

Ann Biol Clin 2000, 58: 310-5

Le diagnostic du paludisme dans les régions non endémiques : valeur, limites et complémentarité des méthodes actuelles

M.P. Brenier-Pinchart*

C. Pinel*

R. Grillot*

P. Ambroise-Thomas*

Résumé. Le diagnostic biologique du paludisme est une urgence médicale d'importance vitale, et on observe chaque année en France plus de 5 000 cas de paludisme d'importation. L'examen d'étalements minces de sang fixé et coloré demeure la technique de référence, mais il exige une expérience personnelle dont ne disposent pas tous les biologistes praticiens. La tentation est donc de le remplacer par d'autres méthodes plus simples (QBC® test) ou qui n'exigent pas de compétence particulière (tests à la bandelette de détection d'antigènes plasmodiaux ParaSight® et ICT Malaria Pf®), mais qui sont exposées à plusieurs risques d'erreur. Ces différents tests doivent donc être considérés comme complémentaires et si possible simultanément mis en œuvre, la meilleure séquence étant : test QBC® – étalement mince – détection d'antigènes plasmodiaux (tests ParaSight® ou ICT Malaria Pf®).

Mots clés: Paludisme - Diagnostic.

Summary. The biological diagnosis of malaria is urgent to avoid rapid and fatal outcome. Every year in France, 5,000 imported malaria cases are observed. Thin stained blood smear microscopical examination remains the reference method of diagnosis; however its performance is linked to the professionnal competence of the biologists. Thus easier methods have been developed (QBC** test). Some of them, limited to the diagnosis of malaria due to *Plasmodium falciparum* do not require highly skilled personal to perform or interpret (antigen detection on dipsticks, tests Parasight** or cardboard, ICT Malaria Pf**), but limitations and errors occure. These different tests must be complementary methods of traditional diagnosis. In association with microscopical examinations, they provide rapid and efficient diagnosis of malaria in non-endemic areas. Relying on our experience, the best association is: QBC** + thin blood smear and depending of results antigen detection (ParaSight F**, ICT Malaria Pf**).

Key words: Malaria - Diagnosis.

* Département de parasitologiemycologie médicale et moléculaire, Centre hospitalier universitaire, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9

Tirés à part : M.P. Brenier-Pinchart Article reçu le 6 décembre 1999, accepté le 5 janvier 2000.

Depuis longtemps, le paludisme n'est plus endémique en France métropolitaine et il ne persiste que dans certains DOM-TOM (Guyane française, Mayotte et peutêtre Guadeloupe) [1]. Cependant, plus de 5 000 cas importés sont annuellement observés dans notre pays, chez des touristes ou chez des immigrants contaminés outre-mer [2]. Le diagnostic est généralement très urgent et d'importance vitale. Le paludisme à *Plasmodium falciparum* peut en effet être mortel, en particulier chez des sujets non prémunis (ce qui est évidemment le cas de la plupart des touristes) ou lorsque le diagnostic et le traitement sont tardifs.

Pendant de nombreuses décennies (en fait, depuis la découverte des *Plasmodium* par Laveran en 1880), le diagnostic biologique de paludisme reposait sur l'examen microscopique d'étalements minces ou de gouttes épaisses préalablement colorés par la méthode de May-Grunwald-Giemsa (MGG). Ce diagnostic purement morphologique est facile chez les sujets très parasités. Il est au contraire difficile en cas de faibles parasitémies, surtout si ne sont présentes que des formes atypiques compliquant l'identification précise de l'espèce plasmodiale en cause (ce qui est essentiel d'un point de vue aussi bien pronostique que thérapeutique). En outre,

pour affirmer que l'examen au microscope est négatif, il est indispensable de poursuivre la lecture des lames pendant un temps suffisant (30 min pour un étalement mince, d'après les normes de l'OMS). Il s'agit d'une contrainte qui est, en pratique, rarement respectée.

