

## DIAGNOSTIC DES ACCES PALUSTRES EN ZONE D'ENDEMIE : BASES THEORIQUES ET IMPLICATIONS PRATIQUES

C. ROGIER, M-C. HENRY, A. SPIEGEL

*Med. Trop.* 2001; **61** : 27-46

**RESUME** • Quel critère utiliser pour le diagnostic des accès palustres dans les centres de santé des zones d'endémie ? Comment mettre au point un algorithme clinique pour prendre en charge les fièvres ? Comment apprécier la morbidité palustre dans le cadre de l'évaluation de la situation sanitaire d'une région ou de l'essai d'une intervention, comme la mise en place de moustiquaires imprégnées d'insecticide, d'une chimioprophylaxie ou d'un vaccin antipaludique ? Le problème de la définition de l'accès palustre est récurrent. Il est d'autant plus difficile à résoudre que le niveau de transmission et l'immunité acquise par les populations sont élevés. Dans cette revue, les bases théoriques du diagnostic des accès palustres sont présentées. Le choix d'une méthode diagnostique repose sur des connaissances physiopathologiques, épidémiologiques et cliniques. Cette méthode n'est pas unique. Elle dépend de la situation, du contexte épidémiologique, des moyens disponibles et de l'objectif. Diagnostiquer pour traiter est une chose. Diagnostiquer pour évaluer en est une autre. Le lecteur trouvera ici les notions, les références les plus récentes et l'état des connaissances nécessaires pour aborder le problème du diagnostic des accès palustres en zone d'endémie.

**MOTS-CLES** • Diagnostic - Paludisme - *Plasmodium falciparum* - Accès palustre.

### DIAGNOSIS OF MALARIA IN ENDEMIC AREAS : FUNDAMENTAL ASPECTS AND PRACTICAL IMPLICATIONS

**ABSTRACT** • What criteria can be used to diagnose malaria in health centers located in endemic areas ? Can an algorithm be developed for management of fever episodes ? What parameters should be used to assess the morbidity of malaria for public health surveys or for studies to determine the efficacy insecticide-impregnated bednets, drug prophylaxis protocols, or anti-malarial vaccinations ? Finding a useful definition for malaria attack is a perennial problem that becomes more difficult to resolve as the transmission rate and immunity level of the population increases. This review presents the fundamental aspects of diagnosing malaria. The choice of diagnostic technique requires knowledge of physiopathological, epidemiological, and clinical features. There is no single method. It depends on the circumstances, epidemiological context, available facilities, and goals. Diagnosis for treatment is one thing. Diagnosis for evaluation is another. In addition to discussing these concepts, this article provides references from the recent literature and up-to-date information needed to deal with the problem of diagnosing malaria attacks in endemic areas.

**KEY WORDS** • Diagnosis - Malaria - *Plasmodium falciparum* - Malaria attack.

Plus de 100 ans après la découverte du cycle du paludisme et de sa transmission par des anophèles (1, 2), on pourrait croire que pratiquement tout est connu sur son épidémiologie. Paradoxalement, il n'en est rien. Ce n'est que depuis quelques années que son étude s'est particulièrement focalisée sur la morbidité (3, 4). Pendant longtemps, la plupart des études ont porté sur la distribution des infections plasmodiales dans les populations. Cela était justifié à

l'époque de l'éradication, où le parasite et sa transmission étaient la cible de la lutte. Bien que le programme mondial d'éradication ait connu un indéniable succès dans beaucoup de zones d'endémie, le poids du paludisme n'a pratiquement pas changé dans les zones où sa transmission était la plus élevée, notamment en Afrique. Dans ces régions, la capacité vectorielle des espèces d'anophèles est trop élevée pour que les mesures actuelles de lutte permettent d'éradiquer le paludisme, quels que soient les moyens mis en œuvre. La prévention de la morbidité et de la mortalité sont les nouveaux objectifs des stratégies de lutte (5). Mieux comprendre l'épidémiologie de la morbidité palustre devient donc particulièrement important.

Ce n'est que très récemment que la difficulté de définir ce qui doit être considéré comme un accès clinique de paludisme a été perçue. Il n'existe pas de signe pathognomonique du paludisme. Il n'existe pas non plus de manifes-

• Travail de l'Unité de Parasitologie (C.R., Assistant du SSA) et de l'Unité de Médecine des Collectivités (A.S., Spécialiste du SSA), IMTSSA, Marseille et de l'Institut Pierre Richet (M-C.H., Professeur), Bouaké, Côte d'Ivoire.

• Correspondance : C. ROGIER, Unité de Parasitologie, IMTSSA, 13998 Marseille Armées, France • Fax : +33 (0) 4 91 15 01 64 • e-mail : christophe.rogier@wanadoo.fr •

• Article sollicité

tation clinique du paludisme sans parasitémie. Théoriquement, il est bien sûr possible que les parasites d'un malade soient tous séquestrés à un moment donné d'une infection à *Plasmodium falciparum* particulièrement synchrone (6,7) et que la parasitémie périphérique apparaisse nulle à ce moment là : ce cas est cependant extrêmement rare et ne peut durer que quelques heures. Il ne peut pas poser de problème si la méthode de détection des parasites est suffisamment sensible et si les recherches sont répétées.

La définition des accès palustres est réellement problématique dans les populations qui sont exposées à des niveaux de transmission élevés. Le portage d'infections plasmodiales asymptomatiques est alors fréquent, parfois chez plus de 90 % de la population, et la détection de cette infection ne suffit pas pour attribuer des manifestations cliniques au paludisme. La présence d'autres signes que la fièvre ou le niveau de la densité parasitaire ont été utilisés pour surmonter cette difficulté.

Le problème du choix d'une définition de l'accès palustre se pose à différents niveaux :

- l'extension et l'aggravation de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques limite l'arsenal thérapeutique à des médicaments de plus en plus chers dont certains ont des effets indésirables de plus en plus fréquents. Il devient donc urgent de réserver ces antipaludiques aux malades qui en ont réellement besoin.

- L'efficacité des traitements est évaluée chez des cas d'accès palustres et celle des régimes chimioprophylactiques est évaluée sur leur incidence. Pour pouvoir comparer les essais menés dans des populations différentes, il est nécessaire d'utiliser des définitions fiables et comparables des accès.

- Les vaccins qui visent à augmenter l'immunité antipalustre sont susceptibles de modifier la relation entre l'infection plasmodiale et la survenue de manifestations cliniques. Pour les évaluer, il peut être nécessaire d'utiliser plusieurs définitions des accès palustres, c'est à dire des définitions différentes dans les groupes vaccinés et dans les groupes sous placebo.

- Pour mieux comprendre les mécanismes immunologiques de l'acquisition d'une immunité antipalustre ou la physiopathologie des accès palustres, il est nécessaire d'avoir une définition des cas qui permette le diagnostic des accès au niveau individuel.

- Les méthodes d'évaluation de l'impact de la lutte antivectorielle, en particulier des moustiquaires imprégnées, sur la morbidité palustre ne sont pas standardisées à cause de l'absence de définition claire des accès palustres.

- Cette absence de définition claire empêche enfin l'estimation précise et fiable du poids du paludisme à l'échelle d'une structure sanitaire, d'un district, d'une région, d'un pays ou d'un continent.

En fait, il n'existe pas une définition unique des accès palustres. Les définitions peuvent varier en fonction des objectifs, des moyens disponibles, des populations et des contextes épidémiologiques. Pour être valides, elles dépendent cependant de la relation entre les infections plasmodiales et les manifestations cliniques. Tels sont les

thèmes abordés dans cette revue des méthodes de diagnostic des accès palustres dans les populations vivant en zone d'endémie.

---

#### RELATION ENTRE LA PARASITEMIE ET LES MANIFESTATIONS CLINIQUES

---

La relation entre la parasitémie et les manifestations cliniques du paludisme a été peu étudiée. Pour essayer de comprendre comment se développent les infections plasmodiales chez les personnes exposées fréquemment à des piqûres infectantes, il est d'abord nécessaire de connaître l'histoire naturelle de ces infections chez les personnes exposées ponctuellement.

#### **La malariathérapie : des observations expérimentales précieuses.**

Que se passe-t-il lorsqu'une personne non immune est infectée pour la première fois, puis à d'autres reprises par un *Plasmodium* humain ? La malariathérapie a été une source de données précieuse. Elle consistait à infecter volontairement des malades par une espèce plasmodiale humaine, y compris *Plasmodium falciparum*, en vue de provoquer des accès de fièvre et une parasitémie continue. Elle a fait partie du traitement de la neurosyphilis de 1917 à la fin des années 1960, même après l'avènement de la pénicilline (8). Les malades traités ainsi devaient n'avoir jamais été impaludés auparavant. Lorsque l'évolution clinique ou parasitologique le nécessitait, la parasitémie était contrôlée par de petites doses d'antipaludiques (325 à 650 mg de sulfate de quinine) sans chercher à obtenir la guérison parasitologique. Ces infections étaient induites par l'inoculation de sang de porteurs de formes asexuées des *Plasmodii*, mais aussi par les piqûres d'anophèles infectés.

Collins et Jeffery ont présenté les observations effectuées aux Etats-Unis dans le *South Carolina State Hospital*, à Columbia en Caroline du Sud, et dans le *Georgia State Hospital*, à Milledgeville en Georgie, de 1940 à 1963 (9-12). La durée de la période pré-patente, c'est à dire entre les piqûres d'anophèles infectantes et la détection d'une parasitémie sanguine, était en moyenne de 11 jours (9), comprise entre 7 et 14 jours dans 91 % (99/109) des cas et avait des valeurs extrêmes de 7 et 28 jours. Elle n'était modifiée ni par l'augmentation de l'inoculum, ni par le nombre d'infections plasmodiales antérieures (10,11). Les pics de fièvre et de parasitémie élevée étaient le plus souvent associés. Les jours avec fièvre, en moyenne 10 à 12 jours, ou avec hyperparasitémie ( $\geq 10\ 000/\mu\text{L}$ ), en moyenne 6 à 11 jours, étaient concentrés au cours des 25 premiers jours de patence dans près des trois-quarts des cas. Une hyperthermie ou une parasitémie élevée pouvaient rarement être observées respectivement plus de 100 et 75 jours après l'infection. En fait, de nombreux patients supportaient rapidement une densité supérieure à 1 000 parasites/ $\mu\text{L}$  et une fièvre modérée intermittente pendant de longues périodes. L'immunité contre l'infection à *Plasmodium falciparum* se développait donc

rapidement, au cours des 2 à 3 premières semaines de parasitémie sanguine. Il en était de même pour les autres espèces plasmodiales.

