Authors copyright©

Université Mohammed V de Rabat

52e JBP Journées de Biologie Praticienne

ACADÉMIE NATIONALE DE PHARMACIE

SANTÉ PUBLIQUE - MÉDICAMENT - PRODUITS DE SANTÉ - BIOLOGIE - SANTÉ ENVIRONNEMENTALE

Fondée le 3 août 1803 sous le nom de Société de Pharmacie de Paris

Personne morale de droit public placée sous la protection du Président de la République

08/12/2018

SFBC FIFBCML EFLM EUROPEAN FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE IFCC International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Diagnostic du Paludisme: Quoi de neuf?

Pr Badre Eddine LMIMOUNI

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Militaire d'Instruction Med V

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat

Membre correspondant de l'Académie Nationale de Pharmacie, France

52e JBP - 2018 Pr Lmimouni

Author's copyright ©

Définition

- **Parasitose** due à des hématozoaires du genre ***Plasmodium*** transmise par des moustiques du genre ***Anopheles***

Plasmodium falciparum

Plasmodium vivax

Plasmodium ovale

Plasmodium malariae

Plasmodium knowlesi

Diagnostic d'urgence

Diagnostic vital

Author's copyright ©

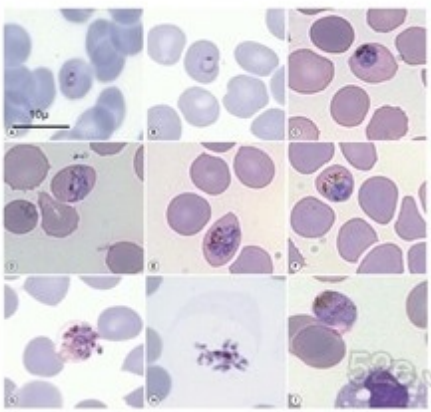
P.knowlesi

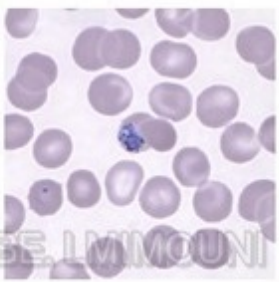
Asie du Sud-Est (Indonésie, Malaisie, +/- Inde et Sri Lanka

- **Anthropozoonose** (Réservoir: macaques)
- Quelques milliers de cas déclarés
- Son incubation est d'environ 5 jours
- Donne des **fièvres journalières (24h)**

- Accès simple, **Accès grave à tropisme pulmonaire**

Tout paludisme provenant d'Asie du SE doit être envoyé dans un centre de référence





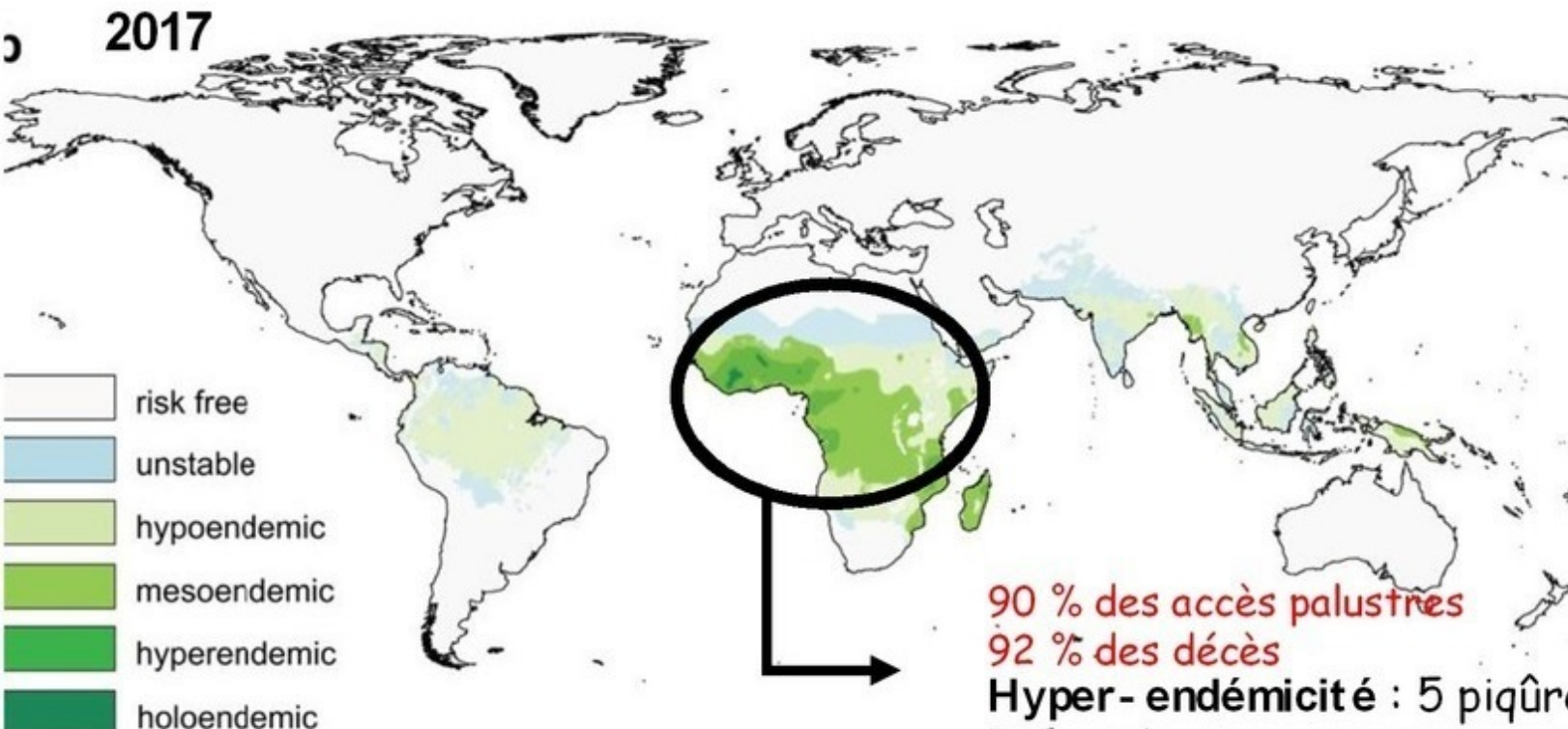
52e JBP - 2018 - EE. LMMOUNI

Author's copyright ©

Actualité épidémiologique

Niveau d"e démicité aujourd"hi ?

(Gething PW et al., Nature 2010)



90 % des accès palustres
92 % des décès
Hyper- endémicité : 5 piqûres
Infect/nuit

CES SSP 2018 - BE. LMIMOUNI

Epidémiologie

Author's copyright ©

World Health Organization WHO. World Malaria Report 2016. Geneva, Switzerland: WHO; 2016.

Paludisme : 3,2 milliards de personnes exposées au niveau mondial en 2015

Transmission dans 91 pays ou territoires en 2015 contre 214 en 2000,

Entre 2000-2015 : diminution de 37% de l'incidence mondiale et de 60% des décès

214 millions de cas et 450 000 décès au niveau mondial

Les décès sont recensés à 92% en Afrique sub-saharienne et l'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable dans 99% des cas

Probablement plus de cas et de décès qu'estimé par l'OMS

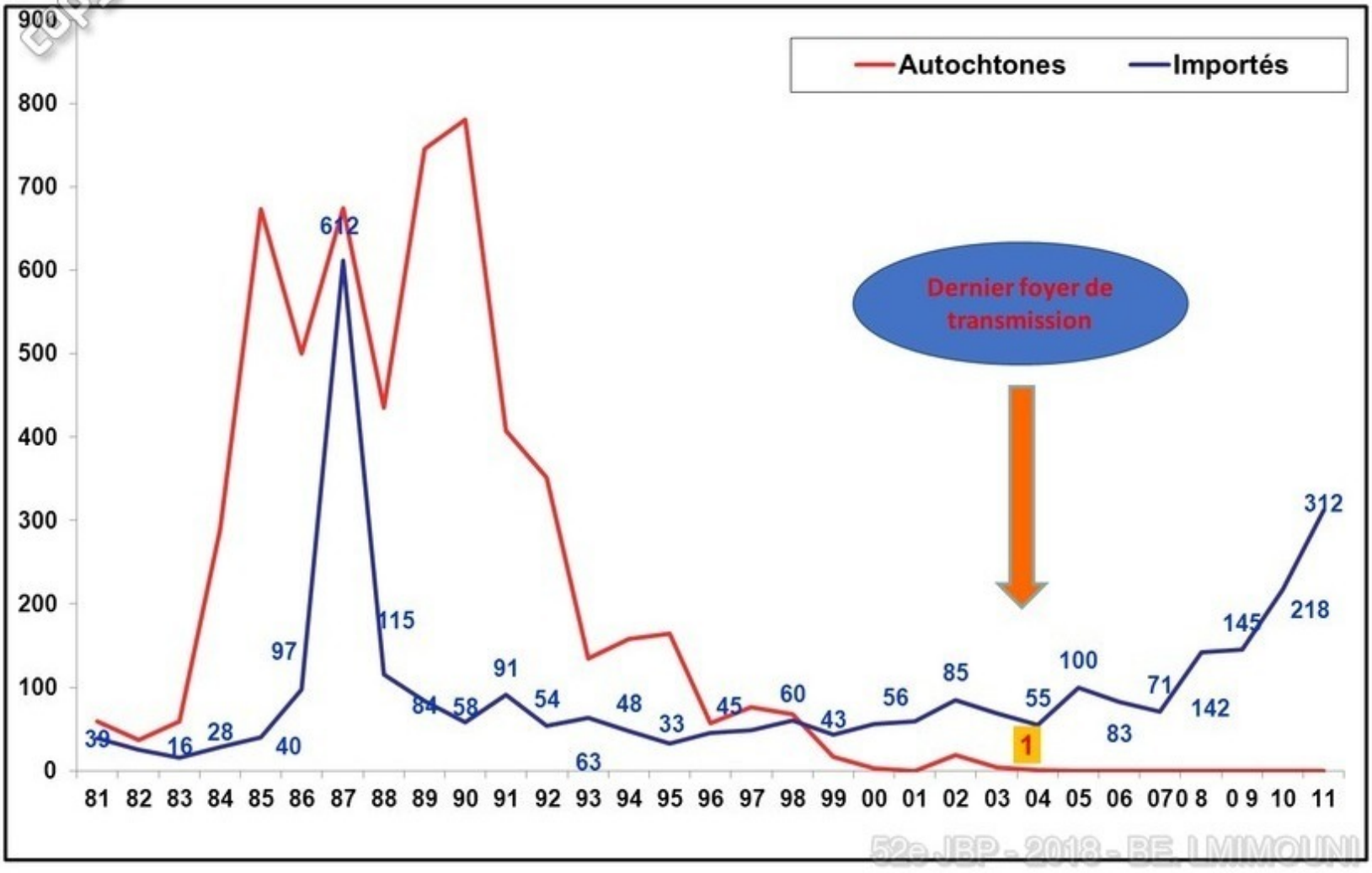
Emergence d'anophèles résistants à plusieurs classes d'insecticides

Emergence de parasites résistants aux associations à base d'artémisinine

Périodes		Principales périodes au Maroc
Avant 1912		Peu d'écrits et peu de données
1912 - 1925		Création du Service Antipaludique Travaux d'assainissements
1926 - 1952		1930: Création de l'INH Dépistage- traitement- actions de lutte
1952 -1964		Endémie mieux contrôlée
1964 - 1990	P	Programme National de Lutte contre le Paludisme Elimination de *P. falciparum* années 70 Recrudescence années 80
1990- 1997	N	Maitrise de la situation épidémiologique
1997 - 2005	L	Elimination
2010	P	Consolidation - Surveillance Réintroduction ??? Vulnérabilité ??

Author's copyright ©
©2018 - BE. LMIMOUNI

Evolution annuelle des cas de paludisme, Maroc, 1981-2011

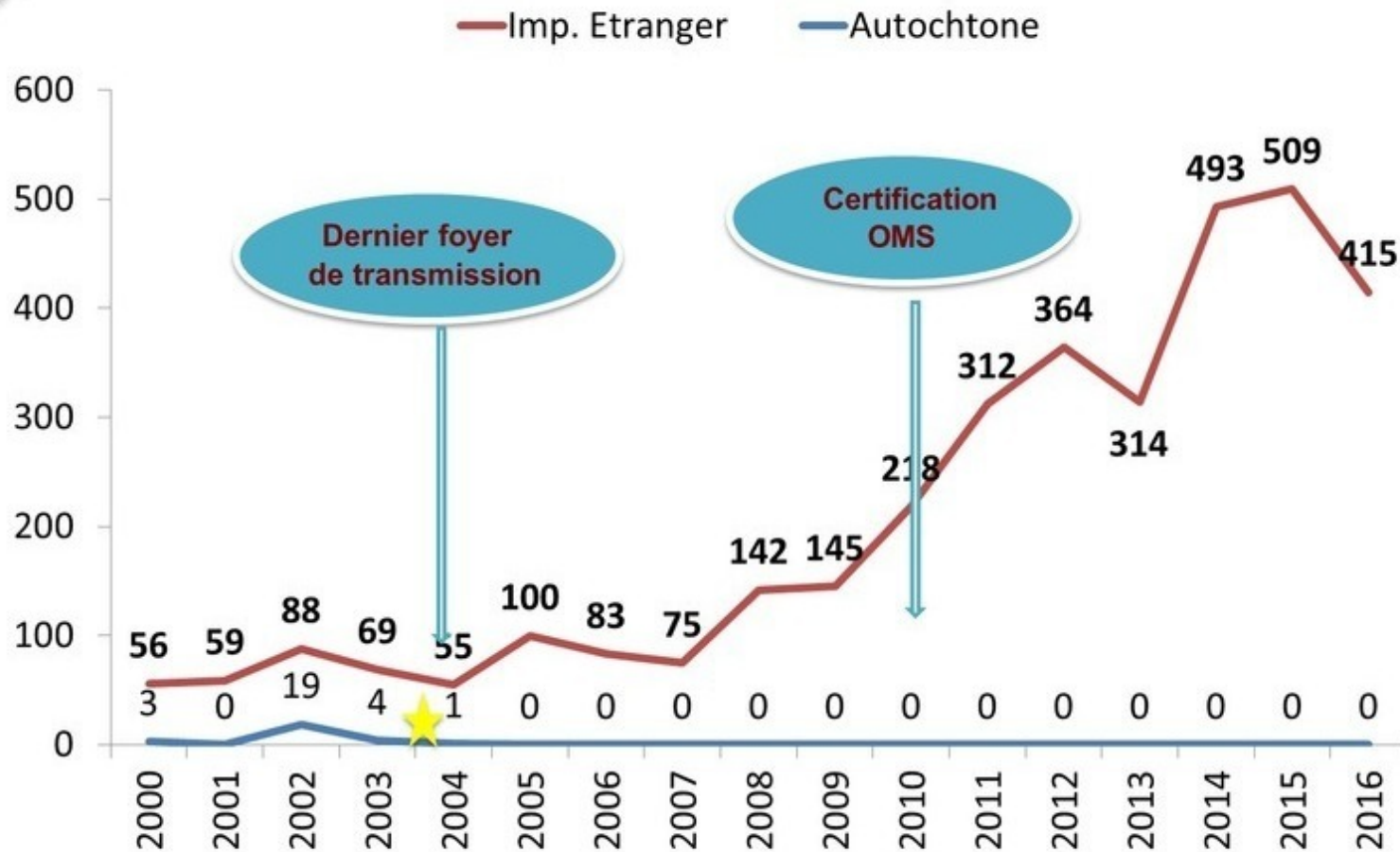


Author's copyright ©

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Evolution du nombre de cas de paludisme (Autochtones et importés), Maroc, 2000 -2016



52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Qu'en est il en France?