Ces difficultés ou ces contraintes sont particulièrement importantes pour des biologistes non spécialisés, ce qui est généralement le cas en France métropolitaine. Or, depuis quelques années, sont proposées de nouvelles méthodes. Il s'agit de techniques de concentration suivies de coloration par un fluorochrome et observation en microscopie à fluorescence (Quantitative Buffy Coat ou QBC®) ou encore de la recherche d'antigènes plasmodiaux solubles (histidine rich protein II ou HRP II) ou d'une enzyme plasmodiale (lactate deshydrogénase parasitaire ou pLDH).

En nous basant sur une expérience de plusieurs années [3-5], c'est à l'évaluation comparée de trois de ces méthodes (étalement mince, QBC®, détection de HRP II par le test ParaSight®) que nous nous attacherons ici, d'un point de vue très pratique. En revanche, nous exclurons de cette étude la sérologie, la biologie moléculaire et la recherche de la pLDH. En effet, si la sérologie du paludisme est la seule technique actuellement applicable à la prévention du paludisme post-transfusionnel [6, 7] ou à certaines études épidémiologiques [8], notamment par immunofluorescence, elle ne présente pas d'intérêt diagnostique en raison de la très longue persistance des anticorps anti-Plasmodium. La biologie moléculaire peut être précieuse pour des contrôles post-thérapeutiques (distinction entre éventuelles rechutes et néocontaminations) [9], ou bien, dans l'avenir, pour la prévention du paludisme post-transfusionnel [10], mais ses applications diagnostiques pour le paludisme sont encore limitées [11-13]. Enfin, nous

n'envisagerons pas les résultats obtenus par détection des isoformes de la pLDH. Ce test, déjà disponible dans plusieurs pays étrangers pour le diagnostic de *Plasmodium falciparum* [14, 15] et bientôt pour celui des trois autres espèces plasmodiales parasites de l'homme, n'est en effet pas encore enregistré en France.

Méthodes disponibles (tableau 1)

Examens au microscope d'étalements minces ou de gouttes épaisses fixés et colorés (Giemsa) Il s'agit des techniques de référence. Le prélèvement est constitué de quelques gouttes de sang recueillies par piqûre au vaccinostyle au doigt, au lobe de l'oreille ou, chez les jeunes enfants, au talon. Les avis diffèrent sur le moment le plus favorable à ce prélèvement (avant la survenue de l'accès, ou, au contraire, au moment du pic thermique). Pour le frottis mince, une goutte de sang est étalée sur une lame porte-objet soigneusement dégraissée. Une fois séché, cet étalement est fixé au méthanol absolu, puis coloré par une solution de Giemsa. Le temps de réalisation est de 30 à 40 min, la qualité du frottis et celle de la coloration sont deux éléments essentiels pour permettre une lecture correcte au microscope. Un étalement de mauvaise qualité, non monocellulaire, est « illisible ». Un étalement mal coloré (trop clair, trop foncé ou avec des dépôts de colorants) est difficile à « lire » et peut être à l'origine de résultats erronés. L'examen se fait à l'immersion avec un objectif 100 (grossissement x 700 à x 1 000) par l'observation de 50 à 100 champs microscopiques, ce qui nécessite environ 10 min [16] (30 min avant de pouvoir affirmer la négativité) et permet la détection d'une parasitémie-seuil d'environ 150 parasites/µl [17]. Ce seuil est évidemment

Tableau 1. Caractéristiques des principales techniques utilisables en pratique pour le diagnostic biologique du paludisme