Les souches plasmodiales pouvaient avoir des aptitudes à provoquer des hyperthermies ou des parasitémies élevées sensiblement différentes. Il existait aussi des différences interindividuelles de susceptibilité à l'infection (nombre de pics de parasitémie élevée, durée de l'infection par des formes asexuées) ou aux manifestations cliniques. De nombreux patients étaient capables de contrôler leur parasitémie sans nécessiter de traitement antipaludique. Lorsque la parasitémie ou les manifestations cliniques devaient être contrôlés par un traitement antipaludique, les doses utilisées étaient souvent faibles.

Après une première infection par *Plasmodium falciparum*, une infection secondaire par une souche homologue ou hétérologue de *Plasmodium falciparum* (10) était accompagnée d'une réduction du nombre de jours de fièvre (>38,3°C : 6,7 jours en moyenne) et du nombre d'épisodes de parasitémie élevée ( $\geq 10\ 000/\mu\text{L}$  : 2,0 jours). Ainsi, l'infection par une souche de *Plasmodium falciparum* conférait un certain niveau d'immunité contre des souches de *Plasmodium falciparum* tant homologues qu'hétérologues. L'infection secondaire était cependant le plus souvent accompagnée d'au moins un épisode de fièvre, quel qu'ait été la durée de l'infection primaire. De plus, des patients qui avaient atteint un certain équilibre avec une souche donnée de *Plasmodium falciparum* se manifestant par une parasitémie chronique, faible et asymptomatique, avaient de nouveaux épisodes de fièvre et de densité parasitaire élevée après une surinfection par une nouvelle souche de *Plasmodium falciparum*.

Au cours des infections par *Plasmodium falciparum*, la densité parasitaire évoluait avec des recrudescences régulières espacées d'intervalles de 17 à 18 jours (12). Cette régularité existait quelles qu'aient pu être d'éventuelles infections précédentes par des souches homologues ou hétérologues de *Plasmodium falciparum* ou d'autres *Plasmodii*. Elle suggère qu'il existe un contrôle temporel de l'apparition de variants dominants dans la population parasitaire constituée par une souche donnée de *Plasmodium falciparum*. Le niveau moyen de densité parasitaire atteint décroissait au cours des recrudescences successives. Ainsi, du premier au sixième pic, la moyenne géométrique des densités parasitaires atteintes était respectivement 40 350, 6 975, 5 090, 3 820, 3 455 et 2 375/ $\mu\text{L}$ . Cette décroissance suggère l'augmentation d'une immunité qui réduit les populations de variants parasitaires ultérieurs sans les éliminer. Une infection chronique par *Plasmodium falciparum* serait donc caractérisée par une succession de pics qui surviennent à intervalle constant, approximativement toutes les 3 semaines, et qui diminuent en amplitude au point de devenir difficilement détectables après 5 recrudescences.

Les infections expérimentales de personnes non-immunes viennent d'être décrites. Qu'en est-il des infections naturelles des personnes vivant en zone d'endémie ?

### Les études longitudinales des relations parasitocliniques en conditions naturelles.

Dans les zones où la transmission est intense, la survenue d'accès de fièvre dus au paludisme a été associée depuis longtemps à une augmentation brutale de la densité parasitaire. Les premières études de l'association entre l'augmentation de la densité parasitaire et la survenue de manifestations cliniques ont été longitudinales.

De mai 1931 à août 1934, W.C. Earle a suivi cliniquement et parasitologiquement, de façon hebdomadaire, 76 enfants âgés de 5 à 15 ans d'un village de Puerto Rico où le paludisme à *Plasmodium falciparum* était mésoendémique (13). Il a mis en évidence une séquence d'événements parasitologiques associés à la survenue de fièvre : période de parasitémie nulle ou de densité parasitaire basse, augmentation brutale de la densité parasitaire, dépassement d'un seuil de densité parasitaire à 12 000/ $\mu\text{L}$ , survenue de la fièvre. Il avait également observé qu'après son augmentation brutale, la densité parasitaire pouvait rester élevée quelques semaines alors que la fièvre disparaissait au bout de quelques jours, approximativement une semaine. Après 8 à 10 semaines, les densités parasitaires diminuaient et la fréquence des gouttes épaisses négatives augmentait. Sur les 76 enfants, 52 (68 %) ont eu au moins une fois cette série d'événements. Sur les 182 épisodes de fièvre observés, 142 (78 %) succédaient à une augmentation brutale de la parasitémie.

En 1958, dans une région hyperendémique du Liberia, M.J. Miller avait aussi utilisé la notion de seuil de densité parasitaire associé à la survenue des accès cliniques chez 20 adultes (20-30 ans) suivis cliniquement et parasitologiquement tous les deux jours pendant un an et chez 10 enfants (3-7 ans) suivis de la même manière pendant 71 jours (14). La parasitémie moyenne asymptomatique à *Plasmodium falciparum* était de 56/ $\mu\text{L}$  chez les adultes et de 2 230/ $\mu\text{L}$  chez les enfants. Le niveau moyen de parasitémie initiant les accès chez les adultes et chez les enfants était respectivement de 1 644/ $\mu\text{L}$  (30 accès, extrêmes : 30-4 550) et de 18 337/ $\mu\text{L}$  (9 accès, 11 510-37 210) pour *Plasmodium falciparum* et de 79/ $\mu\text{L}$  (2 accès, 22-136) et 3 172/ $\mu\text{L}$  (5 accès, 1 650-5 935) pour *Plasmodium malariae*.

Plus de trente ans après, en 1990, de nouvelles études longitudinales de la relation entre la densité parasitaire et les manifestations cliniques du paludisme ont été lancées au Sénégal par l'Institut Pasteur et l'Institut de Recherches en Développement (ex-ORSTOM) (15). Elles entraient dans le cadre d'un programme de mise au point de vaccins antipaludiques. La mesure de l'immunité clinique et la recherche des mécanismes de son acquisition passaient par la définition de critères permettant le diagnostic individuel des accès palustres. Ces études ont été menées à Dielmo, un village de 250 à 300 habitants où le paludisme est holoendémique et où la transmission de *Plasmodium falciparum* est pérenne avec environ 20 piqûres infectantes par personnes et par an (16), et à Ndiop, un village de 300 à 350 habitants où le paludisme est mésoendémique et la transmission strictement saisonnière avec environ 20 piqûres infectantes par personne et par an (17). L'ensemble des populations est soumis respectivement depuis 1990 et 1993 à une surveillance clinique quotidienne



(15,18,19). Une station de recherche avec dispensaire a été construite dans chaque village et une équipe médicale est présente jour et nuit, toute l'année. L'étroitesse du suivi clinique et parasitologique a permis d'étudier très précisément la nature de la relation entre la densité parasitaire et le risque de fièvre (20). Les observations parasito-cliniques quotidiennes sont similaires à celles qui avaient été faites par Earle et Miller. La figure 1 montre les variations de la parasitémie, de la température corporelle et de l'incidence des manifestations cliniques chez un enfant de Dielmo pendant 4 mois. De telles données sont disponibles pour plusieurs centaines de personnes, enfants et adultes. Elles confirment que les manifestations cliniques du paludisme sont associées à une augmentation brutale de la parasitémie et que les pics de parasitémie élevée sont pratiquement toujours associés à une hyperthermie ou à des manifestations cliniques évocatrices de fièvre (20). Chez les nourrissons de Dielmo, la première détection d'une parasitémie à *Plasmodium falciparum*, parfois relativement peu élevée, est généralement associée à des manifestations cliniques. Par la suite, toutes les nouvelles infections patentes ne provoquent pas systématiquement des épisodes fébriles et les densités parasitaires au cours des accès palustres deviennent plus élevées. Cela a été observé également dans d'autres études (21-24). Au cours des accès palustres, les densités parasitaires sont plus élevées chez les jeunes enfants que chez les enfants plus âgés ou les adultes qui ont une tolérance moindre aux charges parasitaires élevées (20). Des observations faites en Papouasie-Nouvelle Guinée (25), dans des conditions d'endémicité comparable, vont dans le même sens. Des variations de la relation entre la densité parasitaire et le risque de fièvre en fonction de l'âge ont également été trouvées en zone de faible endémie. Dans une région rurale hypoendémique du Pakistan (< 1 piqure infectante par personne par an), le risque de fièvre pour une densité parasitaire à *Plasmodium falciparum* donnée augmentait avec l'âge (26).

L'étude de la relation entre la parasitémie et la fièvre chez les individus vivant en zone d'endémie élevée nécessite une surveillance très étroite, de préférence quotidienne, et des

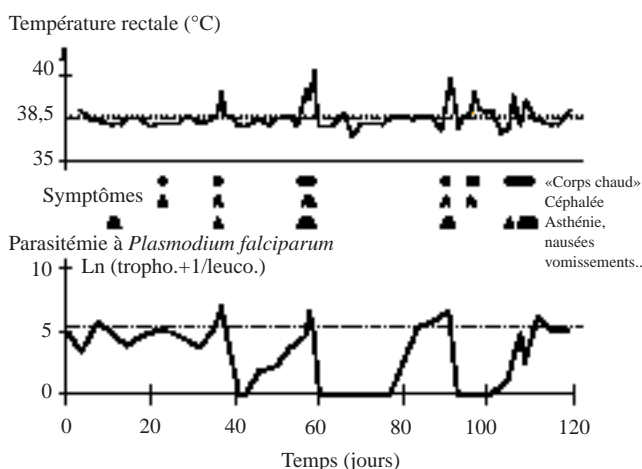


Figure 1 - Evolution de la parasitémie à *Plasmodium falciparum*, des manifestations cliniques et de la température corporelle d'un enfant de 4 ans, du 29/05/1990 au 30/09/1990, Dielmo, Sénégal.

effectifs importants, particulièrement chez les adultes. Les pics parasitologiques et les épisodes pathologiques dus au paludisme peuvent être rares et de courte durée. Sous traitement antipaludique, à Dielmo, la fièvre dure en moyenne 15 heures chez les 0-1 an, 14 heures chez les 2-5 ans et 11 heures chez les 6-9 ans (27). Sous traitement symptomatique, elle dure le plus souvent moins de 20 heures chez les adultes. Les études reposant sur un suivi quotidien sont plus puissantes que celles reposant sur un suivi hebdomadaire (4,28) qui sont elles-même plus puissantes que celles reposant sur un suivi mensuel (4,29). Ce défaut de puissance est encore plus marqué dans les études impliquant des effectifs réduits ou des adultes. Il n'est donc pas surprenant que de telles études ne permettent pas d'étudier précisément la relation entre la densité parasitaire et la fièvre ou de mettre clairement en évidence un effet seuil pyrogène (7,30).