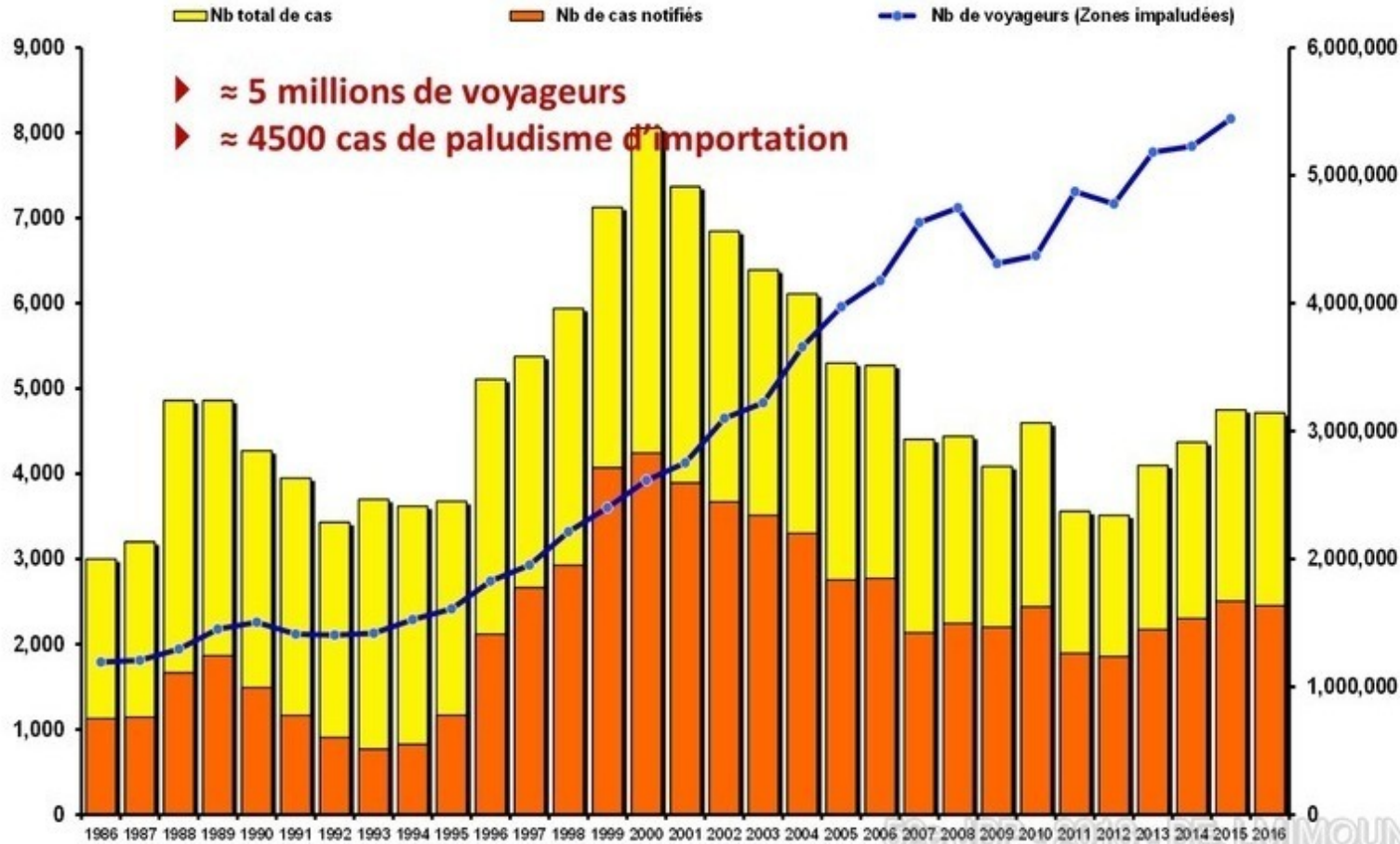
- France: pays européen avec le plus grand nombre de cas de paludisme d'importation = **5000 cas/an (50 000 demandes)**
- **Mayotte: 15 cas autochtones, Guyane: 500 cas autochtones**
- Augmentation des cas: **+ 35%** de 2012 à 2015
- Augmentation des formes graves

- 10 à 20% de décès par an
- Létalité **5%** sur les formes graves

- Rapport du CNR palu de 2013 (Cas positifs)
  - LBM privés n=653
  - Publics n= 276

Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés, cas estimés et nombre de voyageurs vers les zones impaludées, France métropolitaine 1986 à 2016

Données du CNR Palu



Author's copyright ©

Particularités du paludisme d'importation

Author's copyright ©

- Parasitémies souvent très faibles dans plus de 80% des cas (< 0,1%)
- CP mal suivie ou non adaptée
- ***P.falciparum*** dans plus de 85% des cas
- Retour d'Afrique subsaharienne (96%)

Quelles exigences pour le diagnostic biologique d'accès palustre?

Author's copyright ©

1/ Y-a-t-il un *Plasmodium* dans le sang?

2/ Si oui, quelle espèce et quel stade parasitaire ?

3/ Si stade asexué, quelle charge parasitaire ?

4/ Quel délai de rendu de résultat ?

Quelles exigences pour le diagnostic biologique d'accès palustre?

Author's copyright ©

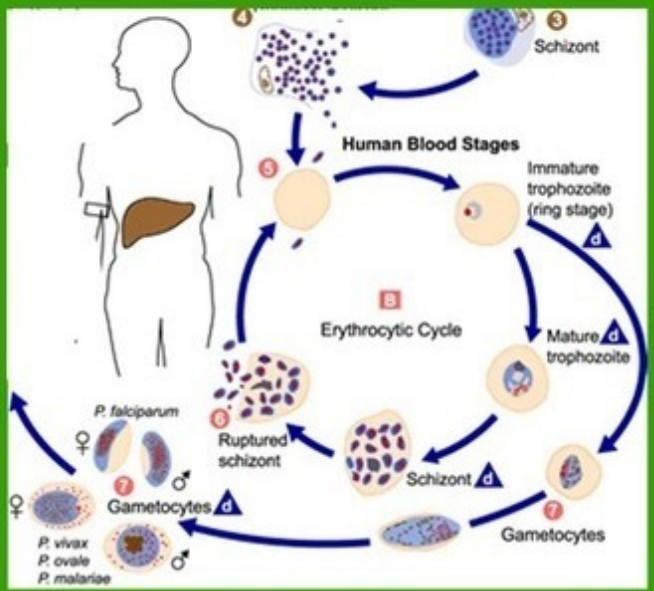
1/ Y-a-t-il un *Plasmodium* dans le sang?

2/ Si oui, quelle espèce et quel stade parasitaire ?

3/ Si stade asexué, quelle charge parasitaire ?

4/ Quel délai de rendu de résultat ?

Formes **asexuées** de *Plasmodium* dans le sang



Quelles exigences pour le diagnostic biologique d'accès palustre?

Author's copyright ©

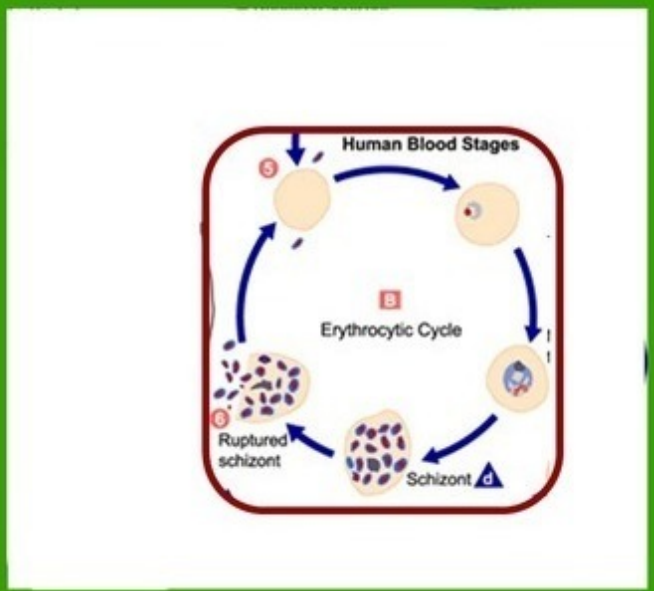
1/ Y-a-t-il un *Plasmodium* dans le sang?

2/ Si oui, quelle espèce et quel stade parasitaire ?

3/ Si stade asexué, quelle charge parasitaire ?

4/ Quel délai de rendu de résultat ?

Formes asexuées de *Plasmodium* dans le sang



Quelles exigences pour le diagnostic biologique d'accès palustre?

Author's copyright ©

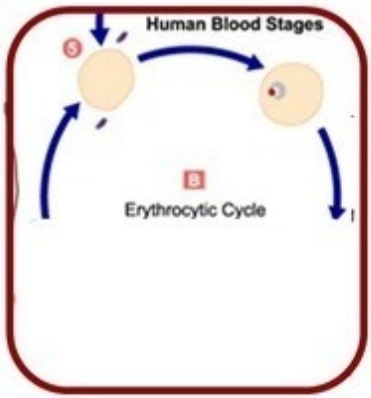
1/ Y-a-t-il un *Plasmodium* dans le sang?

2/ Si oui, quelle espèce et quel stade parasitaire ?

3/ Si stade asexué, quelle charge parasitaire ?

4/ Quel délai de rendu de résultat ?

Formes asexuées de *Plasmodium falciparum*



Quelles exigences pour le diagnostic biologique d'accès palustre?

Author's copyright ©

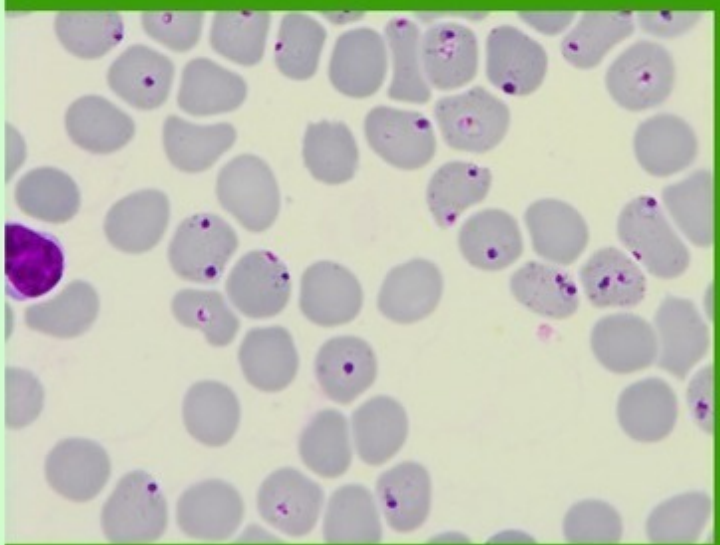
1/ Y-a-t-il un *Plasmodium* dans le sang?

2/ Si oui, quelle espèce et quel stade parasitaire ?

3/ Si stade asexué, quelle charge parasitaire ?

4/ Quel délai de rendu de résultat ?

Parasitémie ≥ 4%



Quelles exigences pour le diagnostic biologique d'accès palustre?

Author's copyright ©

1/ Accès palustre ?

2/ Quelle espèce ?

3/ Quelle charge parasitaire ?

4/ Quel délai de rendu de résultat ?

Moins de 2 heures

Author's copyright ©

Signes biologiques d'orientation

- **Anémie** de type hémolytique d'intensité variable
- Leucopénie inconstante
- **Thrombopénie**

Author's copyright ©

Outils diagnostiques

GE
Se = 10 – 20 p/µl

FSM
(Diagnostic d'espèce)
Se = 100 – 200 p/µl

TDR
Se = 40 – 400 p/µl
40 pour Pf

QBC malaria®
Se = 10 – 20 p/µl

PCR classique

PCR temps réel

Amplification génique
Se < 1 p/µl

LAMP Illumigene ® Malaria

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Diagnostic direct

- Le prélèvement de sang: **Tube EDTA/ACD**
- Pas de tube sec
  - **FS**
  - **GE**

  Acte N°1125 intitulé:
  - Frottis mince et Goutte épaisse
  - Cotation: **B100 = 27 €**

  - **Point of care (TDR): détection des différents antigènes solubles par technique immunochromatographique (G110- BHN 100, liste complémentaire NABM)**
  - **QBC: lourde et peu adaptée à l'urgence (peut remplacer la GE de part sa sensibilité)**
  - **PCR, non adaptée à l'urgence (N151 – RIHN 480)**

Author's copyright ©

Le diagnostic : « Une » technique de référence

- **Examen en microscopie optique du sang total sur frottis sanguin mince (FSM) et Goutte Epaisse (GE)**
  - 100 ans d'expérience
  - répond aux exigences citées précédemment
  - nomenclature des actes de Biologie Médicale
  - recommandation des experts

- **Seuil de détection (SD)**
  - FSM: 100-200 parasites/µl, lecture longue (20 min), diagnostic d'espèce facile
  - GE: 5-20 parasites/µl, lecture rapide, diagnostic d'espèce difficile

Author's copyright ©

Mais, des inconvénients…

- **GE peu pratiquée dans les laboratoires**
  - seule indication = diagnostic de paludisme
  - peu de positifs/laboratoire : 2/3 des laboratoires de biologie médicale ne diagnostiquent aucun cas de paludisme /an

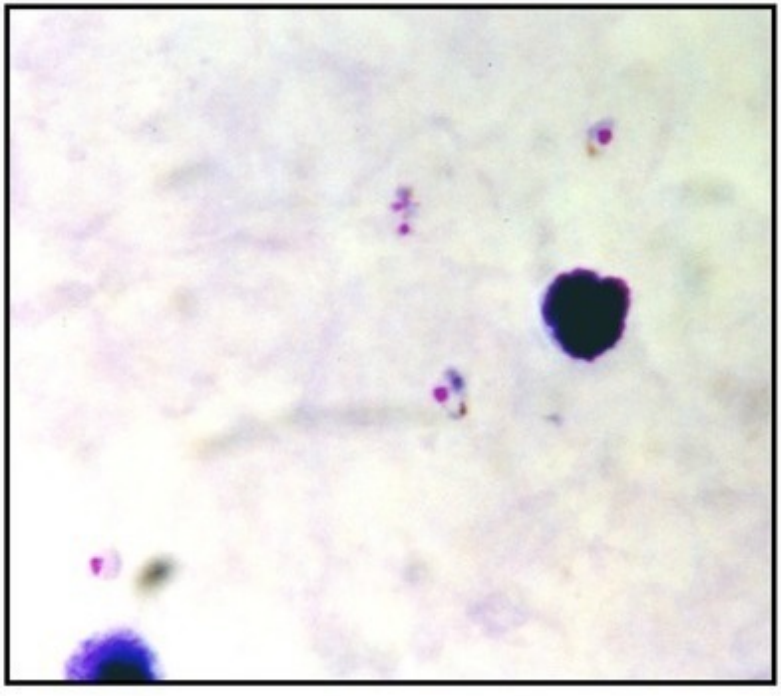
    HAS 2016

- **Techniques non standardisées**
  - Multiples variantes
    - origine du sang examiné (veineux AC, capillaire)
    - volume de sang déposé
    - mode et durée de séchage
    - mode de lyse des hématies
    - mode de coloration
    - Microscopiste

Author's copyright ©

La Goutte épaisse « rapide »

Thellier M. 2002



* Réalisation technique < 10 min.
* Rendu résultats < 2 H
* Meilleur aspect des parasites
* Moins d'artefacts
* Parasitémies mesurées plus élevées
* Personnel peu expérimenté

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 96, No. 0, 000–000 (2002)

Diagnosis of malaria using thick bloodsmears: definition and evaluation of a faster protocol with improved readability

M. THELLIER, A. DATRY, O. ALFA CISSÉ, C. SAN, S. BILIGUI, O. SILVIE and M. DANIS

*Département des Maladies Infectieuses, Parasitaires Tropicales et Santé publique, Centre Hospitalo–Universitaire Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Annales Tropicales

La Goutte Epaisse Rapide

Equipement.