	Goutte épaisse	Frottis mince	QBC® malaria	Détection d'antigènes solubles	
				ParaSight F ®	ICT Malaria Pf®
Temps de réalisation Temps de lecture Facilité de lecture Diagnostic d'espèce Calcul de la parasitémie Équipement particulier	2 h-2 h 30 Long Difficile Oui Oui Lames et microscope optique	20-30 min Long Parfois difficile Oui Oui Lames et microscope optique	10 min Rapide Assez facile Non Non Microscope à fluorescence et objectif spécial	5-10 min Instantanée Très facile <i>P. falciparum</i> seulement Non Non	< 5 min Instantanée Très facile <i>P. falciparum</i> seulement Non
Enregistrement AFSSAPS Coût	/ Faible	/ Faible	(x 50 immersion) Oui (Becton-Dickinson) Élevé Trousse de 100 : 3 165,75 F TTC	Oui (Becton-Dickinson) Élevé Trousse de 50 : 2 250,80 F TTC	Oui (Fumouze) Élevé Trousse de 25 : 1 447,20 F TTC

fonction du nombre de champs examinés et surtout de l'expérience du microbiologiste (la parasitémie est normalement exprimée en pourcentage d'hématies parasitées). L'examen du frottis mince permet, et c'est essentiel, d'identifier la ou les espèce(s) plasmodiale(s) en cause, à partir de critères morphologiques précis.

Cette technique est de loin la plus utilisée. Pour l'ensemble des cas déclarés au Centre national de référence pour les maladies d'importation (CNRMI), plus de 95 % sont diagnostiqués par le frottis mince, seul (50 %) ou associé à la goutte épaisse (34,4 %) ou au QBC® (11,3 %). La goutte épaisse reste la technique de référence pour l'OMS. Elle permet une « concentration » des Plasmodium éventuellement présents dans l'échantillon examiné, si bien que la lecture en est normalement plus rapide et la sensibilité plus élevée (10 à 20 p/µl). Pour sa réalisation, une grosse goutte de sang est déposée sur lame puis défibrinée par un mouvement en spirale à l'aide du coin d'une autre lame ou d'une pipette. Le sang ainsi étalé sur une surface d'environ 1,5 cm² doit être séché complètement à température ambiante (ce qui peut nécessiter environ 2 heures) ou dans un four à microondes (en 2 à 3 min) [18]. Les hématies sont alors lysées par l'eau distillée ou par une solution de saponine [19] et les parasites sont colorés au Giemsa en solution aqueuse (eau tamponnée à pH 7,2) pendant 20 à 40 min. À partir de cette technique classique, diverses variantes ont été décrites avec, notamment, la concentration préalable en parasites par centrifugation ou cytocentrifugation [20]. En contrepartie d'une lecture plus rapide et d'une sensibilité plus élevée [21], la goutte épaisse est d'une lecture plus difficile, puisqu'il convient de repérer et d'identifier des Plasmodium dont les hématies-hôtes ont disparu (la parasitémie est déterminée par le nombre de Plasmodium pour 200 leucocytes). Cela nécessite une solide expérience et une longue pratique, ce qui est exceptionnellement le cas dans la plupart des laboratoires français.

Test QBC® (Quantitative Buffy Coat)

Décrite en 1983 [22], cette technique utilise un fluorochrome, l'acridine orange, qui colore les acides nucléiques, notamment des parasites sanguicoles, comme cela a été montré dès 1965 [23]. L'examen porte sur un volume de sang de 40 à 60 µl recueillis dans un tube capillaire pré-imprégné d'oxalate de potassium, d'héparine, d'EDTA et d'acridine orange. Un flotteur en polystyrène occupant environ 90 % du diamètre intérieur du tube est inséré dans le capillaire avant une centrifugation (5 min à 5 000 g dans une centrifugeuse à microhématocrites) qui permet la séparation différentielle des éléments figurés du sang,