### Plus loin dans la connaissance de la physiopathologie des accès palustres.

Le génotypage de *Plasmodium falciparum* effectué par PCR et par étude du polymorphisme de taille pour trois loci génétiquement distincts (MSA1/MSP1, MSA2/MSP2 et TRAP) ont montré que les accès palustres successifs des enfants de Dielmo sont dus à des populations parasitaires génétiquement distinctes qui semblent avoir été inoculées récemment et qui se multiplient initialement apparemment sans restriction (31). Le fait que les génotypes parasitaires détectés au cours des accès palustres soient généralement absents des prélèvements effectués au cours des jours ou semaines précédents est cohérent avec la quasi absence d'incidence d'accès palustre pendant la saison sèche chez les personnes qui sont infectées, mais qui ne sont pas exposés à la transmission. Par ailleurs, les populations parasitaires récemment détectées dans le sang ne provoquent pas toutes des accès palustres. Un grand nombre de ces populations parasitaires semble être contrôlé naturellement. Les infections sont généralement moins complexes au cours des épisodes cliniques que pendant les périodes asymptomatiques. Cela suggère qu'une population parasitaire dominante est responsable des manifestations cliniques au cours des accès palustres.

Il est actuellement admis que la rupture des schizontes provoque la fièvre par la libération de toxines non protéiques qui stimulent les macrophages, des lymphocytes et la production de *tumor necrosis factor* (TNF) (32-38). Les toxines qui ont pu être caractérisées sont des molécules non protéiques capables d'induire la production d'anticorps neutralisants. La réponse contre ces antigènes ne dépend pas des lymphocytes T. Des stimulations fréquentes sont nécessaires pour maintenir ces anticorps à un niveau élevé (39-43). La quantité maximale de toxine pouvant être contrôlée, c'est-à-dire le niveau de densité parasitaire provoquant une hyperthermie, dépendrait du titre de ces anticorps. Chez les personnes non immunes, ce titre est nul et des manifestations cliniques apparaissent avec des parasitémies faibles. Chez les personnes supportant des parasitémies élevées, comme les enfants vivant dans les zones de forte endémie, la stimulation antigénique par les toxines et le titre d'anticorps seraient

élevés en permanence. Chez les adultes, l'immunité antiparasitaire aboutit à une diminution des densités parasitaires et, par conséquent, à une diminution de la libération des toxines et du titre des anticorps. Les variations de la quantité de toxines libérées et de la synthèse des anticorps neutralisants pourraient expliquer les variations des niveaux de densité parasitaire responsables des manifestations cliniques.

Nous avons vu que la survenue d'accès palustres est généralement associée à une augmentation brutale de la densité parasitaire à cause de la multiplication incontrôlée d'une population plasmodiale récemment inoculée. Comment ce phénomène a-t-il été pris en compte pour le diagnostic des accès palustres ?

#### LA DENSITÉ PARASITAIRE, CRITÈRE DIAGNOSTIQUE DES ACCÈS PALUSTRES

Les observations faites chez les malades consultant pour fièvre dans des structures sanitaires ont souvent montré une relation continue entre le niveau de la densité parasitaire et le niveau de la température corporelle, tant dans des conditions de transmission faible (44) que forte (45, 46). Nous venons de voir cependant que le suivi clinique et parasitologique de personnes infectées suggère plutôt que la survenue des épisodes cliniques et de la fièvre est associée à une augmentation brutale de la densité parasitaire, c'est-à-dire que la relation entre la parasitémie et la température corporelle est discontinue. Le fait que cette relation soit continue ou discontinue, c'est-à-dire qu'il existe un effet seuil pyrogène de la parasitémie, est important pour plusieurs raisons. Du point de vue de la physiopathologie du paludisme, il est important de savoir si la survenue des manifestations cliniques est liée à un accident parasitologique ou immunologique (phénomène discontinu) ou à une incapacité progressive de l'organisme à contrôler la parasitémie ou à réguler sa réponse immunitaire (phénomène continu). L'existence d'un effet seuil pathogène, c'est-à-dire d'un phénomène discontinu, permettrait une définition sans équivoque des accès palustres et leur diagnostic au niveau individuel. Si le phénomène est continu, la distinction entre les parasitémies responsables des manifestations cliniques et celles qui ne le sont pas est plus arbitraire.

#### Démonstration d'un effet seuil pyrogène de la parasitémie.

Dans la littérature, un seul travail a porté sur la nature continue ou discontinue de la relation entre la parasitémie et le risque de fièvre (20). Les données parasitologiques et cliniques recueillies au cours des quatre premiers mois de suivi de la population de Dielmo (juin à septembre 1990) ont été utilisées pour cette étude. Pendant cette période et chez tous les habitants du village, des gouttes épaisses systématiques d'une part, un recueil de données cliniques (dont la température corporelle) d'autre part, étaient effectués respectivement deux et trois fois par semaine. A l'occasion des épisodes pathologiques, des gouttes épaisses et un recueil de données cliniques supplémentaires étaient réalisés. La figure 1 montre

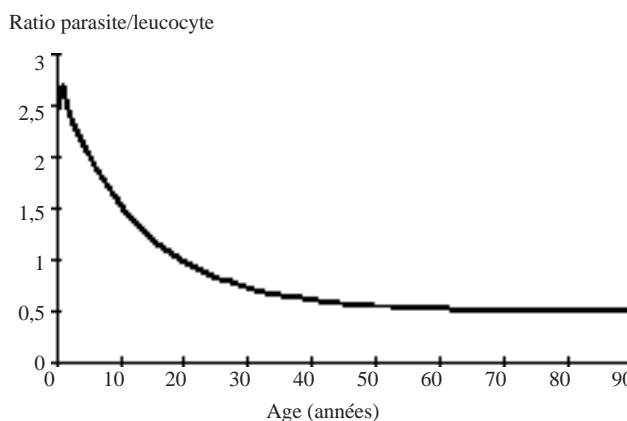


Figure 2 - Niveau du seuil pyrogène (*Plasmodium falciparum*) en fonction de l'âge, Dielmo, Sénégal, 200 piqûres infectées par personne et par an.

l'évolution clinique et parasitologique d'un enfant pendant cette période.

Le risque individuel d'hyperthermie a été modélisé en fonction de la densité parasitaire de *Plasmodium falciparum* et de l'âge par régression logistique à effet aléatoire pour tenir compte de la multiplicité des observations chez chaque individu. D'autres facteurs comme le sexe, le type d'hémoglobine, le niveau de transmission ou la prise d'antipaludiques étaient contrôlés.

L'analyse a montré que le risque de fièvre augmentait avec la densité parasitaire et, à densité parasitaire égale, augmentait avec l'âge. En d'autres termes, les densités parasitaires associées avec l'hyperthermie étaient plus basses chez les adultes que chez les enfants. Par ailleurs, la relation entre densité parasitaire et risque de fièvre n'était pas décrite de façon satisfaisante par des fonctions continues. En particulier, la fonction linéaire ou quadratique de la parasitémie, la fonction linéaire du logarithme de la parasitémie et la fonction puissance  $r^{\text{ième}}$  ( $r$  variant 0,01 à 0,99) de la parasitémie ont été testées. La fonction continue qui permettait le mieux de décrire les données était la fonction puissance 0,82ième de la parasitémie, fonction très proche de celles qui avaient été retenues dans les travaux de Tom Smith menés en zones d'hyperendémie palustre (23,46,47). Dans ces travaux, l'hypothèse de discontinuité de la relation entre la parasitémie et le risque d'hyperthermie n'était pas testée.

L'existence d'un effet seuil de la densité parasitaire sur le risque de fièvre a ainsi été démontrée ( $p < 10^{-6}$ ). Le risque d'hyperthermie d'un individu était multiplié par 44 ( $IC_{95} : 13,6-144,8$ ) lorsque sa densité parasitaire dépassait un niveau dépendant de son âge (Fig. 2). Le niveau de ce seuil a été estimé à 2,45 parasites/leucocytes (29 400/ $\mu$ L) chez les nourrissons, à 2,7 parasites/leucocytes (32 400/ $\mu$ L) chez les enfants âgés de un an et a été estimé par la fonction suivante chez les enfants plus âgés et chez les adultes :  $f(\text{âge}) = (\exp[5,4161 \times (1-\text{âge}/70)] + 50)/100$  (âge exprimé en années et densité parasitaire en parasites/leucocytes) (Fig. 2). En utilisant les leucocytémies moyennes mesurées à Dielmo dans chaque classe d'âge, le niveau du seuil exprimé en parasites

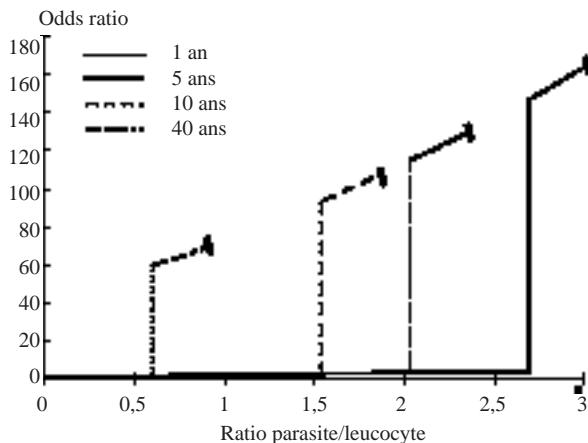


Figure 3 - Odds ratio individuels de fièvre en fonction de la parasitémie à *Plasmodium falciparum* et de l'âge, Dielmo, Sénégal, 200 piqûres infectées par personne et par an.

par microlitres est de 23 250 à 2 ans, 17 100 à 5 ans, 13 760 à 7 ans, 10 010 à 10 ans, 7 800 à 15 ans, 6 370 à 20 ans, 4 680 à 30 ans et 3 380 à 60 ans. Un résultat similaire a été obtenu en définissant la fièvre par l'existence d'un syndrome fébrile sans nécessairement une hyperthermie enregistrée, par une hyperthermie supérieure ou égale à 37,7°C ou supérieure ou égale à 38°C.