◊ Un microscope, des lames dégraissées, un pot de 20 mL (type ECBU)

Réactifs

◊ Saponine (S 7900 ; Sigma, St Louis, MO) ; lors d'un changement de lot ou de fournisseur, il faudra toujours tester l'efficacité de la lyse en fonction de la concentration en g/l de saponine utilisée (de 3 à 6 g/l en général),

◊ 35% Formaldehyde-10% Methanol en solution aqueuse (Soyons Chimie Biotechnologie, Soyons France) ;

◊ Giemsa-R

Préparation et conservation de la solution :

Pour 100 ml de solution hémolysante, on mélange dans un bêcher

◊ 40 ml de sérum physiologique,

◊ 0.5 g de Saponine,

◊ 1.5 ml de solution aqueuse de 35% Formaldehyde-10% Méthanol,

Le volume est ensuite ajusté à 100 ml avec du sérum physiologique.

◊ Conservation 4°C, jusqu'à un an.

Réalisation technique

1- Une goutte de 2 µL de sang total bien homogénéisée est déposée sur une lame d'examen microscopique puis immédiatement étalée à l'aide d'un coin de lame pour obtenir une préparation homogène de 5 à 7 mm de diamètre (photos 1a, 1b et 1c).

2- La lame est séchée à l'étuve à 37° C ou au sèche-cheveux **2 min** (photo 2).

3- **Dès que la goutte est sèche**, la lame est plongée dans le réactif de lyse (pot de 20 mL). Après 2 min, il faut surveiller attentivement la lyse. Elle doit être complète (disparition de toute trace d'hémoglobine avec obtention d'une pellicule blanche sur la lame) mais non excessive (altération des parasites et des GB). On s'assure de la qualité de l'hémolyse au-dessus d'une surface blanche, évier par exemple (photos 3a, 3b et 3c).

4- **Dès que l'hémolyse est complète**, la lame est rincée **délicatement** à l'eau du robinet (dans un bécher) puis colorée au Giemsa R ou au RAL 555.

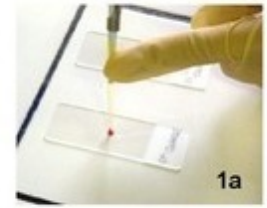
5- Coloration : **sans fixation préalable** recouvrir délicatement la lame d'eau du robinet puis, à l'aide de la pastette (pipette en plastique) déposer délicatement 8 gouttes de Giemsa R (en encadrant le dépôt). Agiter délicatement (par basculement) pour mélanger. Laisser agir **45** secondes. Rincer délicatement à l'eau du robinet.

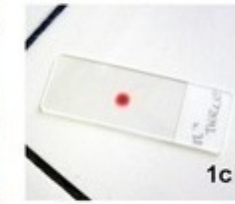
6- Séchage au ventilateur puis lecture ... (photos 6a et 6b)

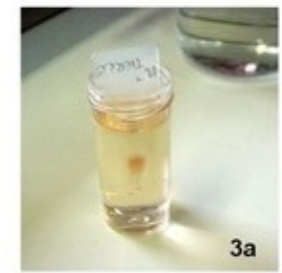
7- L'intégralité de la goutte doit être lue, ce qui nécessite 15 – 25 minutes en fonction de l'expérience du microscopiste.

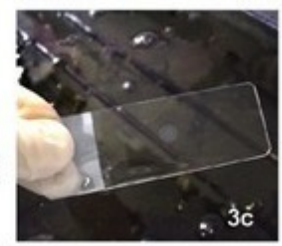
Pour tous renseignements :

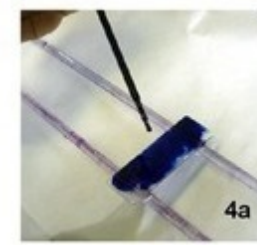
Dr Marc Thellier, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Pitié-Salpêtrière, 47, bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Email :marc.thellier@psl.aphp.fr

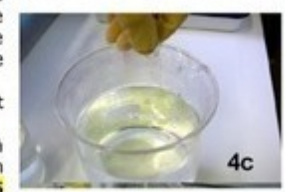


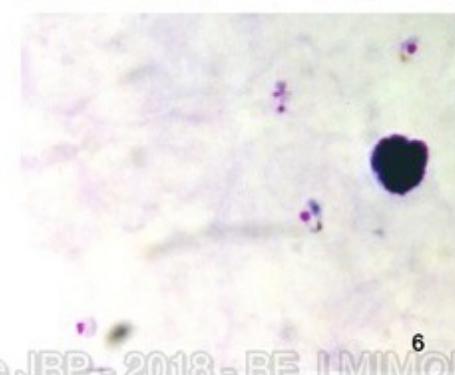










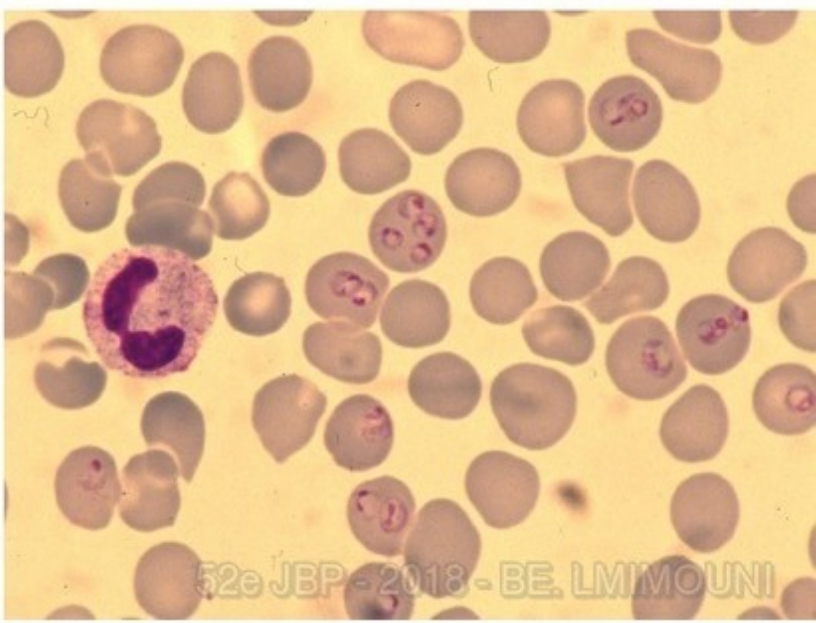


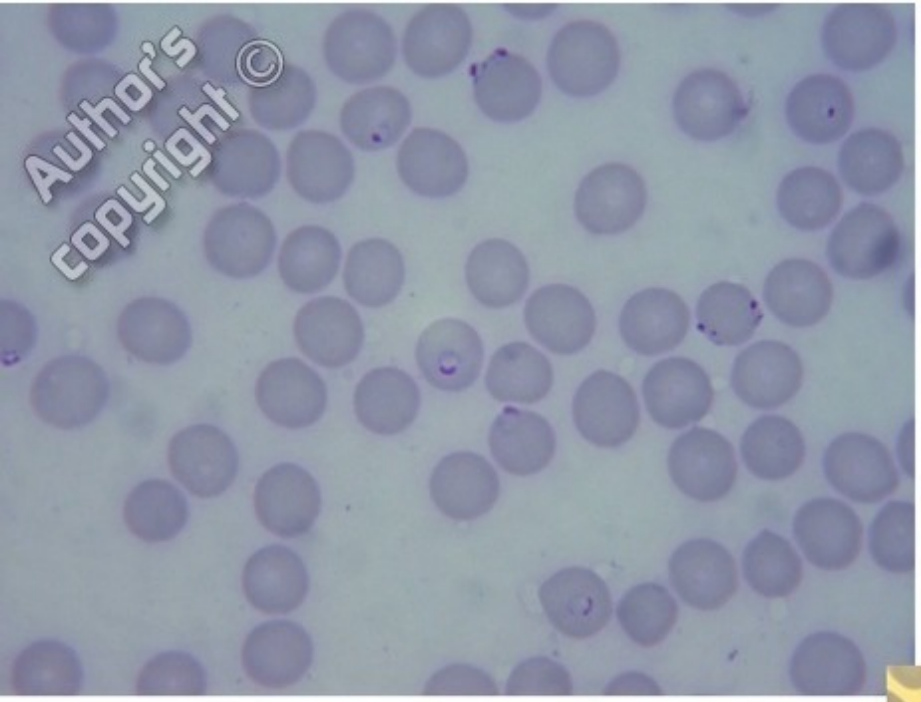
JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

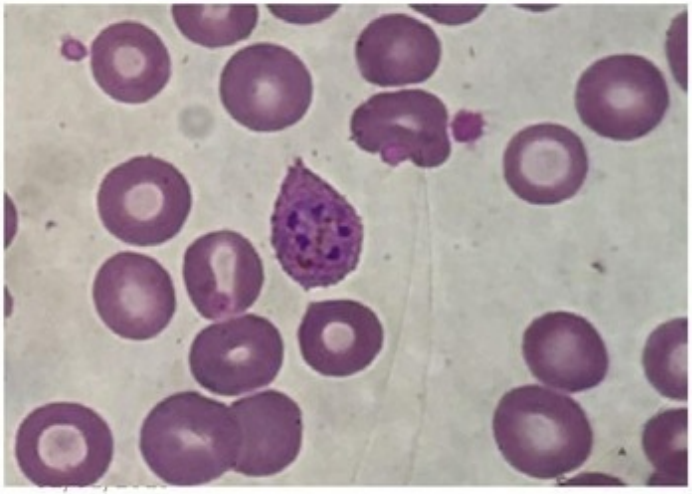
Author's copyright ©

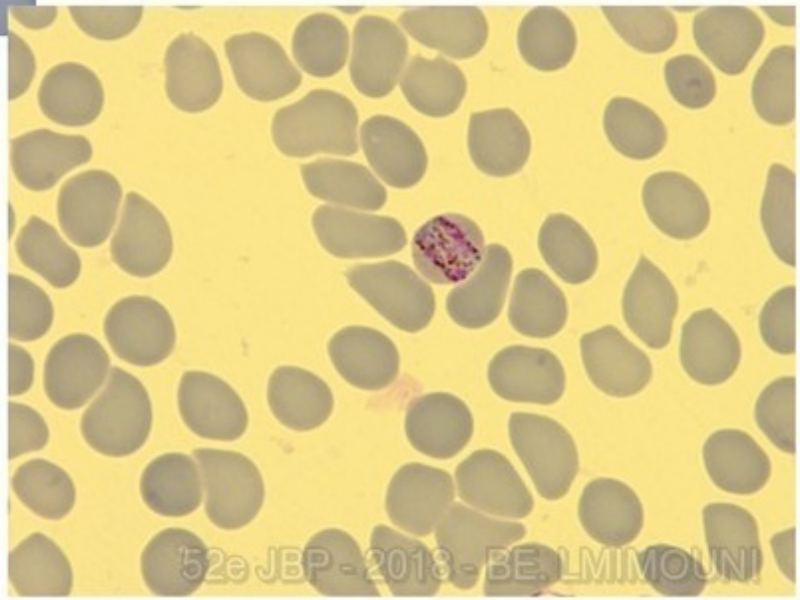
La microscopie optique

- Les clés du diagnostic
  - Aspect du frottis
  - Le globule rouge parasité
    - Taille
    - Forme
    - Inclusions cytoplasmique
  - Le parasite
    - Taille
    - Forme
    - Stade
    - Pigments
    - Nombre de noyaux