rassemble les hématies parasitées au voisinage de la couche leucocytaire et les répartit en monocouche autour du flotteur (les gamétocytes ou les schizontes de P. ovale ou de P. vivax peuvent être retrouvés dans la couche leucocytaire ou dans la frange séparant plasma et plaquettes sanguines). Le tube capillaire est alors disposé sur un support spécial et directement examiné au microscope à fluorescence (émission UV à 350 nm à un grossissement x 500 et à l'immersion). Le contenu du capillaire est examiné sur toute sa longueur, au cours de trois rotations successives. Le noyau Plasmodium, fortement fluorescent, est coloré en vert tandis que le cytoplasme, jaune pâle, est plus ou moins visible. Sept à 10 min de préparation et 5 min de lecture sont nécessaires à ce test dont l'apprentissage est en règle rapide et facile. Cependant, diverses erreurs sont possibles, en particulier par excès, avec la confusion, par des personnes peu entraînées, entre Plasmodium et éléments non parasitaires (plaquettes, granulations leucocytaires...). Le seuil de sensibilité est apprécié de façon variable selon les auteurs: 2 Plasmodium/5 μl [24], 4 Plasmodium/µl [25] ou 130 Plasmodium/µl [26]. S'il est sensible, le test QBC® ne permet pas de déterminer la parasitémie ni l'espèce plasmodiale en cause (en dehors des rares cas où, par chance, sont présents des gamétocytes de Plasmodium falciparum, facilement identifiables par leur forme très particulière). L'impossibilité d'un diagnostic formel d'espèce est un inconvénient puisque, sur le plan pronostique, seul Plasmodium falciparum peut entraîner des complications graves, voire mortelles (neuropaludisme) avec, sur un plan thérapeutique, un risque élevé de résistances à différents antipaludiques.

Détection d'antigènes solubles

C'est en 1992 que l'OMS a déclaré prioritaire la recherche et la mise au point de techniques diagnostiques rapides, simples et peu coûteuses permettant un diagnostic et un traitement précoce du paludisme, notamment dans des dispensaires de soins primaires en zones d'endémie [27]. De nouvelles méthodes diagnostiques ont donc été développées [28] et certaines de ces techniques détectant l'HRP II, spécifique de Plasmodium falciparum, sont déjà commercialisées en France: ParaSight® (Becton Dickinson Microbiology Systems, Meylan, France) et ICT Malaria Pf® (ICT Diagnostics, Sydney, Australie, distribué par les Laboratoires Fumouze, Levallois-Perret, France). Un autre test (Optimal®, Flow Inc., Portland, Oregon, USA) basé sur la mise en évidence des isoformes des LDH plasmodiales - et par conséquent susceptible de détecter les quatre espèces de *Plasmodium* parasites de l'homme [29-30] – est commercialisé dans certains pays étrangers. Il n'est pas encore enregistré en France.

Détection d'HRP II (ParaSight ®, ICT Malaria Pf®)

L'HRP II est un antigène plasmodial glycoprotéique. Il est exprimé à la surface des hématies parasitées par Plasmodium falciparum et il est sécrété durant le cycle intra-érythrocytaire avec un pic lors de la rupture des schizontes. Seules les formes asexuées de P. falciparum expriment cette glycoprotéine [31]. Les tests permettant sa détection reposent sur le principe d'immunochromatographie. Le ParaSight® se présente sous la forme d'une bandelette de nitrocellulose sur laquelle est fixé un anticorps monoclonal IgG dirigé contre un peptide synthétique, l'AHH, dérivé de la HRP II. Ces bandelettes peuvent être conservées à la température ambiante. Le test est de réalisation facile, en 5 à 10 min, à partir de sang total prélevé par ponction capillaire ou par ponction veineuse. La positivité est affirmée par l'apparition d'une bande plus ou moins intense de précipité coloré en rose vif, chaque bandelette portant par ailleurs un témoin-contrôle positif. L'ICT Malaria Pf® se présente sous la forme d'une carte support de bandelettes-test imprégnées d'un anticorps monoclonal IgM (qui doivent être conservées à + 4 °C). Effectué à partir de sang total, il est un peu plus rapide (3 à 5 min) et encore plus simple que le ParaSight®.