L'absence d'effet modificateur des mois de suivi (juin, 9 piqûres infectées/homme/mois, PIHM; juillet, 30 PIHM; août, 13 PIHM; septembre, 28 PIHM) suggère que l'effet seuil est équivalent quel que soit le niveau de transmission dans ce village.

L'absence d'effet individu significatif montre enfin que les différences de niveau du seuil entre individus sont suffisamment faibles pour permettre son utilisation dans l'ensemble de la population de Dielmo.

L'observation d'un effet seuil aussi net (Fig. 3) était inattendue dans la mesure où des variations de la susceptibilité des personnes et de la virulence des souches de *Plasmodium falciparum* d'une part, et des fluctuations aléatoires de la parasitémie (7,48) et de la leucocytémie d'autre part pouvaient altérer la signification de l'effet seuil. Ces facteurs tendent à introduire un «bruit» dans la définition du seuil pyrogène et devraient théoriquement lisser l'augmentation du risque de fièvre avec la parasitémie. Une série de fonctions permettant une augmentation progressive de ce risque a été testée. Aucune de ces fonctions ne permet de décrire mieux les données que l'effet seuil décrit précédemment.

Parmi les 8 636 observations simultanées de la parasitémie et de l'état clinique faites chez les 247 habitants de Dielmo pendant les quatre mois de suivi, seulement 0,4 % (36/8 636) avaient une densité parasitaire supérieure au seuil tout en étant en période asymptomatique, c'est-à-dire qu'aucune manifestation clinique évocatrice du paludisme n'avait été enregistrée au cours des 3 jours précédant et suivant la réalisation de la goutte épaisse. Parmi ces 36 observations, 20 ont été faites dans un groupe de personnes qui ont quitté l'étude en octobre 1990 et qui ont été suspectées de ne pas déclarer tous leurs symptômes.

La démonstration de l'existence d'un effet seuil pyrogène de la parasitémie et la détermination du niveau de ce seuil en fonction de l'âge ont permis d'attribuer sans ambiguïté les épisodes pathologiques observés à Dielmo au paludisme. Dans cette population relativement homogène quant à son exposition à la transmission, un accès palustre est défini par des manifestations cliniques (pas seulement une hyperthermie) associées à une densité parasitaire supérieure au seuil correspondant à l'âge du malade. Cette définition a été utilisée tant pour la recherche clinique que pour l'étude de l'acquisition de l'immunité antipalustre (15, 27, 28, 49-54). Depuis plus de 10 ans, un seuil est aussi utilisé en routine à Dielmo pour le diagnostic individuel et le traitement des accès palustres (18, 54).

Même s'il est probable que dans des populations exposées à une transmission comparable à celle de Dielmo, la relation entre la parasitémie et les manifestations cliniques soit similaire, le seuil que nous avons identifié n'est pas directement utilisable dans les structures sanitaires. En effet, rien ne permet d'assurer que l'exposition à la transmission et que l'immunité acquise par les patients consultant dans ces structures soient identiques et aussi homogènes que celles observées à Dielmo. A titre d'exemple, les patients du dispensaire de Toubakouta qui est la structure de référence de Dielmo, viennent de villages où les niveaux annuels de transmission varient d'une ou moins d'une piqûre infectante par an sur certaines îles du Saloum à plusieurs centaines de piqûres infectées par an. L'acquisition d'une immunité antipalustre et les relations parasito-cliniques diffèrent selon ces conditions de transmission. La méthode d'identification du seuil que nous avons utilisée ne peut être appliquée qu'à des populations homogènes et est réservée, en pratique, à la recherche (21).

### Arguments contre l'utilisation de la parasitémie pour le diagnostic.

L'observation occasionnelle de densités parasitaires très élevées en l'absence de symptôme et la variabilité de la parasitémie ont souvent été des arguments contre l'utilisation de la densité parasitaire pour le diagnostic des accès palustres (7, 55, 56).

Par un suivi clinique quotidien de 9 jours d'enfants (1-12 ans) d'un village du Mali où la transmission est strictement saisonnière, Bouvier a montré que ceux qui avaient une parasitémie à *Plasmodium falciparum* élevée ( $\geq 15\ 000/\mu\text{L}$ ) et qui avaient une température corporelle inférieure à 38°C au jour 0 avaient, pendant la saison des pluies, un risque de développer une fièvre multiplié par 3,25 par rapport à ceux chez qui aucune infection n'avait été trouvée (56). L'augmentation du risque était brutale à partir de 15 000 parasites par microlitre. Prenant comme argument que seulement 20 % des enfants avec une parasitémie supérieure à 15 000/ $\mu\text{L}$  avaient développé une hyperthermie au cours des 9 jours suivants, il rejetait l'hypothèse que les enfants fortement parasités développent généralement une fièvre. L'absence de prise en compte des signes cliniques de fièvre autres que l'hyperthermie (par exemple sensation de corps chaud, frissons, sueurs), pendant et surtout avant le suivi, limitent terriblement la portée de cette étude. Par ailleurs, la



persistance de parasitémiées élevées et asymptomatiques pendant des jours et des semaines après un accès palustre pas ou peu traité est connue depuis les expériences de malariathérapie (12) et les premières observations longitudinales des infections naturelles (13).

La grande variabilité de la densité parasitaire chez un même individu a aussi été un argument pour limiter son utilisation. Dans une étude longitudinale (12 ou 13 jours, trois examens par jour de la température et de la parasitémie) menée chez des adultes (38 pendant la saison sèche et 41 pendant la saison des pluies) du même village malien que précédemment, Delley a montré que des variations d'un facteur 100 à 1 000 de la densité parasitaire, en l'espace de quelques heures, n'étaient pas rares. Comme cela est souligné par l'auteur, de telles variations ne peuvent être expliquées que par la séquestration et le synchronisme des populations parasitaires (6). Dans ce petit échantillon, le risque de fièvre était augmenté chez ceux qui avaient une parasitémie élevée, particulièrement lorsqu'elle dépassait 10 000 parasites par microlitre. Pour l'auteur, la grande variabilité de la parasitémie limite cependant son emploi pour le diagnostic. Ces adultes étaient probablement sensiblement moins immuns que les adultes et les enfants les plus âgés de Dielmo. Par ailleurs, leurs infections étaient probablement pauci-clonales, différant ainsi des infections polyclonales rencontrées chez les enfants qui sont exposés à une transmission plus élevée et plus régulière. Les variations de la densité parasitaire périphérique résultant d'infections polyclonales et asynchrones sont nécessairement moins marquées que celles présentées par Delley, même si les variations de la densité parasitaire de chaque clone synchrone sont aussi importantes. Cette variabilité pourrait gêner la mise en évidence d'un éventuel effet seuil pyrogène dans des zones où la transmission est modérée ou faible. Elle n'a pas empêché la démonstration de son existence à Dielmo où le niveau de transmission de *Plasmodium falciparum* et de l'immunité antipaludique acquise sont élevés (20).

### Utilisation de la parasitémie pour le diagnostic des accès palustres : un seuil diagnostique.

L'approche qui a été utilisée à Dielmo a permis de démontrer l'existence de l'effet seuil pyrogène de la densité parasitaire et d'estimer la variation du niveau de ce seuil avec l'âge. Ces niveaux sont compatibles avec ceux qui avaient été trouvés avec des méthodes différentes dans des contextes épidémiologiques proches. Notre méthode a été utilisée ailleurs, dans un contexte épidémiologique très différent, en zone d'hypoendémie et dans une étude limitée aux enfants de moins de deux ans (21). Les niveaux des seuils identifiés par notre méthode étaient très similaires à ceux déterminés par la méthode de la fraction attribuable. Cela faisait conclure par McGuinness que les différences de niveau de seuil trouvées entre études représentaient vraisemblablement des différences de susceptibilité au paludisme entre populations plutôt que des différences de méthodologie statistique.

Les autres méthodes qui ont été utilisées pour déterminer un seuil de densité parasitaire permettant de faire le diagnostic des accès palustres ont été les suivantes :

- De nombreux auteurs ont comparé les parasitémiées de malades fébriles (cas) aux parasitémiées de personnes asymptomatiques ou consultant pour un motif autre que la fièvre (témoins) (26, 55, 57-62). D'autres auteurs ont comparé chez des personnes les parasitémiées observées en période de fièvre à celles observées chez les mêmes personnes en période asymptomatique (20, 21, 29, 30, 46, 63). Il s'agissait d'études longitudinales dont l'analyse était de type cas-témoin. Pour plusieurs auteurs, les parasitémiées supérieures à certains seuils étaient plus fréquentes chez les cas que chez les témoins (21, 25, 26, 57-62). Ces auteurs utilisaient la notion de seuil diagnostique, mais aucun n'avait cependant démontré l'existence d'un effet seuil pyrogène *stricto sensu*. Le critère de choix du seuil diagnostique variait selon les études. Il a reposé sur la comparaison des fréquences de classes de densité parasitaire chez des individus fébriles et non fébriles (57, 59, 60, 64-67). Le seuil choisi correspondait à une borne de la classe de densités parasitaires dont la fréquence chez les cas égalait ou dépassait sa fréquence chez les témoins (57, 59) ou au niveau de densité parasitaire à partir duquel le risque de fièvre augmentait significativement (58, 61, 64, 67). Richard a utilisé la valeur d'un test d'association (khi-2) entre la densité parasitaire (inférieure ou pas au seuil) (60) et le statut clinique (fébrile ou apyrétique) pour choisir le niveau du seuil qui permettait d'obtenir la différence la plus significative entre la fréquence des parasitémiées élevées des cas et celle des témoins.

- Dans certaines études, la méthode de la fraction attribuable a servi de méthode de référence pour le choix du seuil (21, 46, 62). Le seuil retenu était celui qui permettait d'obtenir le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité (21,46) ou qui permettait le mieux d'approcher l'estimation de l'incidence des accès palustres obtenue par la méthode de la fraction attribuable (62). Des variations du niveau des seuils diagnostiques en fonction de l'âge étaient montrées par certains auteurs (21, 25, 59, 60, 62) ou évoquées par d'autres (57, 58, 68). Les niveaux des seuils diagnostiques proposés sont présentés dans le tableau I. Il est généralement admis que ces seuils permettent d'estimer l'incidence des accès palustres dans une population, mais il a rarement été proposé de les utiliser pour le diagnostic au niveau individuel et pour l'indication d'un traitement antipaludique (18, 57).