Author's
copyright ©




52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Attention

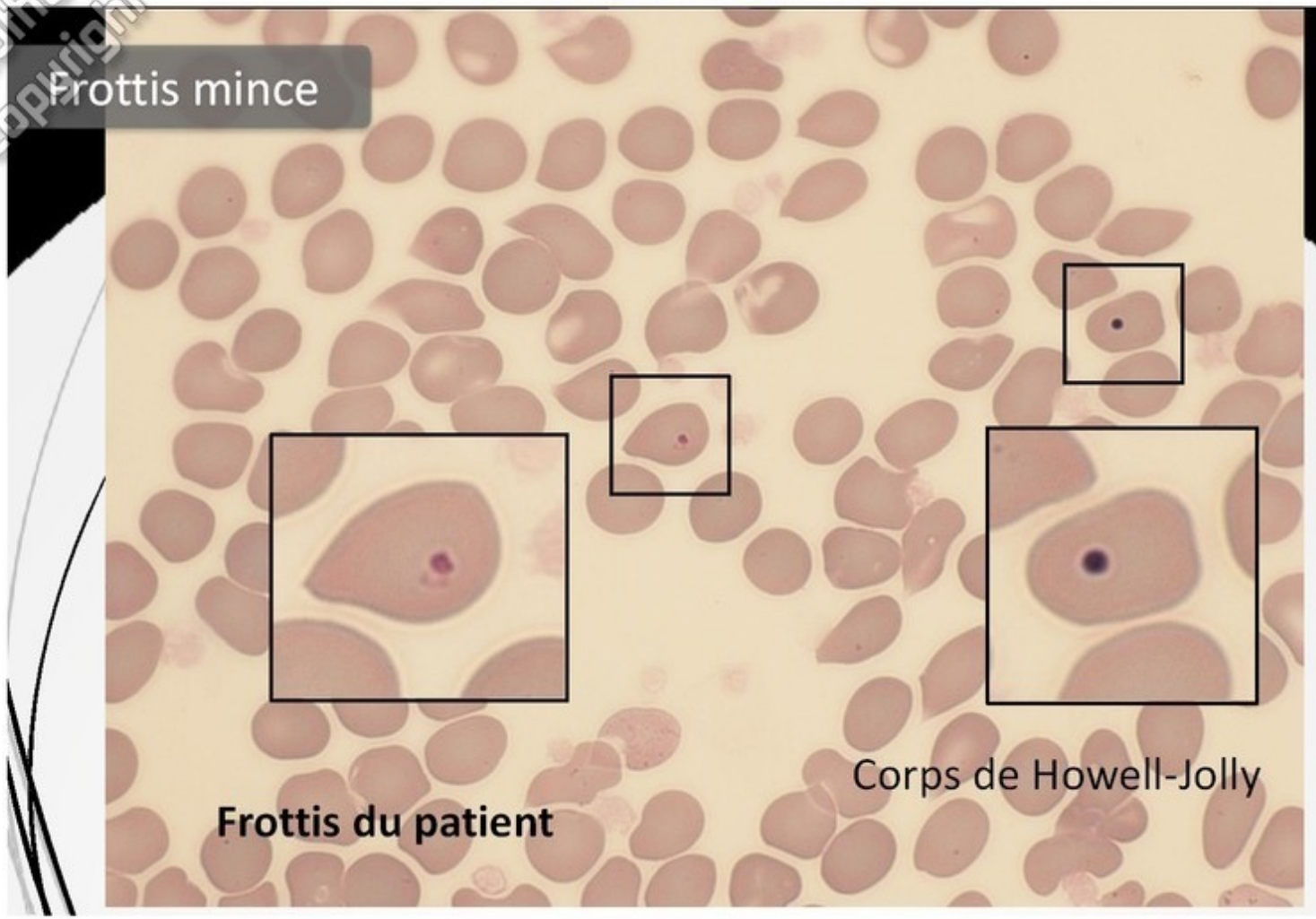
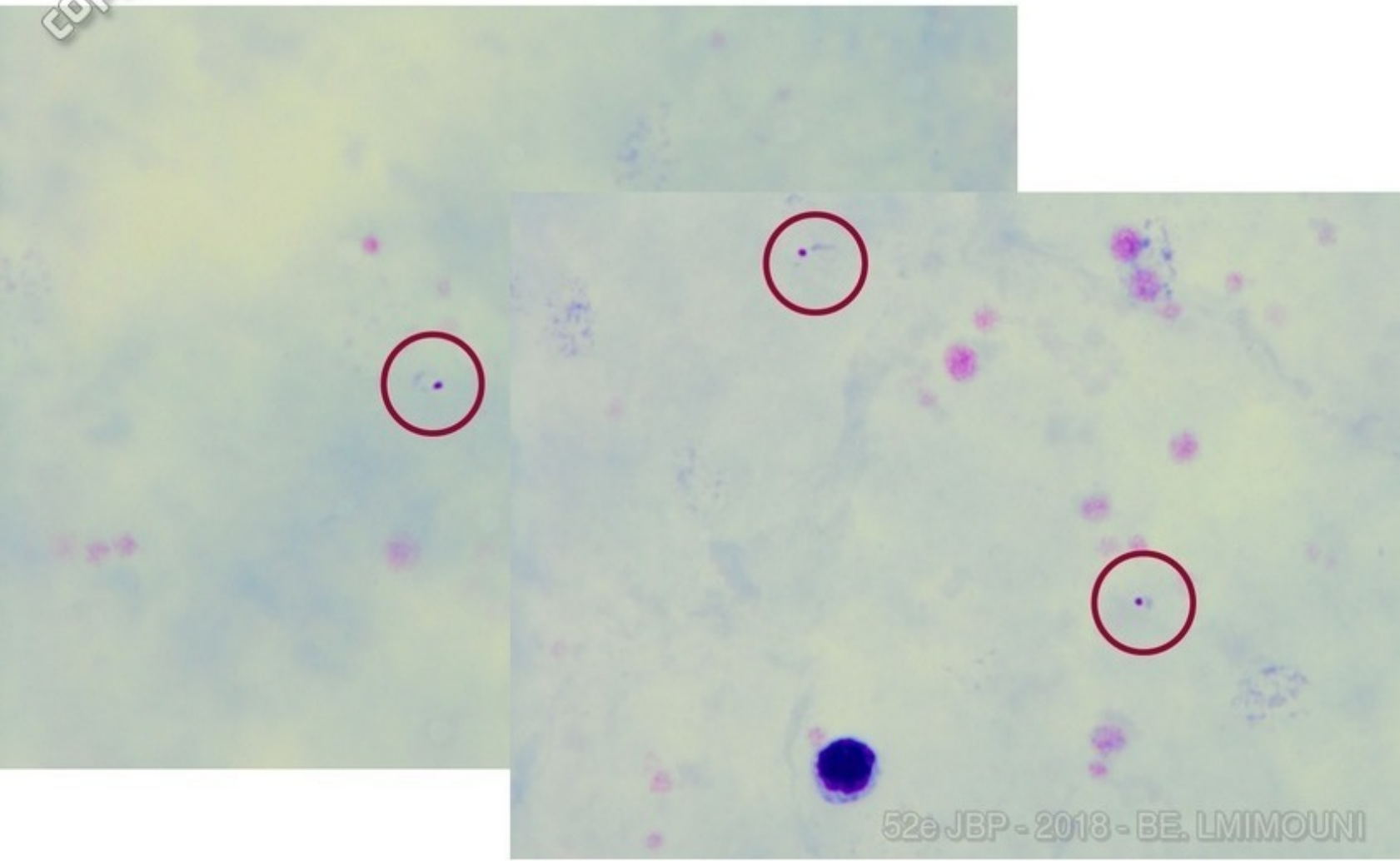


Photo: Pr Pierre FLORI, CHU Saint Etienne

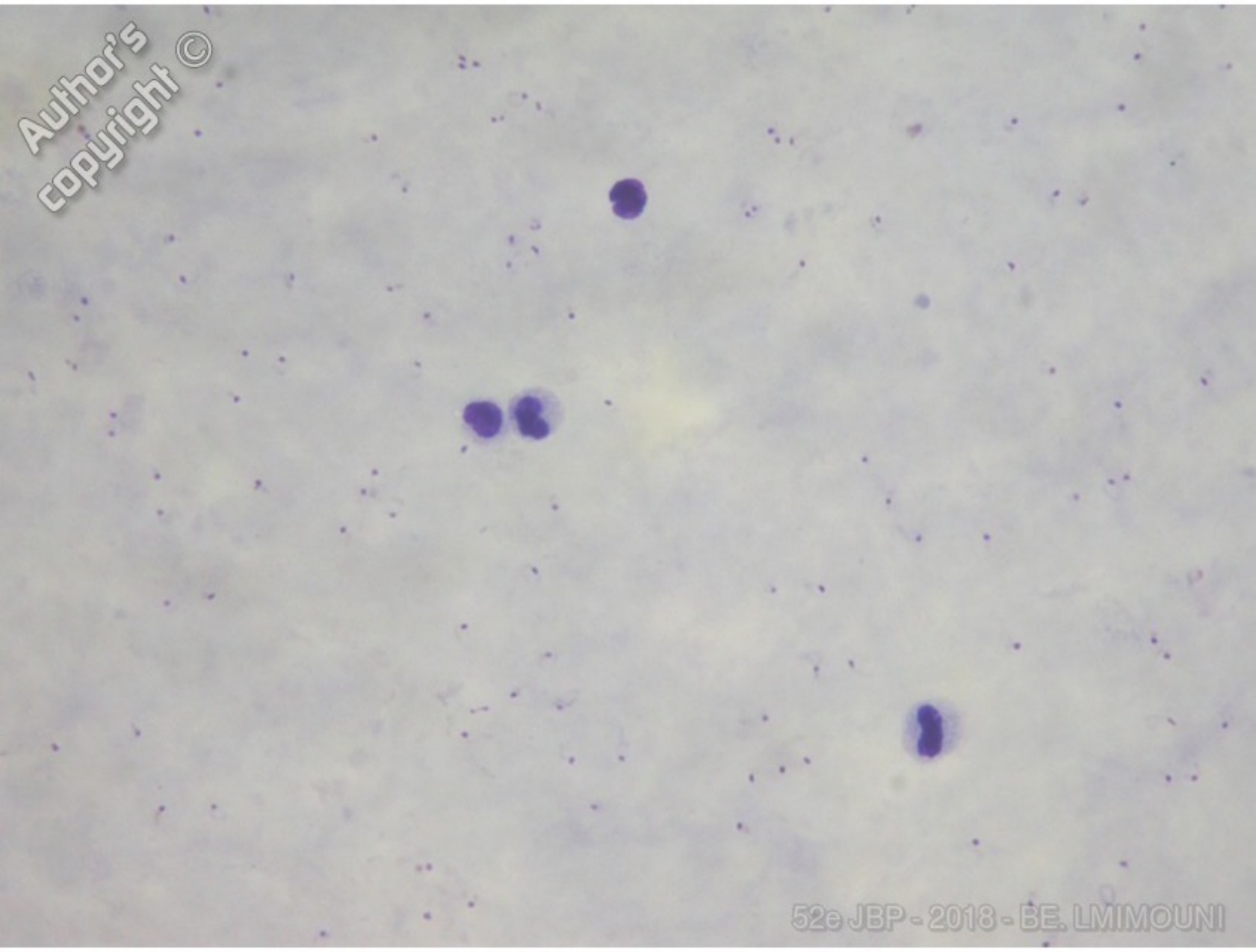
Author's copyright ©
52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Plasmodium falciparum intérêt de la GER

Author's copyright ©



52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI


Author's copyright ©
52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

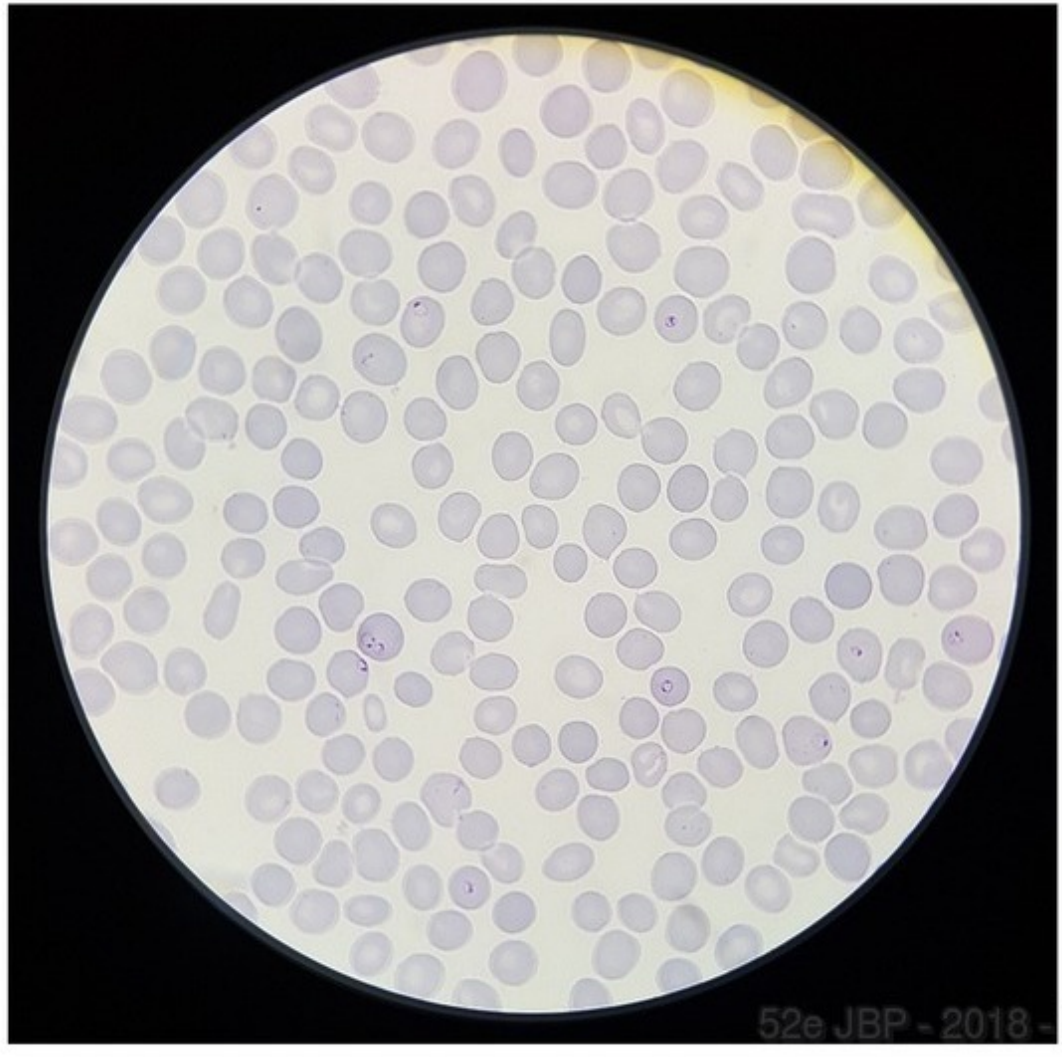
Author's copyright ©

Calcul de la parasitémie

- ✓ la parasitémie doit être rendue au clinicien en **pourcentage d'hématies parasitées**
- ✓ La mesure de la parasitémie exprime un **résultat quantitatif qui est intégré dans le processus décisionnel de prise en charge thérapeutique**
- ✓ **3,9% vs 4,1%**

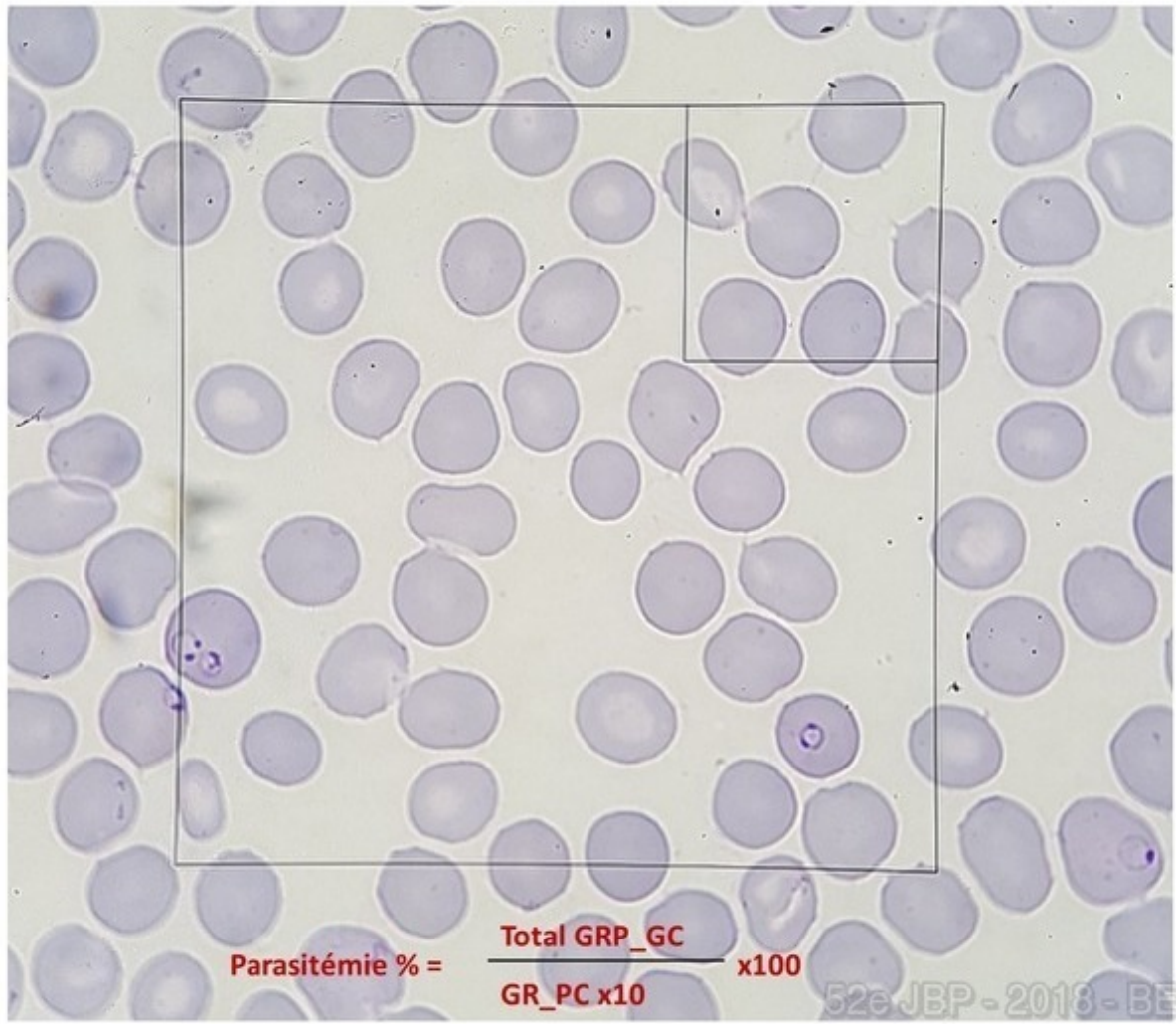
Author's copyright ©

Méthode classique



Author's copyright ©

Méthode de Miller



$$\text{Parasitémie \%} = \frac{\text{Total GRP_GC}}{\text{GR_PC x10}} \text{ x100}$$