Ces tests ont fait l'objet de nombreuses publications, rapportant des sensibilités et des spécificités différentes, compte tenu des patients étudiés (habitants de zones d'endémie ou voyageurs) et des techniques de référence utilisées (goutte épaisse, frottis mince et/ou PCR) [32-38]. Cela est particulièrement vrai pour le ParaSight® qui a été commercialisé en France avant l'ICT Malaria Pf®. Une méta-analyse des résultats, publiée en 1996 par l'OMS [39], estimait la sensibilité du ParaSight® supérieure à 96 % lorsque la parasitémie (évaluée sur goutte épaisse ou étalement mince) est supérieure à 100 Plasmodium falciparum (Pf)/µl. Elle est de 81,3 % pour une parasitémie comprise entre 10 et 100 Pf/µl et inférieure à 74,6 % pour une parasitémie inférieure à 10 Pf/µl. Cette étude de synthèse dégage une sensibilité globale de 87 % (avec un seuil de détection de l'ordre de 40 à 60 Pf/µl). D'une façon générale, les deux tests ParaSight® et ICT Malaria Pf® peuvent demeurer positifs plusieurs jours après un traitement antipaludique alors que tous les parasites ont été éliminés du sang et que les techniques classiques (étalement mince ou goutte épaisse) sont négatives. Avec le

ParaSight®, la persistance de cette antigénémie peut être relativement longue, dans l'ensemble supérieure à 3 jours après la disparition de la parasitémie mais peut atteindre jusqu'à 28 jours [33]. Certains faux positifs du ParaSight® peuvent être expliqués par la présence de facteurs rhumatoïdes IgM anti-IgG [40], puisque l'immunoglobuline monoclonale fixée sur la bandelette est une IgG. Ce risque d'erreur est très variable selon le contexte [37, 40]. Il est de 3 à 5 % d'après notre expérience et n'existerait pas avec ICT Malaria Pf® puisque l'immunoglobuline monoclonale utilisée est une IgM [37]. Des faux positifs ont été également observés dans le cas de syndromes inflammatoires, de phlébites ou d'hépatites virales. Par ailleurs, ce test peut être faussement négatif [33, 35], même pour les paludismes à P. falciparum. C'est toujours le cas lorsque le prélèvement contient uniquement des gamétocytes de P. falciparum (la HRP II est uniquement sécrétée par les stades asexués du parasite) ou bien lorsque l'infection est due à des espèces plasmodiales autres que P. falciparum, que ces tests ne permettent donc pas de dépister.

Commentaires

Depuis 1993, nous réalisons systématiquement le diagnostic de paludisme en associant deux techniques, le QBC® comme méthode de dépistage rapide et le frottis mince pour confirmation et détermination de l'espèce plasmodiale et de la parasitémie. Depuis plus de 3 ans, nous avons ajouté à ces deux méthodes une recherche systématique de la HRP II plasmodiale par ParaSight®. C'est donc avec un recul de plusieurs années, portant sur plusieurs centaines d'examens, que se fonde notre expérience actuelle.

Dans l'ensemble, la valeur des diverses méthodes ne peut être appréciée que par rapport à celle du frottis mince considéré comme technique de référence. Comme toutes les autres, cette technique a bien entendu elle aussi ses limites, ses pièges et ses causes d'erreur dont l'importance est d'autant plus grande que le biologiste qui « lit » les préparations n'est guère expérimenté. Les mêmes réserves s'imposent évidemment pour le test QBC®, avec cependant la notion que, dans les mains de biologistes non spécialisés, le risque d'erreurs par défaut (faux négatifs) est faible et que c'est surtout la possibilité de faux positifs qui est à craindre. À cet égard, le test QBC® constitue donc un bon moyen de diagnostic d'élimination et son emploi comme test de dépistage, en première intention, est justifié, mais l'équipement qu'il nécessite (microscope UV, microcentrifugeuse) est un investissement important, souvent prohibitif pour les laboratoires non spécialisés. D'après nos observations, il dispose, versus l'étalement mince, d'une sensibilité de 95 % (avec un seuil de détection de l'ordre de 80 à 100 Pf/µ1) et d'une spécificité d'environ 98 %. Rapide et facilement mis en œuvre, il peut constituer le premier temps très utile du diagnostic biologique de paludisme. Ses résultats doivent cependant être vérifiés et complétés (diagnostic d'espèce plasmodiale) par l'examen d'un frottis mince. Exposée à plusieurs causes d'erreurs par excès ou par défaut, la recherche d'HRP II par le ParaSight® ne doit, en aucun cas, être utilisée comme seul moyen de dépistage. Son addition aux méthodes normalement utilisées au laboratoire (QBC® et étalement mince) n'améliorait pas nos performances diagnostiques, considérées dans leur ensemble, ce qui nous a fait un moment abandonner son usage systématique. Depuis 1997, nous l'avons réintroduit dans notre pratique quotidienne, à la suite de plusieurs cas montrant sa complémentarité avec le QBC® et l'étalement mince.