Les protocoles utilisés pour identifier les seuils diagnostiques posent des problèmes méthodologiques. Les cas, en général des patients fébriles, et les témoins sont le plus souvent recrutés dans une structure sanitaire. Le délai entre le début des symptômes et l'admission dans ces structures, l'intensité des manifestations cliniques, la fréquence et le type de traitement préalable, l'accessibilité de la structure sanitaire, la perception de la gravité de la maladie et du besoin de soins pouvaient varier entre les cas et les témoins et d'une étude à l'autre, introduisant ainsi des biais et donc des différences entre les résultats. Dans ce genre de comparaison, le choix des témoins est particulièrement problématique. On pourrait croire que l'idéal serait de prendre chaque individu comme son propre témoin, mais cela nécessite généralement d'avoir accès à des observations parasitologiques longitudinales en dehors de la structure

Tableau I - Niveaux de seuils de parasitémiés à *Plasmodium falciparum* pour le diagnostic des accès palustres.

Pays (lieu)	Endémie	Population d'étude	Age	Seuil de densité parasitaire	Réf.
Pakistan (4 villages, Punjab)	Hypoendémie ( $< 1$ PIHan)	Cas : consultant fébrile Témoin : consultant non fébrile	Enfants & adultes	$< 1\ 000/\mu\text{L}$	26
Burkina Faso (Bobo-Dioulasso)	Hypo-mésioendémique (0,14 à 4,6 PIHan)	Cas : consultant fébrile (Tr ou To $\geq 38^\circ\text{C}$ ) Témoin : consultant apyrétique	$< 15$ ans Adultes	15 000/ $\mu\text{L}$ 500/ $\mu\text{L}$	64
Ghana (Prampram)	Hypo-mésioendémique (8,5 PIHan)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ) (pris comme leurs propres témoins) Témoin : population asymptomatique	$< 12$ mois 12-23 mois	100/ $\mu\text{L}$ 3 500/ $\mu\text{L}$	21
		Cas : population et consultant fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ) ou histoire de fièvre Témoin : idem précédemment	$< 12$ mois 12-23 mois	100/ $\mu\text{L}$ 1 700/ $\mu\text{L}$	
Bénin (Villages de la côte)	Mésioendémique (IP 41)	Cas : population fébrile (Tr $\geq 38^\circ\text{C}$ ) Témoin : population asymptomatique	$< 3$ ans	1 000/ $\mu\text{L}$	61
Gambie (Villages de la zone de Farafenni)	Mésioendémique (IP 26 à 34)	Saison des pluies : Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ) Témoin : population asymptomatique	$< 7$ ans	5 000/ $\mu\text{L}$ (pas proposé comme seuil)	29
Papouasie- Nouvelle Guinée (Wosera, 10 villages)	Mésio-hyperendémique (IP 49 à 70)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ) ou histoire de fièvre Témoin : population asymptomatique	$< 5$ ans 5-19 ans $\geq 20$ ans	1 000/ $\mu\text{L}$ 10 000/ $\mu\text{L}$ 1 000/ $\mu\text{L}$	62
Côte d'Ivoire (région de Korhogo)	Hyperendémique (130 PIHan, IP $\geq 70$ nourrissons)	Cas : population fébrile Témoin : population asymptomatique	0-4 ans 7-9 ans $\geq 10$ ans	2.500/ $\mu\text{L}$ 1 000/ $\mu\text{L}$ 100/ $\mu\text{L}$	68
Bénin (Cotonou & villages)	Hyperendémique (IP $> 80$ , enfants)	Cas : consultant fébrile Témoin : population asymptomatique	0-12 ans Adultes	3 000/ $\mu\text{L}$ 1 000/ $\mu\text{L}$	59
Sénégal (Magobél)	Hyperendémique (IP 35, enfants et adultes)	Cas : consultant fébrile (T $\geq 38^\circ\text{C}$ ) Témoin : consultant apyrétique	Enfants & adultes	10 000/ $\mu\text{L}$	67
Burkina Faso (Milieu rural, sud-ouest)	Hyperendémique (IP 47,9, enfants et adultes)	Cas : consultant fébrile (T $\geq 38^\circ\text{C}$ ) Témoin : consultant apyrétique	Enfants & adultes	10 000/ $\mu\text{L}$	58
Tanzanie (Kilombero)	Hyper-holoendémie (IP $> 90$ )	Cas : population fébrile (Tr $< 37,5^\circ\text{C}$ ) Témoin : population asymptomatique	$< 6$ ans	5 000/ $\mu\text{L}$	46
Côte d'Ivoire (région de Danané)	Hyper-holoendémie ( $> 300$ PIHan)	Cas : population fébrile Témoin : population asymptomatique	0-4 ans 5-9 ans $\geq 10$ ans	5 000/ $\mu\text{L}$ 1 000/ $\mu\text{L}$ 500/ $\mu\text{L}$	MC Henry
Congo (Linzolo+4 villages)	Hyper-holoendémie ( $> 300$ PIHan)	Cas : consultant et population fébrile SCE (Ta $\geq 38^\circ\text{C}$ ) Témoin : population	$< 15$ ans	2 / leucocyte ( $\leq 13\ 500/\mu\text{L}$ )	57
Congo (Mayombe, 3 villages)	Hyper-holoendémie ( $> 300$ PIHan)	Cas : consultant fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ) Témoin : population apyrétique	$< 5$ ans 5-10 ans 10-15 ans $> 15$ ans	19 900/ $\mu\text{L}$ 7 713/ $\mu\text{L}$ 2 372/ $\mu\text{L}$ 537/ $\mu\text{L}$	60
Sénégal (Dielmo)	Hyper-holoendémique (200 PIHan)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ) Témoin : population asymptomatique (pris comme leurs propres témoins)	$< 1$ an 1 an 2 ans 5 ans 7 ans 10 ans 15 ans 20 ans 30 ans 60 ans	29 400/ $\mu\text{L}$ 32 400/ $\mu\text{L}$ 23 250/ $\mu\text{L}$ 17 100/ $\mu\text{L}$ 13 760/ $\mu\text{L}$ 10 010/ $\mu\text{L}$ 7 800/ $\mu\text{L}$ 6 370/ $\mu\text{L}$ 4 680/ $\mu\text{L}$ 3 380/ $\mu\text{L}$	20

PIHan : Piqûres infectées par personne par an. Tr : température rectale; Ta : température axillaire; To : température orale. SCE : fièvre sans cause évidente. IP : indice plasmodique chez les asymptomatiques)

sanitaire. Par ailleurs, il a été montré que les densités parasitaires observées au cours d'épisodes de fièvre étaient plus élevées parmi les cas recrutés passivement, dans une structure sanitaire, que parmi les cas recrutés activement au cours

de visites systématiques (25). Recruter les cas de fièvre et les témoins en population (base d'étude primaire) ou parmi les consultants d'une structure sanitaire (base d'étude secondaire) dépend de l'objectif de l'étude : estimer l'incidence



des accès palustres dans la population ou apprécier l'importance du paludisme dans la morbidité prise en charge par les systèmes de santé. Dans les deux cas, il faut que les cas et les témoins soient recrutés dans la même base. En d'autres termes, les témoins doivent être recrutés parmi les personnes qui auraient été recrutées comme cas si elles avaient été malades (69). Cette condition serait violée par exemple si les cas de fièvre recrutés dans un dispensaire venaient de plus loin, avaient un tableau clinique ressenti comme plus grave ou étaient issus d'un milieu social plus défavorisé que les malades non fébriles recrutés comme témoins. Ces trois facteurs peuvent être associés à la densité parasitaire. Dans cet exemple, les cas et les témoins ne sont pas recrutés dans la même base d'étude, bien qu'ils soient recrutés dans la même structure sanitaire, et l'estimation de l'association entre la parasitémie et le statut clinique pourrait être biaisée dans un sens imprévisible. La probabilité de ce genre de biais est nettement plus élevée dans les études menées dans les structures sanitaires que dans les études en population et pourrait expliquer les différences de niveau de seuil identifiés dans des contextes épidémiologiques comparables avec des méthodologies épidémiologiques différentes (Tableau I) : suivi de cohorte en population (20, 21, 29, 61) *versus* études cas-témoins chez des consultants (58, 64, 67). Dans certaines études, les cas et les témoins n'ont pas été recrutés au même endroit ou au même moment (57, 59, 70).

Une autre source de différences entre les études résulte de l'incertitude sur le caractère asymptomatique des observations témoins. Les manifestations cliniques du paludisme peuvent être particulièrement brèves et discrètes (27), passer inaperçues des parents et finalement ne pas être déclarées si le suivi n'est pas assez étroit (4). Les suivis longitudinaux hebdomadaires ou mensuels et les études transversales ne permettent pas d'écarter des analyses, avec certitude, l'ensemble des individus ayant eu une augmentation récente de la parasitémie accompagnée de symptômes ou de signes cliniques, d'autant plus qu'en cas de fièvre, le premier recours aux soins est souvent l'automédication traditionnelle. Par exemple, en Côte d'Ivoire, les populations du Nord comme du Sud ne perçoivent pas l'accès palustre simple comme une maladie qui requiert d'aller au dispensaire ou l'intervention d'un membre du corps médical. Dans ces études, les différences de densité parasitaire entre les malades fébriles et les individus asymptomatiques sont généralement sous-estimées.

Dans certaines études, les cas étaient des patients avec une fièvre «présumée d'origine palustre» et les témoins, des patients avec une fièvre «présumée non palustre» (65,71). Les critères ayant permis d'attribuer cliniquement les fièvres au paludisme n'étaient pas précis et la définition des témoins n'était pas suffisamment stricte pour assurer que leurs manifestations cliniques n'étaient pas dues au paludisme. Ces études étaient donc adaptées pour évaluer la valeur du diagnostic clinique mais ne l'étaient pas pour identifier un seuil diagnostique de la parasitémie.