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Alternative à la GE « OMS »

- **4 lames de FS**
  - 800 champs de 200 hématies
  - Sensibilité équivalente à une GE
  - Temps de lecture: 30 minutes (personne entrainée)

Author's copyright ©

Techniques alternatives

- Immunochromatographie pour la détection rapide des antigènes du paludisme : **TDR utilisant des AcMx**
  - Détections de différents antigènes
    - HRP2 *Plasmodium falciparum*
    - isoenzymes des LDH parasitaires (espèces et commun)
    - Aldolase (commun)

- **Microscopie à fluorescence**
  - **acridine orange « le QBC® »: seuil de détection 5-10p/µl**

- **Détection automatique de pigments et d'ADN intra-érythrocytaire (automates de NFS)**

- **Biologie moléculaire:** Multiples variantes
  - PCR traditionnelle
  - PCR nichée
  - PCR quantitative

Tests Immunochromatographiques TDR

Author's copyright ©

- **Antigènes utilisés pour la détection de *P. falciparum***
  - **HRP2 stades asexués et gamétocytes jeunes**
    - seuil de détection estimé : **50-100 parasites/µl**
    - **persistance** après disparition des parasites **1-4 semaines**
    - **Faux Négatifs:** Délétion du gène des protéines HRP2/3**
    - **réactions croisées** : avec facteur rhumatoïde « 2 à 10% avec FR + »
    - globalement Se 92-96%, Sp 94-99% vs GE
  - **isoEnzyme P-LDH stade asexuée et sexuée tout âge**
    - *P.falciparum, P.vivax*, Pan p-LDH (tous les stades érythrocytaires sexués et asexués)
    - **pas de persistance de l'Ag** (3-5 jours): suivi post thérapeutique
    - seuil de détection estimé : environ **100-150 parasites/µl**
    - réactions croisées : exceptionnelles
    - globalement Se 76-87%, Sp 98-99,7% vs GE
- **Antigènes utilisés pour la détection des autres espèces**
  - **Aldolase, p-LDH et Pv-LDH pas très bons**

** PLoS One 2010, 5, 8091

** Malaria J 2013, 12, 34

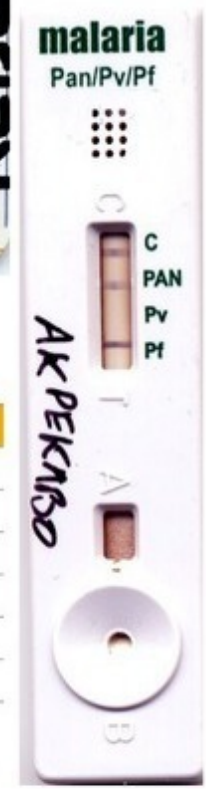
52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

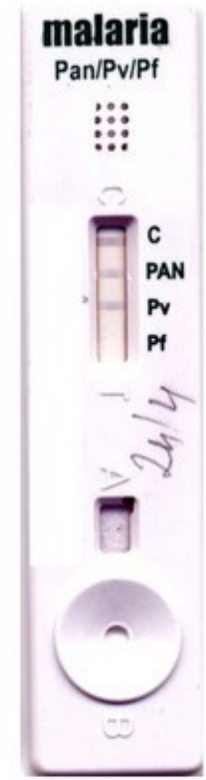
Author's copyright ©

Les TDR: exemples

Visualisation du résultat

- 2 bandes,
- 3 bandes génération 1&2,
- 4 bandes





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

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Détection d'antigène circulant TDR : le nouveau Gold Standard ?

- Simple, facile à lire
- Mobile
- Pas de nécessité d'une alimentation électrique

MAIS

- Performances variables et moins bonnes que la microscopie
- Robustesse à reconsidérer
- Parasitémie forte: phénomène de prozone (Faux négatifs)
- TDR pour *P.malariae et P.ovale* (Ag cible commun): performances insuffisantes
  - Mais peu intéressants au final puisque un simple FSM fait au moins aussi bien!

*** Beisel U et al. The complexities of simple technologies: re-imagining the role of rapid diagnostic tests in malaria control efforts. 2016; Malaria J, 15 (64): 9 p**

Author's copyright ©

TDR : Au total, hors zones d'endémies

associé à la microscopie

- Kit ciblant au minimum deux Ag:
  - toujours **l'HRP-2**, pour détecter en premier lieu et spécifiquement *P. falciparum.*
  - **pLDH** (pan) ou **l'aldolase** (pan) ;
- Association de deux TDR ciblant **l'Ag-HRP2** pour l'un et l'Ag **Pf pLDH** également spécifique de P. *falciparum* pour le second: renforcer la **sensibilité** et la **spécificité** du diagnostic de *P. falciparum* ;
- Si TDR avec trois bandes d'Ag, kit ciblant deux Ag de *P. falciparum* (pf pLDH) et un Ag commun au genre comme l'aldolase ou la pLDH.

Délétion du gène des protéines HRP2/3

- Si HRP 2 - et p-LDH ou Pf-LDH +

+ FS/GE + à Pf (Microscopiste confirmé)

- PCR de confirmation

Les TDR détectant Ag HRP2, répondent-t-il aux exigences du diagnostic d'accès palustre ?

Author's copyright ©

Performances		
Stades parasitaires		
Diagnostic d'espèce	**oui**	***+++ certaines situations***
Parasitémie		
Résultats < 2 heures	**oui**	***15 min***
Prix		

Les TDR détectant Ag HRP2, répondent-t-il aux exigences du diagnostic d'accès palustre ?

Author's copyright ©

Performances	< GE	*meilleur que FSM*
Stades parasitaires	non	*si couplé FSM*
Diagnostic d'espèce	oui	*+++ certaines situations*
Parasitémie	non	*si couplé FSM*
Résultats < 2 heures	oui	*15 min*
Prix 3-8 €/10-48 tests	GE x30	

Jamais utilisés seuls !!!

Non dissociable / FS-GE (Recommandations HAS)

Author's copyright ©

Discordance FS-GE vs TDR

- **FS GE +** vs **TDR –**

= Plasmodium non falciparum +++

= patient hyper immun +/- rare

= Phénomène de zone +/- rarissime

- **FS GE –** vs **TDR +**

= Paludisme décapité +++ (prophylaxie mal conduite, traitement curatif dans le mois précédent)

= Lecteur inexpérimenté ++

= Faux positifs TDR +/- rare

Le QBC® malaria test

Author © copyright ©

Planche 1.
Illustration de la technique du *QBC Malaria Test*

Illustration of the QBC malaria test technique

Photo 1. Remplissage du tube QBC.

Plate 1. Filling of the QBC tube.

Photo 2. Mise en place de l'obturateur.

Plate 2. Obturing the tube.

Photo 3. Introduction du flotteur.

Plate 3. Introduction of the float.

Photo 4. Centrifugeuse pour tubes capillaires.

Plate 4. Capillary tube centrifuge.

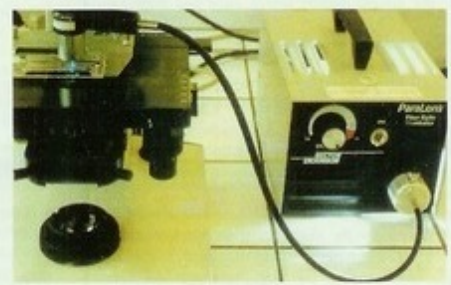


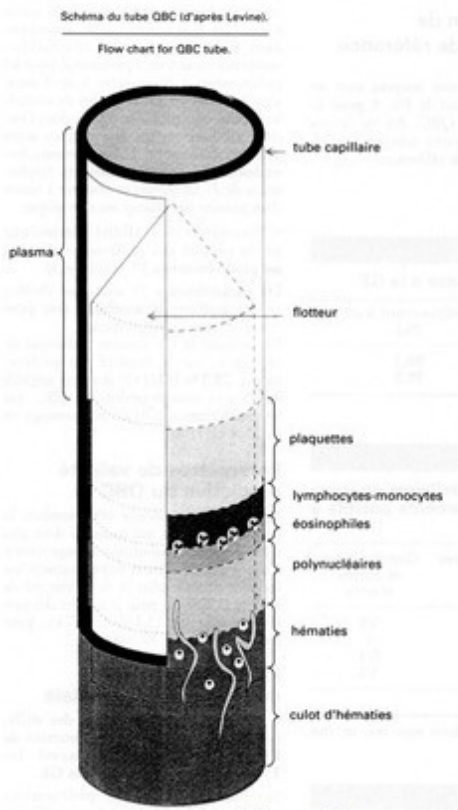
Photo 5. Microscope optique standard équipé du système de lecture du *QBC Malaria Test*.

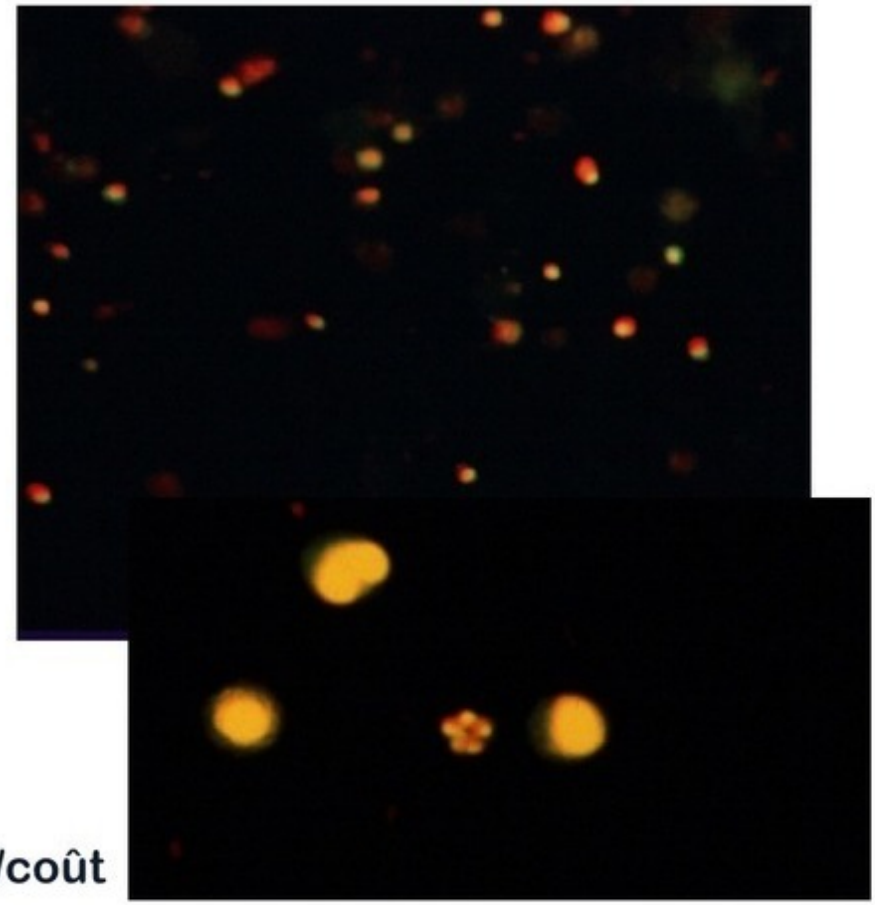
Plate 5. Standard optic microscope fitted with the system for reading QBC Malaria Test results.

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

* Confusion entre parasite et éléments non parasitaires (PQ, granulations leucocytaires, ...)
* Perturbé par des facteurs modifiant la centrifugation: microcytose, hémodilution, hyperleucocytose





Equipement/coût

Baird *et al. Trans Roy Soc Trop Med Hyg,* 1992; Benito *et al.* Appl Parasitol, 1994; Clendenen *et al. Trans Roy Soc Trop Med Hyg,* 1995.

Author's copyright ©

QBC répond-t-il aux exigences du diagnostic d'accès palustre ?

Stades parasitaires	non	si couplé FSM
Diagnostic d'espèce	non	si couplé FSM
Parasitémie	non	si couplé FSM
Résultats < 2 heures	Oui 15 min	
Prix	9900 € HT 4,30 €	Système optique et centrifugeuse Consommable

Détection des pigments malariques et ADN intra-erythrocytaire

Author's copyright

Analyseurs automatiques de NFS

Cell-Dyn 4000 (Abbot Diagnostics, Santa Clara, Ca)

Anomalies (Alarmes) de distribution des GB et l'histogramme des réticulocytes.

* Différenciation monocytes normaux des monocytes ayant digérés des GR parasités (hémozoïne dépolarise la lumière laser utilisée pour identifier les PNE)

* Sonde fluorescente (propidium iodide pour coloration des réticulocytes) colore le matériel intra-erythrocytaire: pic spécifique sur l'histogramme des réticulocytes étiqueté « pseudoréticulocytose »

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Automates NFS

- dans un CHU en Hollande*
  - Cell Dyn 4000® , 113 patients suspects de paludisme, en comparaison de la MO
  - 58 patients impaludés (46 *P. falciparum*)
  - en combinant les alarmes M+R : **Se 62%** **Sp 96%**

- au Qatar **
  - Cell Dyn 4000® ,1014 patients suspects de paludisme, en comparaison de la MO
  - 160 patients impaludés (75 *P. falciparum* et 85 *P. vivax*)
  - en combinant les alarmes Neu-Eos et Eos1 : **Se 52%** pour *P. falciparum* et 93% pour *P. vivax*

***Wever *et al. J Clin Microbiol*, 2002**

****Fawzi *et al. Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2003**

Author's copyright ©

Les automates de NFS répondent-t-ils aux exigences du diagnostic d'accès palustre ?