Conclusion

Surtout pour des biologistes non spécialisés, la tentation est grande de substituer à l'identification microscopique des Plasmodium d'autres méthodes ne nécessitant pas une pratique personnelle particulière. Notre expérience, basée sur l'évaluation comparative de ces différents tests, confirme les risques d'erreurs (faux positifs et faux négatifs) que peut entraîner l'emploi exclusif de méthodes détectant l'antigénémie. Au contraire, ces techniques doivent être considérées comme uniquement complémentaires des autres tests. La complémentarité la plus indiscutable concerne d'abord le QBC6 et l'étalement mince, le premier test permettant un dépistage rapide mais qui doit être impérativement confirmé et précisé (diagnostic d'espèce plasmodiale) par la seconde méthode. La détection d'HRPII (ParaSight®) peut utilement compléter les deux tests précédents, en particulier pour identifier Plasmodium falciparum ou bien pour établir un diagnostic a posteriori d'un syndrome étiqueté « paludisme » et traité sans aucune confirmation biologique. En pratique, cette deuxième éventualité est malheureusement plus fréquente qu'on ne l'imagine. Chez un malade de retour d'un séjour en zone d'endémie, tout accès fébrile est trop souvent considéré comme probablement palustre et traité sans que le diagnostic soit formellement établi. Après 48 heures, l'échec du traitement fait alors évoquer l'hypothèse d'une résis-

tance aux antipaludiques. Ce n'est souvent qu'après plusieurs jours qu'une étiologie autre que palustre est finalement envisagée, avec toutes les conséquences que peut entraîner un tel retard diagnostique. C'est le type d'erreur que permet d'éviter le « test à la bandelette » s'il est pratiqué dans les deux ou trois jours suivant le traitement. Au total, ce test est donc bien un complément des autres méthodes diagnostiques, et non pas, comme sa simplicité d'emploi le laisserait espérer, un test de dépistage de première intention.

Trois observations de paludisme

Observation 1. Madame G., 28 ans, ivoirienne, présente des céphalées et une fièvre à 39 °C au retour d'un séjour d'un mois dans son pays d'origine. Elle s'automédique par la méfloquine (Lariam®) à doses curatives. L'apparition de vertiges, de vomissements et d'une importante asthénie, conduit cette malade devenue apyrétique mais très déshydratée, à consulter en urgence au CHU de Grenoble. Le frottis mince et le test QBC® sont négatifs alors que le ParaSight® est positif, ce qui est bien en faveur d'un paludisme à *Plasmodium falciparum* récemment traité et guéri. C'est ce que confirment la suite de l'observation et l'évolution clinique ultérieure après réhydratation.

Observation 2. Madame M., 23 ans, gabonaise, est arrivée en France depuis environ 1 mois. Elle présente une infection urinaire associée à une symptomatologie évoquant un accès palustre. Le QBC® est positif ainsi que le frottis mince qui montre, après un long examen au microscope, seulement deux trophozoïtes de *P. falciparum* qui sont en outre difficiles à identifier. Le test ParaSight® est négatif. Un traitement par la méfloquine (Lariam®) est instauré. Deux jours plus tard l'antigénémie (ParaSight®) se positive alors que frottis mince et QBC se sont négativés, ce qui est bien conforme à la cinétique des résultats respectifs de ces trois tests.