### Utilisation de la parasitémie pour calculer la fraction des épisodes cliniques attribuable au paludisme.

La notion de seuil n'a pas été retenue par tous les auteurs (23,29,30,46,55,63). Certains ont calculé la fraction des fièvres attribuables au paludisme en ne considérant que la présence ou l'absence de *Plasmodium* (29,55). D'autres auteurs ont calculé cette fraction étiologique en considérant le risque de fièvre comme une fonction croissante de la parasitémie (23,46,62,72).

Il est possible d'estimer la proportion des épisodes pathologiques attribuables au paludisme sous la forme de la fraction attribuable (FA) ou fraction étiologique (73,74). Chez les malades avec une parasitémie, elle peut être calculée à partir de l'estimation du ratio de risque R de survenue de l'épisode clinique à un niveau donné de parasitémie par rapport à l'absence de parasitémie détectable :  $FA = (R-1)/R$ . Le risque relatif R peut lui-même être estimé par un odds-ratio (rapport de cotes), directement ou par l'ajustement d'un modèle de régression logistique sur des données d'études longitudinales ou cas-témoins. Une hypothèse sous-jacente est que tout épisode pathologique dû au paludisme s'accompagne d'une parasitémie. Parmi l'ensemble des épisodes pathologiques observés dans une population, avec ou sans parasitémie détectée, la proportion de ceux qui sont attribuables au paludisme vaut  $FA = p(R-1)/R$ , où p est la proportion des cas avec parasitémie. Par exemple, dans une étude incluant 200 cas d'enfants fébriles dont 100 (50 %) sont infectés par *Plasmodium falciparum* et 1500 enfants témoins asymptomatiques dont 300 (20 %) sont infectés, l'odds-ratio du risque de fièvre vaut 4 (IC<sub>95</sub> : 3,0-5,4) et la proportion des cas de fièvre avec parasitémie attribuables au paludisme vaut  $FA = 0,75$  (IC<sub>95</sub> : 0,66-0,81). Ainsi, seulement 75 (IC<sub>95</sub> : 66-81) des 100 cas de fièvre avec parasitémie seraient dus au paludisme. Cette approche a été utilisée pour estimer la morbidité par paludisme à *Plasmodium falciparum* dans une région mésoendémique à transmission saisonnière de Gambie (29) ou pour évaluer la valeur diagnostique de signes cliniques dans une région hypoendémique du Niger (55). Elle ne peut cependant pas être utilisée dans les régions où l'endémicité et le niveau de transmission sont élevés. Dans ces situations, la proportion d'enfants exempts d'infection par *Plasmodium falciparum* est basse et la faiblesse de leurs effectifs limite la précision de l'estimation de la FA. Par ailleurs, lorsque les personnes reçoivent plusieurs centaines de piqûres infectantes par an, en zone holo-hyperendémique, il arrive que le taux de prévalence parasitaire soit plus élevé chez les enfants apyrétiques que chez les fébriles à cause de la suppression des faibles parasitémies par les fièvres dues à la rougeole, à la grippe ou à d'autres viroses (46, 57, 75, 76). Cet effet supprimeur des fièvres virales entraîne alors une sous-estimation systématique de la FA calculée à partir de la prévalence parasitaire.

Pour surmonter ces problèmes, Tom Smith a proposé d'utiliser un modèle de régression logistique décrivant le risque de fièvre (P) comme une fonction continue monotone et croissante de la densité parasitaire (46). Le logit de P s'écrit alors

sous la forme:  $\log[P/(1-P)] = \alpha + \beta d^r$ , où  $\alpha$  et  $\beta$  sont des paramètres estimés à partir des observations par les logiciels d'analyse statistique (technique du maximum de vraisemblance),  $d$  la densité parasitaire (ou sa transformation logarithmique) et  $r$  la valeur de la puissance de  $d$  qui permet le meilleur ajustement des données. Dans notre expérience, les modèles logistiques ajustés sur des données parasito-cliniques provenant de zones d'endémie comparables sont très semblables. Dans des zones d'endémie très élevée, avec plus de 80 % des enfants porteurs de *Plasmodium falciparum*, la valeur de l'exposant  $r$  était très proche à Dielmo ( $r = 0,82$ ), en Tanzanie ( $r = 0,83$ )(46,77), en Papouasie-Nouvelle Guinée ( $r = 0,84$ )(23) ou dans la région de Danané en Côte d'Ivoire ( $r = 0,80$ ). Dans des régions où le niveau de transmission et le taux de prévalence parasitaire (environ 50 %) étaient plus faibles, par exemple à Ndiop, la valeur de l'exposant  $r$  était plus basse, de l'ordre de 0,5. La valeur de  $r$  était enfin proche de 0,2 dans une région du Burkina Faso où la prévalence parasitaire chez les sujets asymptomatiques était inférieure à 25 % (P. Rihet, communication personnelle). L'ajustement de ces modèles permet d'obtenir une estimation  $R_d = \exp(\beta d^r)$  du risque relatif de fièvre associé à n'importe quelle densité parasitaire  $d$ , les observations sans parasite détecté servant de référence. La probabilité que l'épisode pathologique d'un individu fébrile ayant une densité parasitaire non nulle  $d$  soit dû au paludisme vaut alors  $FA_d = (R_d - 1)/R_d$ . Le nombre d'accès palustres parmi un nombre  $N$  d'épisodes pathologiques est calculé en faisant la somme des  $N$  estimations de  $FA_d$ . Le modèle de régression logistique permet d'estimer les  $R_d$ , les  $FA_d$  et leurs intervalles de confiance en contrôlant des facteurs de confusion et des interactions entre facteurs (78-80). Il est ainsi possible de prendre en compte l'effet de l'âge, de la saison ou du centre de recrutement. Un éventuel effet individu peut aussi être contrôlé dans les modèles de régression à effet aléatoire ajustés sur des données longitudinales (81). Chaque individu est alors pris comme son propre témoin et  $R_d$  est une estimation du risque relatif individuel de fièvre associé à la parasitémie. La simplicité et la transportabilité de cette méthode la rendent particulièrement attrayante. Elle a aussi l'avantage d'utiliser l'ensemble de l'information contenue dans les estimations des densités parasitaires. Elle est particulièrement indiquée pour estimer l'incidence des accès palustres pour évaluer une intervention en zone d'endémie élevée. Ce fut le cas pour des essais vaccinaux ou de moustiquaires imprégnés (77, 82). Dans ce type d'essai, on peut craindre que les interventions ne modifient la relation entre la densité parasitaire et le risque de fièvre. Pour estimer l'incidence des accès palustres, la méthode de la fraction attribuable peut alors être appliquée sur l'ensemble des observations (même critère diagnostique pour l'ensemble des individus) ou séparément sur les différents groupes d'intervention (critères diagnostiques adaptés).

Cette méthode permet enfin d'estimer la sensibilité et la spécificité d'un seuil diagnostique de densité parasitaire en utilisant la FA comme critère de référence (46, 72). Dans les études de la morbidité palustre, il est cependant préférable d'utiliser l'estimation de l'incidence des accès palustres directement obtenue par la fraction attribuable plutôt que celle

déduite de l'utilisation des seuils diagnostiques. En effet, ces seuils diagnostiques ont nécessairement une valeur diagnostique inférieure à 100 % car c'est la FA qui leur sert de référence. Il en va différemment du seuil pyrogène que nous avons identifié à Dielmo, car il permettait de décrire la relation entre la parasitémie et le risque de fièvre mieux que ne le faisait le modèle utilisé pour l'estimation de la FA (20).

Nous avons utilisé la méthode de la fraction attribuable en Côte d'Ivoire (68), en zone de savane du nord (région de Korhogo et de Niakaramandougou) et en zone de forêt de l'ouest (région de Danané et de Guiglo), pour comparer l'incidence des accès palustres dans différents agro-écosystèmes : bas-fonds avec une culture de riz par an ; bas-fonds aménagés avec 2 cultures de riz par an ; bas-fonds non exploités. Dans la zone de savane et dans la zone de forêt, respectivement 24 et 21 villages répartis dans chaque agro-écosystème, ont été tirés au sort. Dans chaque village, 250 personnes choisies au hasard ont été suivies cliniquement pendant 8 périodes consécutives de 5 jours, chaque 6 semaines pendant un an. Une goutte épaisse était réalisée systématiquement en milieu de période ou en cas d'épisode fébrile. L'analyse a porté sur la comparaison des densités parasitaires mesurées au cours des épisodes cliniques et celles des périodes asymptomatiques des mêmes personnes. Dans la région de Korhogo où le niveau de transmission de *Plasmodium falciparum* est de l'ordre de 140 piqûres infectées par an, les seuils diagnostiques identifiés dans cette étude sont de 2 500, 1 000 et 100 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* par microlitre, respectivement, pour les personnes âgées de 0 à 4 ans, 5 à 9 ans et 10 ans et plus. Par rapport à la méthode de la fraction attribuable, ces seuils diagnostiques ont une sensibilité de 70 à 90 % et une spécificité de 80 %. Dans la région de forêt où le niveau de transmission de *Plasmodium falciparum* est de l'ordre de 300 piqûres infectées par personne et par an, les différences de densité parasitaire moyenne entre les personnes fébriles et les asymptomatiques sont marquées (Fig. 4). Il existe des zones de

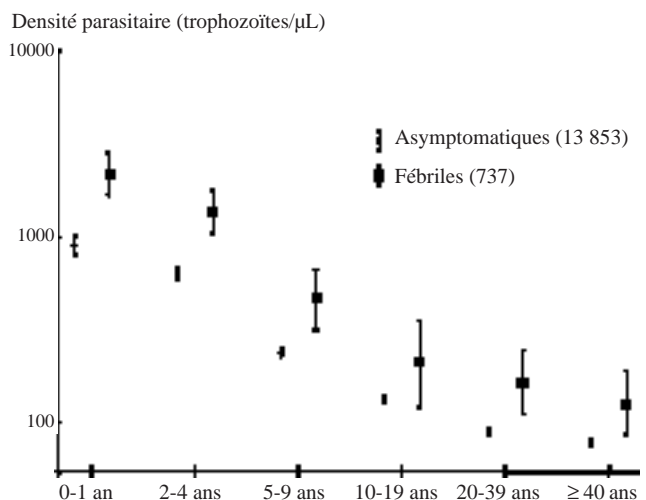


Figure 4 - Moyennes géométriques (IC<sub>95%</sub>) des densités parasitaires à *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge et du statut clinique, 4 989 personnes, 14 590 gouttes épaisses positives, région de forêt (Danané), ≥ 300 piqûres infectées/personne/an, Côte d'Ivoire.