Performances	<< GE	
Stades parasitaires	**non**	si couplé FSM
Diagnostic d'espèce	**non**	si couplé FSM
Parasitémie	**non**	si couplé FSM
Résultats < 2 heures	**oui**	
Prix	avec NFS	

Intérêt potentiel de la biologie moléculaire

Author's copyright ©

PCR: seuil de détection le plus bas 0,005 - 1 p/µl

- Diagnostic d'espèces et diagnostic des infections mixtes
- Rectification de l'identification de l'espèce
- Discordance antigène HRP2/GE
- PVE
- Mais pas de différenciation des stades parasitaires (gamétocytes), pas de quantification et pas de suivi post thérapeutique (délai de clairance de l'ADN long, positive > 30j après un traitement bien conduit)
- En développement: quantification et distinction gamétocyte/trophozoïte (Schizontes?)
- **Bon test d'exclusion**

ET Lourdeur technique, coût

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

La PCR temps réel répond-t-elle aux exigences du diagnostic d'accès palustre ?

Author's copyright©

Performances	> GE	
Stades parasitaires		
Diagnostic d'espèce	Oui	*+++ certaines situations*
Parasitémie		
Résultats < 2 heures		
Prix		

La PCR temps réel répond-t-elle aux exigences du diagnostic d'accès palustre ?

Author's copyright

Performances	> GE	
Stades parasitaires	Non	*Gamétos?!!!!*
Diagnostic d'espèce	Oui	*+++ certaines situations*
Parasitémie	Non	*si couplé FSM*
Résultats < 2 heures	Non	*pas ∀ les conditions*
Prix	Oups!!	

Author's copyright ©

Quelle nouveauté? illumigene ®

Am. J. Trop. Med. Hyg., 94(2), 2016, pp. 336–339
doi:10.4269/ajtmh.15-0569
Copyright © 2016 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Identification of Five Human *Plasmodium* Species in Malaysia

Yee-Ling Lau,*† Meng-Yee Lai,† Mun-Yik Fong, Jenarun Jelip, and Rohela Mahmud
Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia; Sabah State Health Department, Sabah, Malaysia

illumigene
»Malaria

***illumigene*® Malaria**

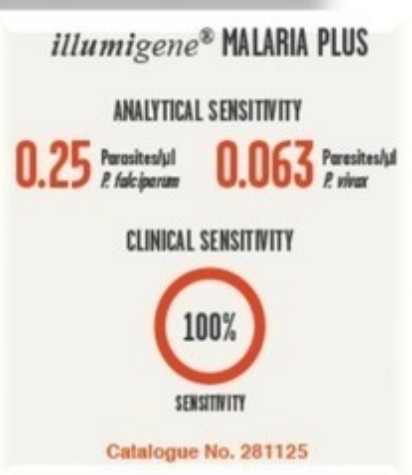
DNA amplification assays for the direct detection of *Plasmodium spp.* DNA in human whole blood samples

- 1ère solution « Point of Care »
- Pas une PCR, mais une amplification génique isotherme (Technique LAMP)
- Loop Mediated Isothermal Amplification: Amplification isotherme en boucle

Author's copyright ©

Détection d'ADN par LAMP

- Amplifie l'ADN et détecte la présence du parasite sans chauffage ni réfrigération, T° constante à 65°C
- Résultat (détection à l'œil nu) par turbidimétrie ou fluorescence
- Simple, précise, facile à utiliser et pas chère
- 2 configurations, Détectabilité
  - 2-0,125 parasites/µl
  - 0,25-0,063 parasites/µl
- Commercialisé en France par Méridian
- Prix: 20-22 Euros



Author's copyright ©

Pourquoi illumigene ® Malaria?

- Sensibilité +++
- Praticabilité: **plus de TDR ni GE**
- Faisabilité:
  - Rapidité < 1 heure
  - Pas de locaux type Bio-Mol avec séparation des pièces
  - Extraction intégrée
  - Coût abordable (réactif, automate, temps de technicien)
  - Faible encombrement
- Technique compatible au rendu **en 2 heures**
- Test avec une **VPN à 100%** = fiabilité de la recherche la nuit et le WE

Tableau 1 : Performance de Illumigene® Malaria par rapport aux autres techniques diagnostiques dans le cadre du diagnostic

Espèces	Microscopie		BinaxNOW® Malaria *		Illumigene ®Malaria	
	Nég.	Pos.	Nég.	Pos.	Nég.	Pos.
Négatifs (N=85)	85		1		85 (100%)	
P. falciparum (N=44) (<8p/µl – 423 000p/µl)	1	43	1	43		44 (100%)
P. ovale (N=11) (68p/µl – 24 300p/µl)		11	8	3		11 (100%)
P. vivax (N=3) (900p/µl – 9000p/µl)		3	0	3		3 (100%)
P. malariae (N=2) (180p/µl – 2250p/µl)		2	1	1		2 (100%)

*: HRP2 pour *P. falciparum*; aldolase pour *P. vivax*

MAIS:
- pas d'identification d'espèce
- Pas quantitative: Neg/Pos

Apport de l'Illumigene® malaria dans le diagnostic du paludisme d'importation. Argy et al, CNR paludisme, RICAI 2016

Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A robust molecular diagnostic tool for Malaria Parasites. Nat Scientific report. Lucchi NW, 2016

52e JBP - 2018 - BE: LMIMOUNI

Author's copyright ©

Suivi de l'efficacité thérapeutique

- Prélèvements sanguins **J3, J7 et J28** (+J14, J21 si Artésunate)
- Suivi: Frottis et GE
  - Quantification
  - Différenciation des gamétocytes
- TDR et PCR non recommandées
  - Persistance Ag et ADN sous traitement
  - Qualitatifs

Author's copyright ©

Notre attitude

1/ Réalisation systématique d'une technique de concentration: **GER**

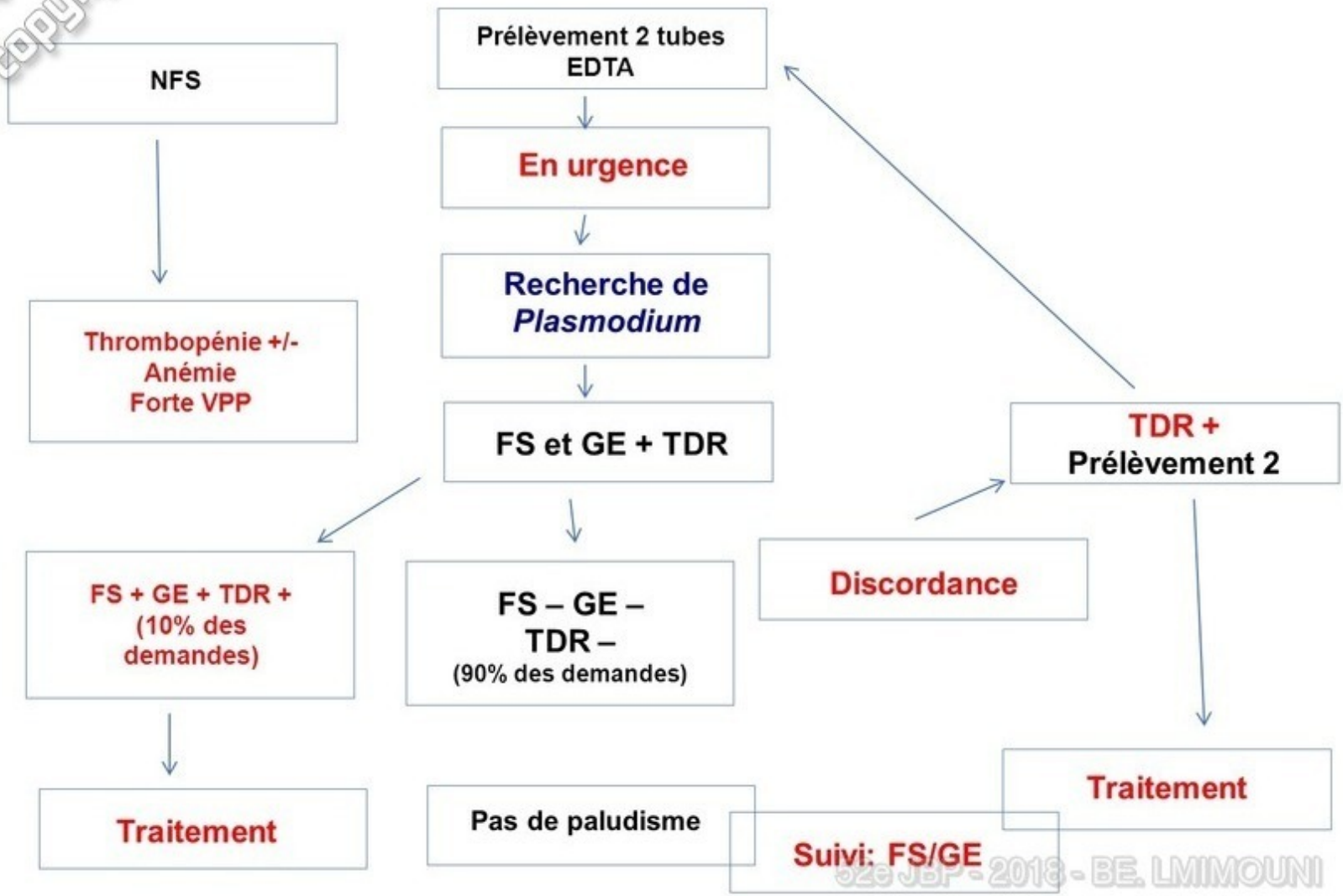
2/ Réalisation d'une TDR pour la détection de l'antigène **HRP II** spécifique de *Plasmodium falciparum* (diagnostic rétrospectif, patients sous chimioprophylaxie, faibles parasitémies, co-infection, micrscopistes peu expérimentés « garde »)

+

3/ Est réalisé mais non lu systématiquement: **FSM** (lecture uniquement en cas de positivité de la GER)

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Algorithme Rabat (depuis 2006)



Author's copyright ©

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Recommandations internationales

Author's Copyright ©

Recommandations de l'OMS

«la mise en œuvre rapide d'une technique de diagnostic par microscopie **ou** test de diagnostic rapide du paludisme (TDR) pour tous les patients suspects de paludisme avant l'administration d'un antipaludique »

http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241502092/en/index.html

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Recommandations 12ème conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuses de la SPILF

(HIA Bégin, 14 Avril 1999)

« Le diagnostic biologique du paludisme est une **urgence**. Les résultats doivent être rendus dans un délai maximum de **2 heures** en prenant contact avec le clinicien. »

- FSM (seuil de détection 150 p/µl)
- GER (seuil de détection 5-10 p/µl)
  - **Observateur dépendant**

http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/palu99.pdf

62e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

d'après la 12ème conférence de consensus anti-infectieuse de la SPILF (HIA Bégin, avril 1999)

« La relation entre la parasitémie et la gravité doit s'interpréter selon les caractéristiques des populations observées…Ainsi, une **parasitémie > 5%** est **dangereuse chez un sujet non immun mais peut être bien tolérée chez un semi-immun** »

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Révision de la Conférence de Consensus de 1999 Recommandation pour la pratique clinique (2007)

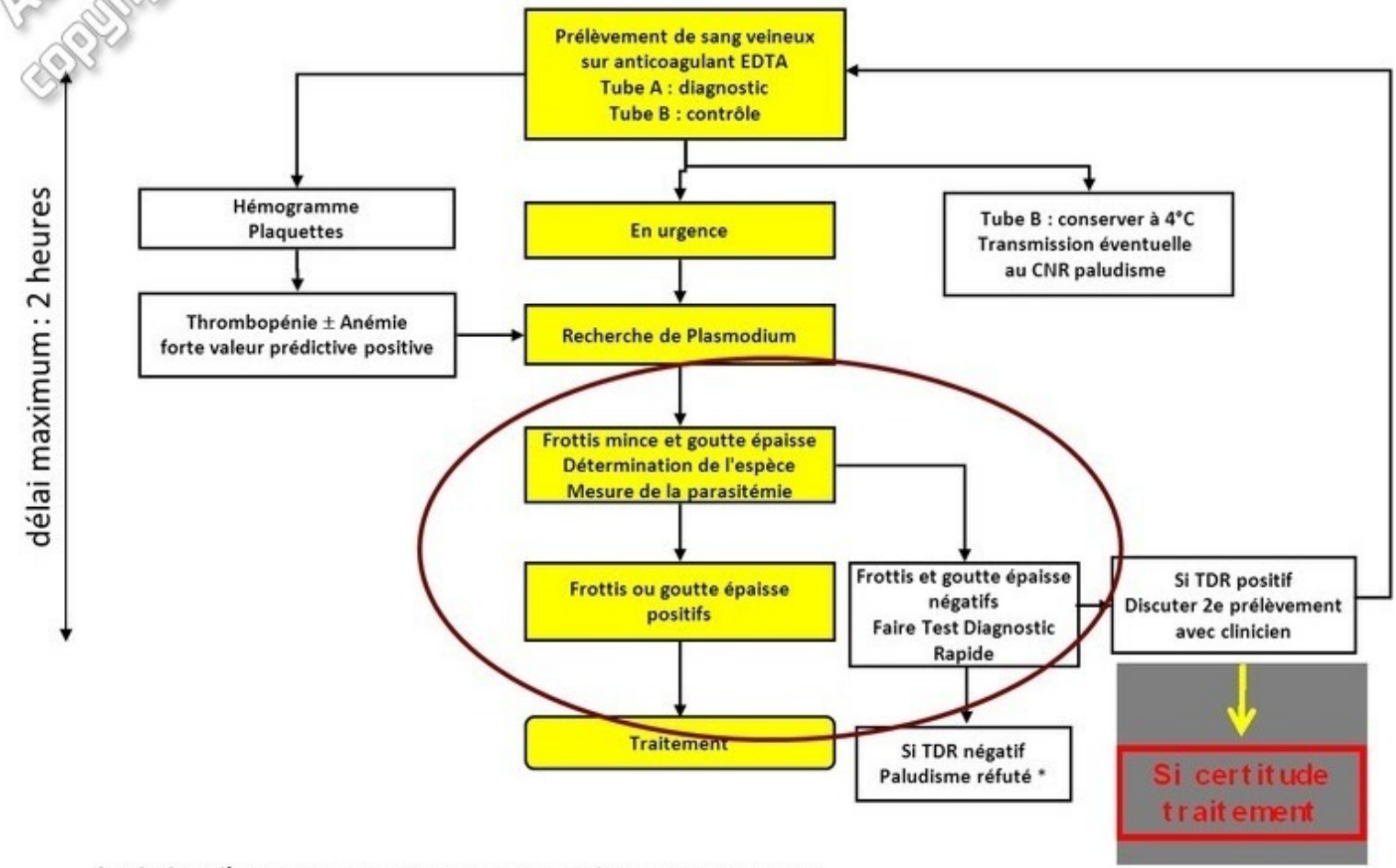
«Toute fièvre, isolée ou associée à des symptômes généraux, digestifs, respiratoires, ou neurologiques, après un séjour en zone d'endémie, nécessite un avis médical urgent et la réalisation d'un diagnostic parasitologique en urgence»