Observation 3. Monsieur X., centrafricain, présente à son arrivée en France, au retour d'un séjour dans son pays d'origine, une hyperthermie à 40,5 °C avec des signes d'accompagnement évoquant un paludisme. Le frottis mince est négatif, le test QBC® ne montre au total que de très rares éléments probablement plasmodiaux, mais dont l'identification précise est impossible. Le diagnostic de paludisme est donc hautement probable mais sans qu'on puisse préciser l'espèce plasmodiale en cause. C'est cette précision qu'apporte le test ParaSight® dont la forte positivité traduit sans conteste un paludisme à *P. falciparum* et justifie la mise en œuvre immédiate d'un traitement par la méfloquine (Lariam®).

Références

- 1. Poinsignon Y, Arfi C, Sarfati C, Farge-Bancel D, Raccurt C. Accès palustre au retour d'un voyage aux Antilles françaises : discussion du mode de transmission. *Méd Trop* 1999; 59 : 55-7.
- Centre national de référence pour les maladies d'importation, Institut Santé et Développement, Université Pierre-et-Marie-Curie, Bulletin n° 14, octobre 1998.
- **3.** Ambroise-Thomas P, Pinel C, Pelloux H, Picot S. Le diagnostic du paludisme : actualités et perspectives. *Cahiers Santé* 1993 ; 3 : 280-4.
- **4.** Pinel C, Faure O, Ambroise-Thomas P. Paludisme: complémentarité de deux méthodes de détection de *Plasmodium* en pratique hospitalière. *Ann Biol Clin* 1993; 51: 129-32.
- **5.** Brenier-Pinchart MP, Pinel C, Croissonnier A, *et al.* Diagnosis of malaria in non endemic country: interest of Parasight in routine clinical laboratory. *Am J Trop Med Hyg* (soumis pour publication).
- 6. Ambroise-Thomas P. Prévention of post-transfusion malaria. In: Blood transfusion and infectious diseases. Piccin Ed. Padoue, 1989: 261-74.
- 7. Décret n° 95-195 du 16 février 1995 relatif aux analyses biologiques et test de dépistage des maladies transmissibles effectués sur les prélèvements du sang et ses composants.
- Ambroise-Thomas P, Wernsdorfer W, Grab B, Bertagna P, Cullen J. Longitudinal sero epidemiological studies on malaria in Tunisia. WHO Bull 1976; 54: 355-67.
- 9. Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 35-8.
- 10. Hang VT, Be TV, Tran PN, Thanh LT, Hien LV, O'Brine E, Morris GE. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 44-7.
- 11. Tham JM, Lee SH, Tan TMC, Ting RY, Kara UAK. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria PF test in a clinical environment. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1269-73.
- 12. Postigo M, Mendoza-Leon A, Perez HA. Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: a field study in south-eastern Venezuela. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 509-11.
- **13.** Zhong HJY. Evaluation of a colorimetric PCR-based assay to diagnose *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 339-41.
- 14. Piper R, Lebras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houze S, Chiodini P, Makler M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate deshydrogenase [pLDH]. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 109-18.
- 15. Piper RC, Vander Jagt DL, Holbrook JJ, Makler M. Malaria lactate deshydrogenase: target for diagnosis and drug development. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 90: 433-7.
- **16.** Wery M. Diagnostic biologique du paludisme. *In*: Danis M, Mouchet J. *Paludisme*. Ellipses, Aupelf Ed. Paris, 1991: 111-27.
- 17. Makler CJ, Palmier C, Ager AL. A review of pratical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 203-6.
- 18. Chevalier B, Cavallo JD, Baudet JM, et al. Diagnostic rapide du paludisme: le four à micro-onde. Bull Soc Path Ex 1992; 85: 223-5.
- 19. Gleason RM. An improved method for thick film preparation using saponin as a lysing agent. Clin Lab Haem 1997; 19: 249-51.
- **20.** Petithory JC, Ardoin F, Ash LR, *et al.* Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytocentrifugation technique. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 637-42.
- **21.** Dowling MAC, Shut GT. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scarcely malaria parasitemia. *WHO Bull* 1966; 34: 249-67.