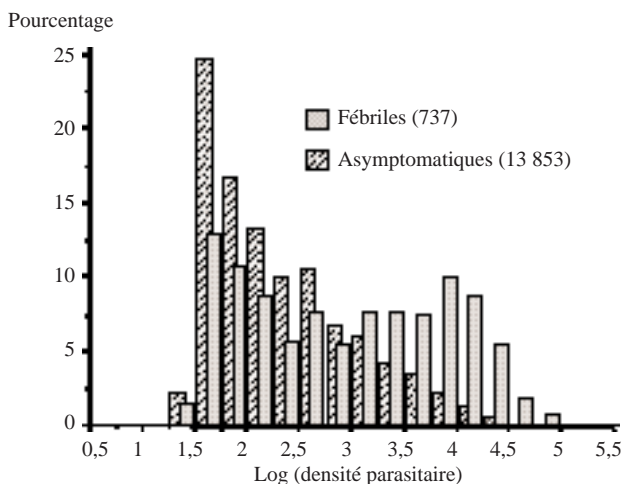


Figure 5 - Répartition des parasitémies en fonction de la densité parasitaire à *Plasmodium falciparum* et du statut clinique, 4989 personnes, 14590 gouttes épaisses positives, région de forêt (Danané),  $\geq 300$  piqûres infectées/personne/an, Côte d'Ivoire.

recouvrement entre les densités observées chez les fébriles et celles observées chez les asymptomatiques (Fig. 5). La méthode de la fraction attribuable a cependant permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité de différents seuils de parasitémies pour le diagnostic des accès palustres en tenant compte de l'âge (Fig. 6). Les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) permettent de choisir, pour chaque classe d'âge, le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité (Fig. 6). Dans notre exemple, un seuil diagnostique à  $1\ 000/\mu\text{L}$  aurait une sensibilité supérieure à 80 % et une spécificité de 90 % chez les enfants âgés de 5 à 9 ans. Dans la même classe d'âge, un seuil à  $2\ 500/\mu\text{L}$  augmenterait la spécificité à 95 %, mais diminuerait la sensibilité à 70 %. Les seuils sont choisis en fonction de la qualité recherchée du diagnostic.

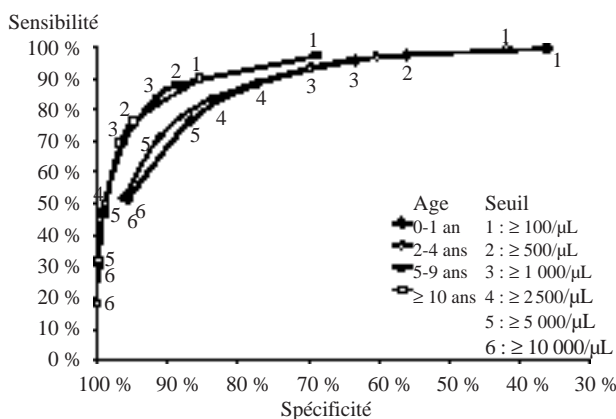


Figure 6 - Courbe ROC de différents seuils de densité parasitaire à *Plasmodium falciparum* pour le diagnostic des accès palustres, accès palustres définis par la méthode de la fraction attribuable, 892 personnes, 1 124 épisodes de fièvre, zone de forêt (Danané), Côte d'Ivoire.

## Quel critère parasitologique pour le diagnostic des accès palustres à *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* ou *Plasmodium malariae* ?

Peu d'études ont été menées sur la relation entre la densité parasitaire à *Plasmodium falciparum* et le risque de fièvre. Encore moins de données sont disponibles pour les autres *Plasmodii* humains.

Il est généralement considéré que l'association entre le risque de fièvre et la densité parasitaire est plus forte avec *Plasmodium falciparum* qu'avec *Plasmodium vivax* (26), ou *Plasmodium malariae* (29). L'étude de 7 930 consultants de 4 villages du Punjab pakistanais suggère que la relation entre le risque de fièvre et la densité parasitaire à *Plasmodium vivax* ne varie pas sensiblement en fonction de l'âge, probablement à cause de l'acquisition plus précoce d'un certain niveau d'immunité contre ce parasite (26). En Papouasie-Nouvelle Guinée, l'association entre la densité parasitaire à *Plasmodium vivax* et le risque de fièvre serait faible également et il existerait apparemment peu ou pas d'effet de l'âge sur cette relation (Tom Smith, communication personnelle).

Pour *Plasmodium malariae*, les données sont encore plus rares. M.J. Miller avait observé au Liberia (14) que le niveau moyen de parasitémie initiant les accès chez les adultes et chez les enfants était respectivement de  $79/\mu\text{L}$  (2 accès, 22-136) et  $3\ 172/\mu\text{L}$  (5 accès, 1 650-5 935) pour *Plasmodium malariae*, mais l'effectif des personnes suivies était réduit (20 adultes et 10 enfants) et l'incidence des accès palustres à *Plasmodium malariae* était peu élevée. Les épisodes pathologiques qui pourraient être diagnostiqués comme des accès palustres à *Plasmodium malariae* sont généralement très rares en zone d'endémie (observations personnelles). Cette rareté rend difficile l'étude de la relation entre la parasitémie à *Plasmodium malariae* et la fièvre.

Pour *Plasmodium ovale*, des travaux récents nous permettent d'aborder la question de la définition et de l'étude des accès palustres. A Dielmo, l'analyse de 4549 épisodes de fièvre dont 243 accompagnés d'une parasitémie à *Plasmodium ovale* (69 isolées, 174 associées à un autre *Plasmodium*) suggérait que seules les densités parasitaires supérieures ou égales à un ratio de 0,1 parasite par leucocyte ( $=800/\mu\text{L}$ ;  $n = 99$ ) étaient significativement associées à des manifestations cliniques. Une densité parasitaire supérieure ou égale à ce seuil n'était observée que dans 0,06 % des gouttes épaisses faites en période asymptomatique (article en préparation).

## Quelle place pour un diagnostic clinique des accès palustres ?

Alors que certains auteurs n'avaient trouvé aucune association entre la parasitémie et les signes cliniques (57, 83) et qu'ils suggéraient que l'attribution des fièvres au paludisme ne pouvait être basée que sur la parasitologie, Rougemont a proposé d'utiliser les signes cliniques pour prédire la présence de *Plasmodium falciparum* sur un étalement de sang et décider de prescrire les traitements antipaludiques (55). Que peut-on attendre du diagnostic clinique des accès palustres ?



## Fièvre ou hyperthermie ?

La fièvre est un syndrome. Il comprend généralement l'hyperthermie, c'est-à-dire l'observation à l'aide d'un thermomètre de l'augmentation de la température corporelle. Ce syndrome comprend aussi, entre autres signes ou symptômes, la sensation de corps chaud ou de corps froid, les sueurs et les frissons. C'est la manifestation clinique la plus fréquemment observée au cours des accès palustres. L'hyperthermie, par contre, n'est pas toujours détectée et la fréquence de sa détection dépend de l'âge du malade (27, 84). A Dielmo, où la population fait l'objet d'une recherche active, domiciliaire et quotidienne des cas, une hyperthermie ( $\geq 38^\circ\text{C}$ ) était observée dans respectivement 97,4 %, 96,8 %, 88,2 % et 78,6 % des accès palustres des personnes âgées de 0-1 an ( $n = 192$ ), 2-5 ans ( $n = 348$ ), 6-9 ans ( $n = 93$ ) et de 10 ans et plus ( $n = 56$ ) (27). De nombreuses études hospitalières ont souligné la fréquence des accès palustres où aucune hyperthermie n'avait pu être objectivée : 49 % en Malaisie (85), 49,5 % en Thaïlande (86). Dans un hôpital au Nigeria, une histoire de fièvre avait une sensibilité bien meilleure que l'observation d'une hyperthermie (79 % versus 53 %) pour prédire une infection par *Plasmodium falciparum* chez les enfants (87). Des sensibilités similaires (67 % versus 25 %) ont été estimées dans des dispensaires ruraux d'une région hypoendémique du Zimbabwe (83).

Par ailleurs, chez des enfants gambiens suivis dans leurs villages, la variation moyenne de la température axillaire au cours d'une journée était de l'ordre de  $1,2^\circ\text{C}$ , cette température suivait la température de l'air et dépassait  $37,5^\circ\text{C}$  chez 6 à 23 % des enfants selon l'heure de la journée (88). Au Congo, 18,5 % d'écoliers asymptomatiques et non impaludés avaient une température axillaire comprise entre  $37,5^\circ\text{C}$  et  $37,9^\circ\text{C}$  (57). Ainsi, une température axillaire supérieure à  $37,5^\circ\text{C}$  (ou une température rectale supérieure à  $38^\circ\text{C}$ ) peut être normale en zone intertropicale. Les accès palustres doivent donc être définis cliniquement par la notion d'une histoire de fièvre et pas seulement par l'observation d'une hyperthermie (25).

Les autres manifestations cliniques des accès palustres comprennent souvent des céphalées, une anorexie, des nausées ou des vomissements, une diarrhée, une pâleur et une splénomégalie (27) ou encore, chez les nourrissons, l'inappétence ou quelque signe pathologique décrit par la mère (84). Aucun de ces signes ou symptômes n'est absolument constant. En fait, il n'existe pas de signe clinique ou de syndrome pathognomonique du paludisme à *Plasmodium falciparum*.

## Quelles alternatives au « diagnostic présomptif » ?

En l'absence de laboratoire, il est pourtant recommandé de porter un diagnostic présomptif d'accès palustre en cas de fièvre sans autre cause évidente et de donner un traitement antipaludique (89-91). Cette attitude a été et reste le plus souvent la plus pertinente. Elle permet de sauver de nombreuses vies grâce à un traitement rapide des accès palustres. Si elle est appliquée, un grand nombre de traitements antipaludiques est cependant donné de façon inap-

propriée, particulièrement en dehors des périodes ou des zones à forte transmission (65, 92, 93). Cette attitude peut donc être coûteuse et dangereuse à cause de la pression qu'elle peut exercer pour la sélection de souches résistantes aux antipaludiques et de la toxicité de certains de ces nouveaux médicaments. Pour ces raisons, de nombreux essais ont été tentés pour améliorer la valeur du diagnostic clinique des accès palustres.