Seuil décisionnel: parasitémie à 4%

SPILF, SFP, SF pédiatrie, SMV, SPE, Med Mal Infect. 2008;38(2):68-117

Author's copyright ©

Protocole du diagnostic parasitologique du paludisme



* Répéter l'examen sanguin si suspicion clinique persistante

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

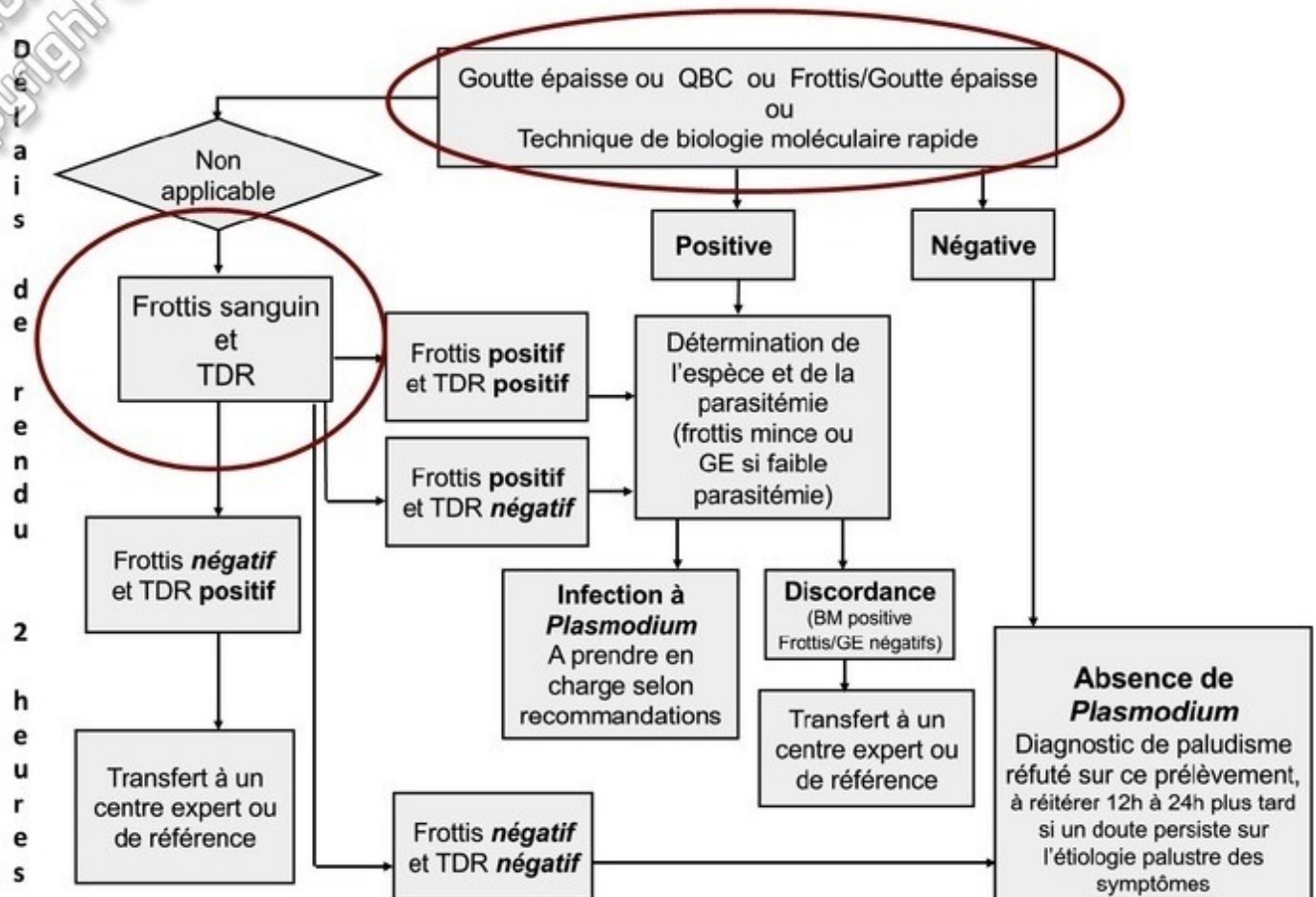
Mises à jour des recommandations de 2007 pour la pratique clinique pour la prise en charge et la prévention du paludisme d'importation des sociétés savantes françaises (Juin 2017)

«La confirmation d'une suspicion de paludisme d'importation repose sur la mise en évidence directe **et** indirecte du parasite sur un prélèvement sanguin qui doit être faite dès que possible, sans attendre un frisson ou un pic thermique. Le prélèvement doit être accompagné des renseignements épidémiologiques et cliniques indispensables : pays endémique de séjour, date de retour, traitement antipaludique prophylactique ou curatif antérieur »

http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©



Logigramme du diagnostic biologique du paludisme

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©

Points forts recommandations Consensus 2017

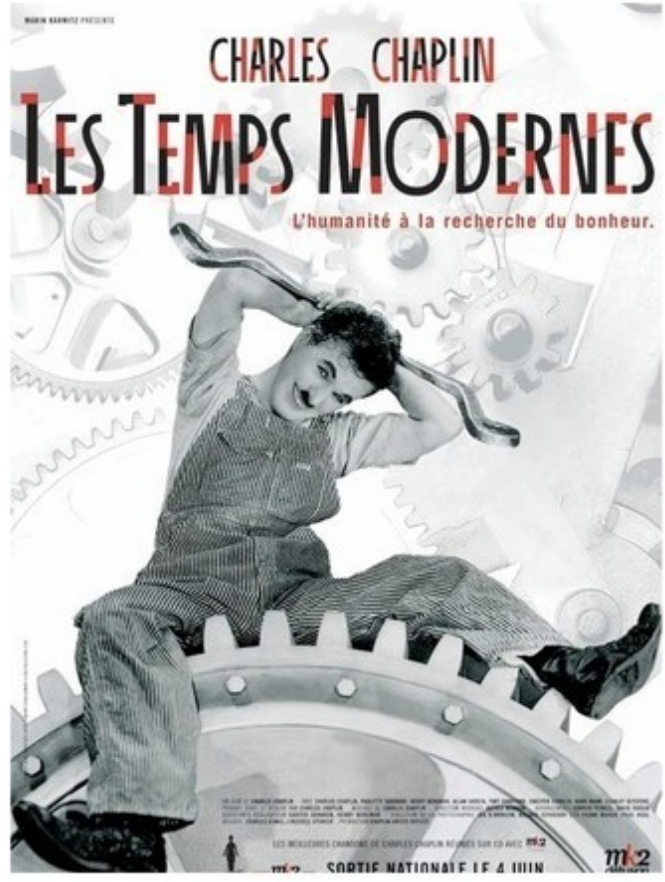
- NABM: couplage **FS et GE**
- Consensus 2017: couplage **d'une technique sensible** (GE, QBC, PCR?) à un **FS** (évaluation de la parasitémie et identification des espèces)
- Alternative possible **TDR-FS.** Dans ce cas et en cas de résultat négatif, proposer un contrôle à 12h-24h ou **contrôle par PCR** dans une structure de référence (pauci-infection, identification d'espèce ou recherche d'association d'espèces)
- TDR avec **HRP2** (*P.falciparum*) obligatoirement
- **Objectif du diagnostic d'urgence:** A **2h** de **réception**, **4h** du **prélèvement**, rendre:
  - **Positif ou négatif**
  - ***P.falciparum*** ou non (diagnostic d'espèce)
  - **Parasitémie (4% = signe biologique de gravité)**
  - **Si positif, contact médical et recherche de signes de gravité**

Author's copyright ©

Pays	Recommandations
ESCMID	- **FS et GE +++** - TDR - PCR non en routine Suivi après le diagnostic: FS et GE
Canada	- **TDR ++** - FS - PCR pour confirmation - Résultat en 2h
UK	- **FS et GE +++** - TDR en complément - Délai: 4h
Suisse	- **FS ou TDR** - Délai < 2h
Espagne	- **GE ou TDR et FS** - Délai: 3h
Australie	- **FS et GE et TDR**

52e JBP - 2018 - BE. LMIMOUNI

Author's copyright ©



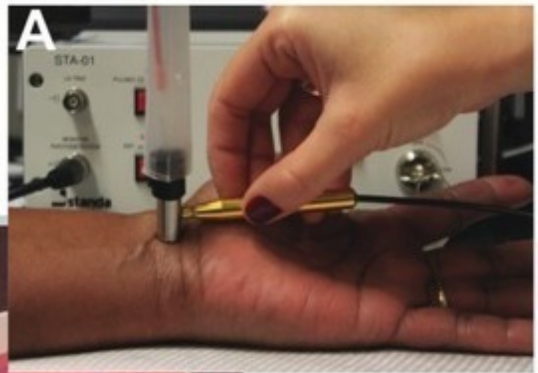
Perspectives
Que sera demain? Le début ou la fin…

Author's copyright ©

Diagnostic transdermal ?

Méthode du pop-corn au micro-onde

« Théranostique »



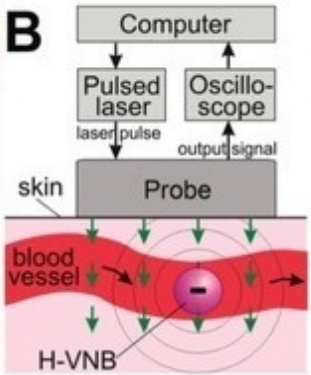
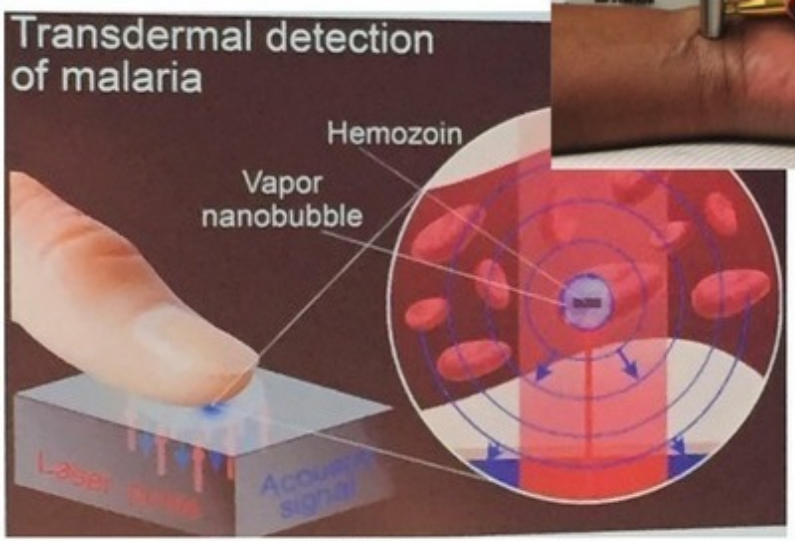


Figure 1. A) Experimental laboratory prototype of a malaria diagnostic device with the pulsed laser and the integrated probe shown being scanned across a human wrist. B) Functional diagram of the prototype and the principle of transdermal optical excitation and acoustic detection of vapor nanobubbles around hemozoin in malaria-infected cells exposed to the laser pulses (green arrows). H-VNB, hemozoin-generated vapor nanobubble.



Transdermal Diagnosis of Malaria Using Vapor Nanobubbles

Ekaterina Lukianova-Hleb, Sarah Bezek, Reka Szigeti, Alexander Khodarev, Thomas Kelley, Andrew Hurrell, Michail Berba, Nirbhay Kumar, Umberto D'Alessandro, Dmitri Lapotko

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 21, No. 7, July 2015

SD = 10-20 parasites/µl

Impulsions laser: génère et détecte des nano-bulles de vapeur dans les GRP

Excitation de l'hémozoïne qui va chauffer et détruire le GRP sans altérer les cellules voisines

*** Lukianova Hleb et al. Transdermal Diagnosis of malaria using vapor nanobubbles. Emerg Infect Dis. 2015; 21 (7): 1122-7**

Author's copyright ©

Nouvelle microscopie

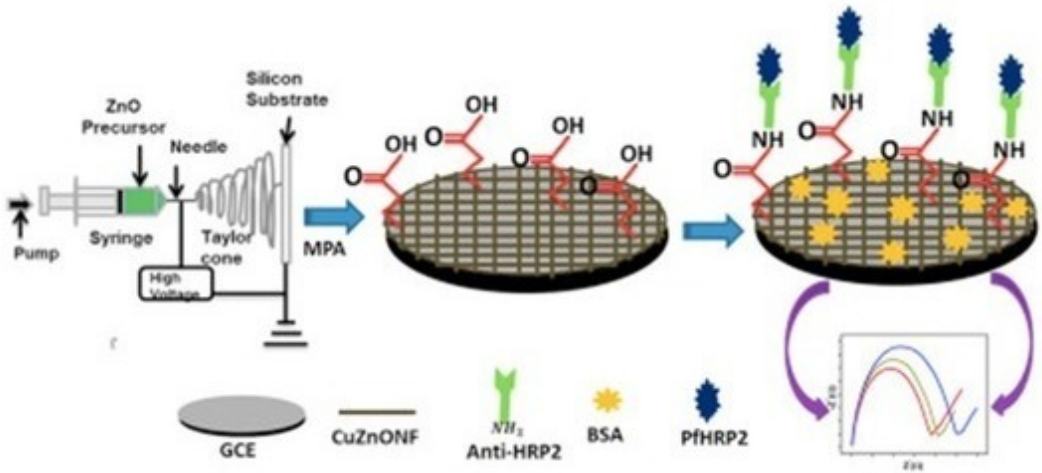
- **Computer vision based technology: ParaSight (Sight Diagnostics Parasight platform)**
  - Analyse de 270 champs avec 0,2 µl de sang additionné d'un marqueur fluorescent en 5 min soit 56 patients en 8h
  - Sensibilité et spécificité / PCR: **97,05% et 96,33%**
  - Distinction des Pf dans 73,3% et des Pv dans 91,4%
  - Calcul de la parasitémie /GB
  - Pearson correlation coefficients = **0,84**

* Eshel Y et al. Evaluation of the Parasight Platform for Malaria Diagnosis. 2017; J Clin Microbiol, 55 (3): 768 - 775

Author's copyright ©

Les nouveaux TDR
Pousser la détectabilité à ses limites …

- Emploi de nano-tubes de carbone recouverts d'un biosensor en oxyde de zinc dopé au cuivre: mesure d'une réaction rédox par spectroscopie d'impédance électrochimique
  - Détectabilité de 6,8 attogrammes /ml d'HRP2 soit 100 millions de fois moins que sur un TDR classique en immunochromatographie in vitro



* Brince Paul et al. A highly sensitive self assembled monolayer modified copper doped zinc oxide nanofiber interface for detection of Plasmodium falciparum histidine rich protein 2: targeted towards rapid, early diagnosis of malaria. Biosensors and Bioelectronics. 2016; 80: 39-46.