- 22. Wardlaw SC, Levine RA. Quantitative Buffy Coat analysis, a new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count. *JAMA* 1983; 5: 617-20.
- 23. Ambroise-Thomas P, Michel-Brun J, Despeignes J. Identification rapide des parasites sanguicoles par coloration à l'acridine orange et microspe à fluorescence. *Bull Soc Pathol Exot* 1965; 58: 630-9.
- 24. Moody AH, Hunt-Cooke A, Chiodini PL. Experiences avec le Becton Dickinson QBC® pour le diagnostic biologique du paludisme. Cahiers Santé 1990; 4: 289-97.
- 25. Rickman LS, Oberst R, Sangalang R, et al. Rapid diagnosis of malaria by acridin orange staining of centrifuged parasites. *Lancet* 1989; 14:68-71
- 26. Parzy D, Raphenon G, Martet G, Nicolas P, Touze JE, Baudon D, Lecamus JL. Quantitative Buffy Coat [QBC test] Monofluo kit falciparum: intérêt comparé dans le diagnostic rapide du paludisme. *Med Trop* 1990; 50: 97-102.
- 27. WHO. Ministerial conference on Malaria, Amsterdam, The Netherlands, 26-27 october, 1992. Geneva: World Health Organization, mimeographed document CTD/MEM/92.3.
- **28.** Beadle C, Long GW, Weiss WR, et al. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-II antigen with rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* 1984; 343: 564-8.
- 29. Cooke AH, Chiodini PL, Doherty T, Moody AH, Ries J, Pinder M. Comparison of a parasite lactate deshydrogenase-base immunochromatographic antigen detection assay [OptiMal®] with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 173-7.
- **30.** Palmer J, Lindo JF, Klaskals WI, et al. Evaluation of the OptiMal® test for rapide diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 203-6.
- **31.** Horward RJ, Uni S, Aikawa M, *et al.* Secretion of a malaria histidine rich protein [Pf HRPII] from *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *J Cell Biol* 1986; 103: 1269-77.
- 32. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain CA. ParaSight test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 44-8.
- 33. Cavallo JD, Hernadez E, Gerome P, Plotton N, Debord T, Le Vagueresse R. Antigénémie HRPII et paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum*: comparaison de ParaSight-F et de l'ICT Malaria Pf. *Méd Trop* 1997; 57: 353-6.
- **34.** Funk M, Schlagenhauf P, Tschopp A, Steffen R. MalaQuick® *versus* Parasight® as diagnostic aid in travellers'malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1999; 91: 268-72.
- 35. Gautret P, Rodier MH, Kauffmann-Lacroix C, Jacquemin JL. Diagnostic du paludisme: attention aux faux négatifs avec des réactifs sur bandelette. *Presse Méd* 1999; 28: 913-4.
- **36.** Laferi H, Kandel K, Pichler H. False positive dipstick test for malaria. *N Engl J Med* 1997; 337: 1635-6.
- 37. Mishra B, Samantaray JC, Kumar A, Mirdha BR. Study of false positivity of two rapid antigens detection tests for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1233.
- **38.** Jelinek T, Grobusch MP, Schwenke S, *et al.* Sensitivity and specificity of dipstick tests for rapid diagnosis of malaria in non immune travelers. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 721-3.
- **39.** WHO. A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of *falciparum* malaria. *Bull WHO* 1996; 74: 47-54.
- **40.** Bartoloni A, Strihmeyer M, Sabatinelli G, Benucci M, Serni U, Paradisi F. False positive paraSight-F test for malaria in patients with rheumatoid factor. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 33-4.