M, *et al.* Malaria diagnosis and treatment guideline. The hospital for tropical diseases trustwide guideline. London: UCLH; 2013.

http://www.thehtd.org/Malaria%20guideline_final_June2013.pdf

85. Décret n°2007-1131 du 23 juillet 2007 relatif aux examens biologiques réalisés dans certains sites isolés et modifiant le code de la santé publique (dispositions réglementaires). Version consolidée au 15 mai 2016. *Journal Officiel*;25 juillet 2007.

86. Société française de microbiologie, Laudat P. Comité qualité (QUAMIC) de la Société française de microbiologie. Recommandations 2016 V1. Paris: SFM; 2016.

http://sfmm-mycologie-medicale.com/upload/files/QUAMIC2016_V1.pdf

Fiche descriptive

Intitulé	Descriptif
Méthode de travail	Évaluation d'une technologie de santé
Date de mise en ligne	décembre 2016
Date d'édition	Uniquement disponible sous format électronique sur www.has-sante.fr
Objectif(s)	Évaluer les propositions de modifications de la Nomenclature des actes de biologie médicale souhaitées par la CNAMTS par les données issues de l'analyse critique de la littérature synthétique identifiée par une recherche systématique et le recueil de la position actuelle des professionnels concernés Proposer un avis argumenté concernant ces propositions.
Professionnel(s) concerné(s)	Cf. chapitre 2.3 Biologistes médicaux, généralistes, infectiologues, parasitologues, urgentistes, réanimateurs
Demandeur	Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS)
Promoteur	Haute Autorité de santé (HAS), service évaluation des actes professionnels (SEAP)
Pilotage du projet	Coordination : Véronique DAURAT, chef de projet, SEAP (chef de service Michèle MORIN SURROCA, adjoint au chef de service : Denis-Jean DAVID. Secrétariat : Louise TUIL, assistante, SEAP
Participants	Expertise externe à la HAS : Centre national de référence (CNR) du paludisme : Pr Sandrine HOUZÉ, (hôpital Bichat), Dr Marc THELLIER (GH Pitié-Salpêtrière). Conseil national professionnel d'anesthésie-réanimation (CNPAN). Conseil national professionnel - Fédération française d'infectiologie (CNP-FFI). Collège français de médecine d'urgence (CFMU). Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA). Société française de biologie clinique (SFBC). Société de médecine des voyages (SMV). Société de pathologie exotique (SPE). Cf. Chapitre 3.2
Recherche documentaire	De janvier 2000 à avril 2016 (stratégie de recherche documentaire décrite en annexe 1) Réalisée par documentaliste, Emmanuelle BLONDET avec l'aide de Renée CARDOSO assistante documentaliste, sous la responsabilité de Frédérique PAGES, chef du service documentation - veille, et Christine DEVAUD, adjointe au chef de service
Auteurs de l'argumentaire	Véronique DAURAT, chef de projet, SEAP, sous la responsabilité de Denis-Jean DAVID, adjoint au chef de service, SEAP
Validation	Collège de la HAS : décembre 2016
Autres formats	Pas d'autre format que le format électronique disponible sur www.has-sante.fr
Documents d'accompagnement	Feuille de route (juin 2016), avis HAS (décembre 2016) disponibles sur www.has-sante.fr

~



Toutes les publications de la HAS sont téléchargeables sur
www.has-sante.fr