Dr. BB 2018 BE AMMOUNI

La microcytométrie en flux

Author's copyright

analytical chemistry
Article
pubs.acs.org/ac

High-Throughput and Label-Free Blood-on-a-Chip for Malaria Diagnosis

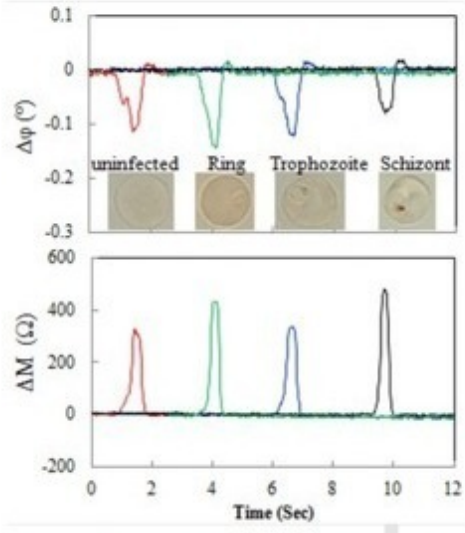
Yang Jun Kang,[†] Young-Ran Ha,[‡] and Sang-Joon Lee*,[§]

NIH Public Access
Author Manuscript
Lab Chip. Author manuscript; available in PMC 2014 October 07.
Published in final edited form as:
Lab Chip. 2013 October 7; 13(19): 3903–3909. doi:10.1039/c3lc50540e.

Electric Impedance Microflow Cytometry for Characterization of Cell Disease States†

E Du[#a], Sungjae Ha[#b], Monica Diez-Silva[a], Ming Dao[*,a], Subra Suresh[a], and Anantha P. Chandrakasan[*,b]

- Mesure de la déformabilité et des changements de propriétés électriques du cytoplasme et de la membrane des cellules infectées
- Spectrométrie par impédance électrique
- Flux continu et sans traitement de l'échantillon
- Détectabilité insuffisante:
  - Ring: 0,515%
  - Trophozoïte: 0,0544%
  - Schizontes: 0,0054%



* Du E et al. Electric Impedance Microflow Cytometry for characterization of cell disease states. Lab Chip. 2013; 13 (19): 3903-3909.

* Jun Kang et al. High Throughput and label free blood on a chip for malaria diagnosis. Analytical Chemistry. 2016; 88 (5): 2912-22.

Author's copyright ©

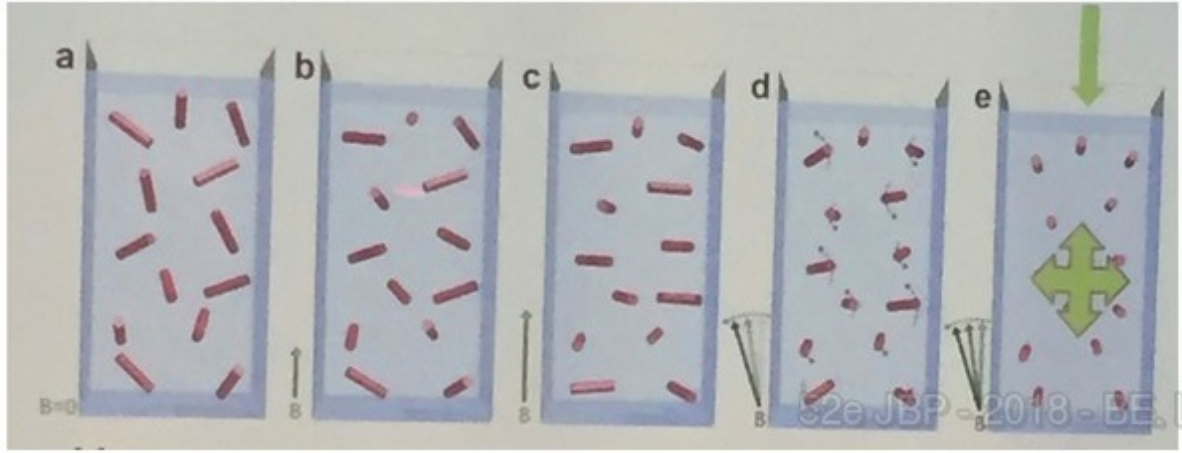
Détection de l'hémozoïne

OPEN ACCESS Freely available online PLOS | ONE

Evaluation of a Novel Magneto-Optical Method for the Detection of Malaria Parasites

Ágnes Orbán[1], Ádám Butykai[1], András Molnár[1], Zsófia Pröhle[1], Gergö Fülöp[1], Tivadar Zelles[2], Wasan Forsyth[3], Danika Hill[3,4], Ivo Müller[3], Louis Schofield[3,5], Maria Rebelo[6], Thomas Hänscheid[6], Stephan Karl[3], István Kézsmárki[1,7]*

- Réorganisation magnétique des cristaux
- Mesure par spectrométrie (**Butykai et al. Scientific reports, 2013**)
  - **> 1 parasite/µl**
- Mesure par diffraction laser. **Orban A et al. Evaluation of a novel magneto-optical method for the detection of malaria parasites. Plos One. 2014; 9 (5).**
  - **> 10 parasites/µl**



32e JBP - 2018 - BE.LMIMOUNI

PCR en temps réel en Lab-on-CHIP

Author's copyright ©

- Aquila (Canada)
- 2 parasites/µl
- Distinction Pf et Pv
- Sensibilité 96,7%
- Spécificité 100%
- Culture de Pf

Taylor et al. Malaria Journal 2014, 13:179
http://www.malariajournal.com/content/13/1/179

MALARIA JOURNAL

METHODOLOGY Open Access

A lab-on-chip for malaria diagnosis and surveillance

Brian J Taylor[1,2], Anita Howell[1], Kimberly A Martin[1,2], Dammika P Manage[4], Walter Gordy[1], Stephanie D Campbell[1], Samantha Lam[1,2], Albert Jin[1,2], Spencer D Polley[5], Roshini A Samuel[1,2], Alexey Atrazhev[4], Alex J Stickel[1], Josephine Birungi[6], Anthony K Mbonye[7,8], Linda M Pilarski[4], Jason P Acker[3,9] and Stephanie K Yanow[1,2*]

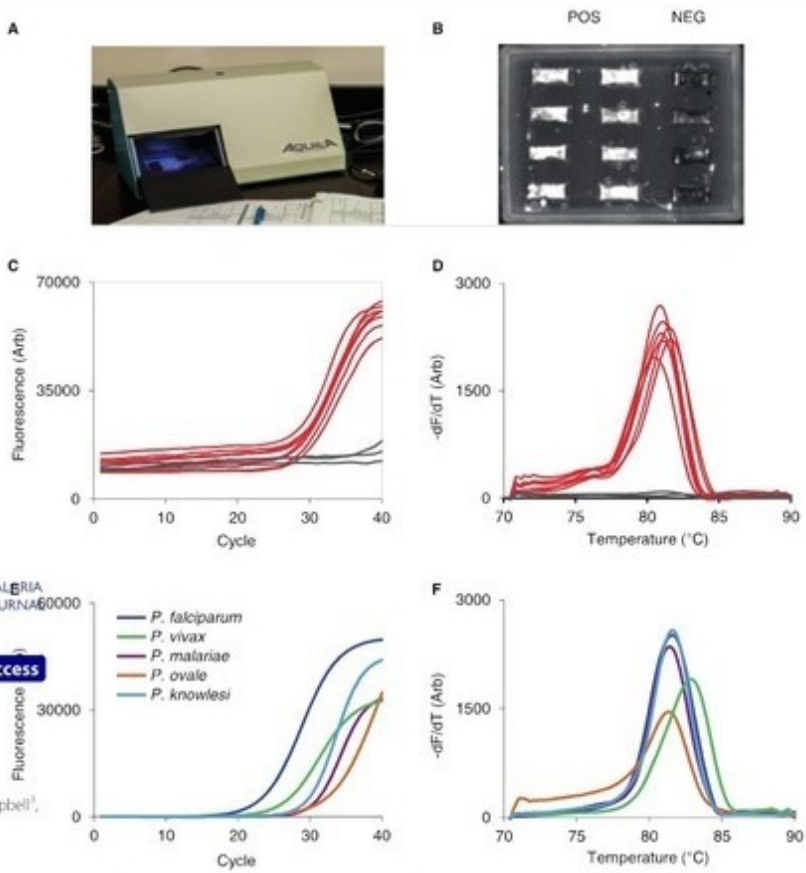


Figure 2 Malaria detection on hydrogel wax chips. (A) The 'Gelcycler', a custom-built, miniaturized real-time PCR instrument. **(B)** Raw SYBR green fluorescence images from positive and negative control wells in the wax chip. **(C)** Real-time PCR amplification curves and **(D)** melt curve analysis of the negative (gray) and positive (red) controls in **(B)**. **(E, F)** *Plasmodium* DNA detected from clinical samples and a spiked *P. knowlesi* sample using PCR with conserved primers. Positive samples exhibit an amplification curve **(E)** and melt curve **(F)** at the appropriate melting temperature for each species.

*** Taylor et al. A lab-on-chip for malaria diagnosis and surveillance. Malaria Journal. 2014; 13: 179**

Author's copyright ©

PCR en temps réel dans un POC

PLOS | ONE

- True Lab Uno (Inde)
- < 5 parasites/µl
- Distingue les 5 espèces
- 99,3% de sensibilité

Fig 1. Addition of 5µl of DNA to Truenat Malaria chip on Truelab Uno™ microP.

RESEARCH ARTICLE

Differential Diagnosis of Malaria on Truelab Uno®, a Portable, Real-Time, MicroPCR Device for Point-Of-Care Applications

Chandrasekhar Bhaskaran Nair[1,4], Jagannath Manjula[1], Pradeep Annamalai Subramani[2], Prakash B. Nagendrappa[3], Mulakkapurath Narayanan Manoj[1], Sukriti Malpani[1], Phani Kumar Pullela[1], Pillarisetti Venkata Subbarao[1], Siva Ramamoorthy[4], Susanta K. Ghosh[2]*

* Nair CB et al. Differential diagnosis of malaria on truelab Uno®, a portable real time micro PCR device for point of care applications. Plos One. 2016; 11 (1).

LAMP + TDR basique
Méthode MacGyver

Authors copyright

- LAMP associée à une détection des amplicons biotinylés par immunochromatographie
- Run de 1 heure
- Cout de 1 $

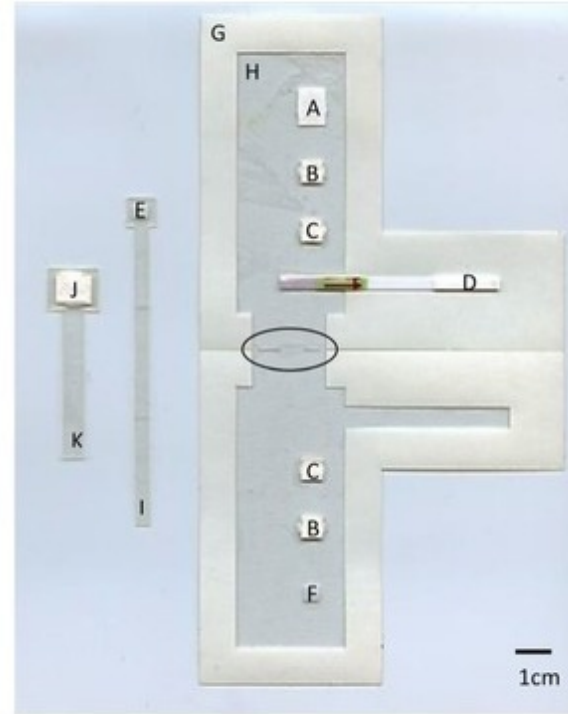
Cordray and Richards-Kortum *Malar J* (2015) 14:472
DOI 10.1186/s12936-015-0995-6

Malaria Journal

RESEARCH Open Access

A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection of *Plasmodium* DNA

Michael S. Cordray* and Rebecca R. Richards-Kortum



* Cordray MS. A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection Plasmodium DNA. of Malaria Journal. 2015; 14: 472.

Author's copyright ©

PCR en temps réel dans un POC

PLOS | ONE

- True Lab Uno (Inde)
- < 5 parasites/µl
- Distingue les 5 espèces
- 99,3% de sensibilité

Fig 1. Addition of 5µl of DNA to Truenat Malaria chip on Truelab Uno™ microP.

RESEARCH ARTICLE

Differential Diagnosis of Malaria on Truelab Uno®, a Portable, Real-Time, MicroPCR Device for Point-Of-Care Applications

Chandrasekhar Bhaskaran Nair[1,4], Jagannath Manjula[1], Pradeep Annamalai Subramani[2], Prakash B. Nagendrappa[3], Mulakkapurath Narayanan Manoj[1], Sukriti Malpani[1], Phani Kumar Pullela[1], Pillarisetti Venkata Subbarao[1], Siva Ramamoorthy[4], Susanta K. Ghosh[2]*

* Nair CB et al. Differential diagnosis of malaria on truelab Uno®, a portable real time micro PCR device for point of care applications. Plos One. 2016; 11 (1).

LAMP + TDR basique
Méthode MacGyver

Authors copyright

- LAMP associée à une détection des amplicons biotinylés par immunochromatographie
- Run de 1 heure
- Cout de 1 $

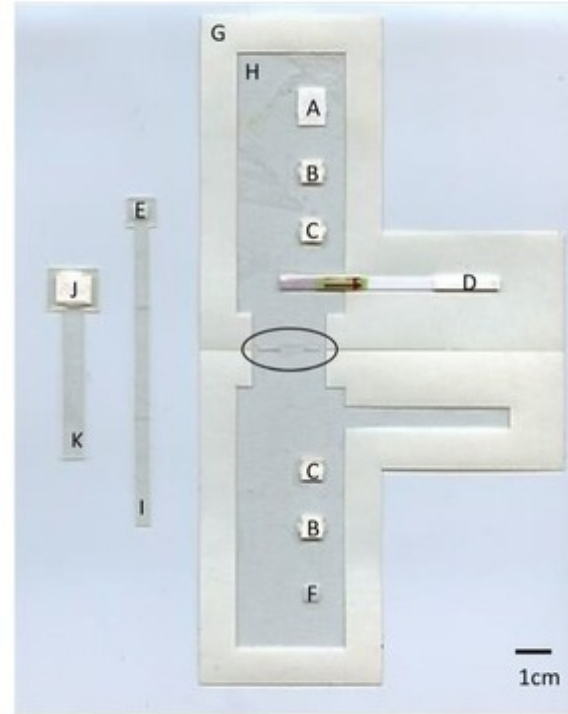
Cordray and Richards-Kortum *Malar J* (2015) 14:472
DOI 10.1186/s12936-015-0995-6

Malaria Journal

RESEARCH Open Access

A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection of *Plasmodium* DNA

Michael S. Cordray* and Rebecca R. Richards-Kortum



* Cordray MS. A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection Plasmodium DNA. of Malaria Journal. 2015; 14: 472.

Author's copyright ©

CONCLUSION

- Pas de méthode universelle pour remplacer la GE associée au FSM
- Importance du contexte
- Association de tests
- Amélioration et standardisation de la GE et du frottis
- Déterminer la place des nouvelles méthodes

- ✓ La **mesure de la parasitémie** doit être réalisée pour l'espèce *P. falciparum* et l'espèce *P. knowlesi*
- ✓ La parasitémie doit être rendue au clinicien en **pourcentage d'hématies parasitées**
- ✓ La mesure de la parasitémie exprime un résultat quantitatif qui est intégré dans le processus décisionnel de prise en charge thérapeutique du patient