La sensibilité et la spécificité des combinaisons de signes ou de symptômes pour le diagnostic d'accès palustres ont souvent été considérées comme insuffisantes pour que ces manifestations cliniques servent de base au diagnostic d'accès palustre, au choix d'un traitement ou au diagnostic différentiel. Ainsi, l'analyse de 1254 épisodes fébriles dont 301 étaient attribués au paludisme a montré, en Thaïlande, dans une zone de faible endémie, que la meilleure combinaison de signes et de symptômes (association d'une histoire de fièvre avec des céphalées et une absence de toux) avait une sensibilité de 51 % et une spécificité de 72 % pour le diagnostic d'accès palustre (86). Parmi 287 patients traités pour paludisme dans des dispensaires ruraux d'une région hypoendémique du Zimbabwe, 28 % seulement avaient une parasitémie détectée sur une goutte épaisse (83). Une histoire de céphalées, de fièvre et de frissons avait respectivement une sensibilité de 90 %, 67 % et 63 % et une spécificité de 16 %, 24 % et 34,2 % pour prédire l'infection plasmodiale. L'hyperthermie ( $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ) avait une sensibilité et une spécificité de 25 % et 63 %.

Considérer ou non que des combinaisons de signes et de symptômes ont une valeur diagnostique « suffisante » dépend en fait de l'objectif poursuivi et de leur place dans un algorithme décisionnel. Différents algorithmes cliniques ont été proposés pour le diagnostic des accès palustres au niveau des structures sanitaires périphériques ou des familles (94-98).

Dans un centre de santé d'une région rurale d'Éthiopie, à 1 500-2 300 m d'altitude, où la transmission du paludisme est faible et saisonnière (hypoendémie), l'association de fièvre avec un antécédent d'accès palustre, une absence de toux ou une pâleur avaient une sensibilité et une spécificité de 83 % et 51 % pour prédire une parasitémie à *Plasmodium falciparum* ou à *Plasmodium vivax* pendant la saison à haut risque et une sensibilité et une spécificité de 75 % et 60 % pendant le reste de l'année (97). L'association de la fièvre avec un antécédent d'accès palustre, une pâleur ou une splénomégalie avait une sensibilité et une spécificité de 80 % et 65 % pendant la saison à haut risque et une sensibilité et une spécificité de 69 % et 81 % pendant le reste de l'année. Cela montre qu'en zone de faible endémie, la spécificité du diagnostic clinique d'accès palustre peut être améliorée sans trop altérer sa sensibilité par la prise en compte de signes comme la pâleur ou la splénomégalie. Ces deux signes ont également été retenus par Redd (99). Dans deux hôpitaux d'une zone hyperendémique du Malawi, l'association d'une hyperthermie (température rectale  $\geq 37,7^\circ\text{C}$ ) avec une pâleur ou une splénomégalie avait une sensibilité et une spécificité de 85 % et 41 % pour identi-



fier les enfants infectés par *Plasmodium falciparum* et une sensibilité de 89 % pour identifier ceux qui avaient une densité parasitaire supérieure ou égale à 10 000/ $\mu$ L ou ceux qui étaient anémiques (hémoglobine < 80g/L) et infectés, c'est-à-dire ceux qui avaient le plus besoin d'un traitement antipaludique. Dans la même étude, l'histoire de fièvre relatée par la mère avait une sensibilité et une spécificité de 93 % et 21 % pour la détection des enfants infectés et une sensibilité de 97 % et de 95 % pour détecter les enfants anémiques et infectés ou ceux qui avaient une densité parasitaire élevée. La reconnaissance d'une pâleur, la détection d'une splénomégalie ou l'estimation de la température corporelle sans thermomètre sont variables selon les individus et leur niveau de formation (100, 101). L'utilisation de ces signes cliniques suppose que les personnels de santé soient formés spécifiquement à cette séméiologie et que cette formation soit standardisée.

La valeur diagnostique des algorithmes cliniques peut varier sensiblement en fonction de la saison dans les zones d'endémie faible où la transmission est saisonnière. Dans une étude cas-témoin, avec appariement sur l'âge (enfants de 2 à 9 ans), le sexe, le groupe ethnique et le jour de consultation, menée dans un dispensaire d'une région hypoendémique du Niger, une association significative a été trouvée pendant la saison des pluies entre l'existence d'une parasitémie à *Plasmodium falciparum* et les manifestations cliniques comme une hyperthermie ( $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ), une durée des symptômes inférieure à 3 jours avant l'admission et l'absence d'autre cause évidente de fièvre (55). Cette association n'était pas significative pendant la saison sèche. Ces résultats ont sous-tendu l'arbre décisionnel que Rougemont a proposé pour le diagnostic du paludisme des enfants âgés de 2 à 9 ans en Afrique sahélienne (102).

Dans d'autres situations, c'est la notion d'un voyage en zone d'endémie plus élevée qui peut être utilement prise en compte. Dans la région des hauts plateaux du Burundi où la transmission du paludisme est très faible et saisonnière, un algorithme clinique avait une sensibilité, une spécificité, une valeur prédictive positive (VPP) et une valeur prédictive négative (VPN) de 83 %, 75 %, 15 % et 99 % pour prédire une infection par *Plasmodium falciparum* chez les malades fébriles (103). Dans cette région, la plupart des accès palustres touchait des personnes qui avaient voyagé en zone d'endémie plus élevée. Pour améliorer la VPP et la spécificité et porter l'indication d'un traitement adapté, la réalisation d'une goutte épaisse a été proposée uniquement dans les cas présomptifs de paludisme qui n'ont pas voyagé en zone d'endémie, les cas ayant voyagé étant tous traités par antipaludiques. Cette approche permettrait de limiter le nombre de GE réalisées et d'atteindre une spécificité et une VPP de 98 % et 71 %.

Il apparaît que la meilleure combinaison de signes et de symptômes pour le diagnostic des accès palustres dépend des régions et des circonstances de son utilisation. Le tableau II montre les valeurs diagnostiques de différents critères cliniques. Les comparaisons ne peuvent être effectuées qu'en considérant leur sensibilité (proportion des cas reconnus comme des cas) et leur spécificité (proportion

des non-cas reconnus comme des non-cas). Certains auteurs ont utilisé les VPP (proportion de cas parmi ceux qui sont prédits comme des cas) et les VPN (proportion de non-cas parmi ceux qui sont prédits comme des non-cas) (96,104), arguant que ces indicateurs sont les plus pertinents au moment de prendre une décision clinique. Les valeurs prédictives dépendent cependant de la prévalence des cas. Ils sont donc variables d'une région ou d'un contexte à l'autre. Par conséquent, ils ne peuvent pas servir pour la comparaison et la sélection d'algorithmes décisionnels évalués séparément.

### Intérêt de la clinique pour le diagnostic différentiel des accès palustres.

L'intérêt de la clinique pour le diagnostic différentiel des accès palustres a été exploré par plusieurs auteurs (87, 96, 98, 100, 106, 108, 109). Dans une région de Papouasie-Nouvelle Guinée où la transmission du paludisme est élevée et pérenne (hyper à holoendémie), des parasitémies supérieures ou égales à 10 000/ $\mu$ L étaient significativement associées avec la fièvre, l'absence de toux, les vomissements et la splénomégalie chez les enfants et avec les vomissements chez les adultes (96). Dans cette situation, l'association d'une histoire de fièvre avec une splénomégalie et l'absence de toux ou une hyperthermie  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  était le meilleur prédicteur d'une densité parasitaire  $\geq 10\,000/\mu\text{L}$  chez les enfants malades (VPP de 46 à 47 %). En sens inverse, l'association d'une histoire de fièvre avec une rate normale ou des selles anormales avait une VPN de 84 % pour une parasitémie chez les adultes (96). Ces informations ont été considérées comme utiles aux personnels de santé pour déterminer non seulement quels patients fébriles sont susceptibles d'avoir besoin d'un traitement antipaludique, mais aussi et surtout quels sont ceux pour lesquels un autre diagnostic doit être recherché, c'est-à-dire ceux qui ont besoin d'un traitement associé au traitement antipaludique. C'était aussi la conclusion d'une étude menée dans une autre région de Papouasie-Nouvelle Guinée (98). Un algorithme pour différencier les accès palustres des cas de typhoïde était évalué sur un groupe de malades différent de celui qui avait permis sa mise au point. Il prenait en compte l'ictère, la pâleur, les troubles du transit, les tremblements et la durée de la maladie. Sa sensibilité et sa spécificité étaient de 71 % et 79 % pour le diagnostic d'accès palustre et de 79 % et 71 % pour celui de typhoïde. Dans une étude des consultants pour diarrhée d'un service de pédiatrie d'un hôpital d'Ibadan au Nigeria, une hyperthermie ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) et une histoire de fièvre avaient respectivement une sensibilité de 53 % et 79 % et une spécificité de 57 % et 27 % pour détecter les enfants infectés par *Plasmodium falciparum* (87).

A contrario, les critères proposés par l'OMS (89, 110, 111) pour le diagnostic clinique des accès palustres (fièvre ou histoire de fièvre) et pour les infections respiratoire aiguës (toux, difficultés respiratoires, tirage ou fréquence ventilatoire élevée) se superposaient chez un grand

Tableau II - Valeur (sensibilité et spécificité) du diagnostic clinique des accès palustres.

Pays (lieu)	Endémie	Critère de référence	Prédicteurs cliniques	Se	Sp	Population	Réf.
Niger (Galmi)	Hypo	DP>0	Maladie < 3 jours	89	37	285 enfants (2-9 ans) consultants pour fièvre pendant la saison des pluies	55
			Absence de cause évidente T ≥ 39°C [Fièvre sans cause évidente sauf si (≥3jours et T<39°C)] ou [Mdie <3jours et T(39°C)]	70	87		
		Fraction attribuable pour DP>0	Maladie < 3 jours Absence de cause évidente Temp. ≥ 39°C [Fièvre sans cause évidente sauf si (≥ 3jours et < 39°C)] ou [Mdie <3jours et T ≥ 39°C]	91	31		
				86	83		
				53	92		
				86	86		
Ethiopie (Butajira)	Hypo	DP>0	Algorithme IMCI (pour le traitement de l'enfant malade) de l'OMS Fièvre et (accès précédant, pâleur ou splénomégalie)	71 à 84	26 à 56	2 490 enfants fébriles (< 5 ans)	97
				65 à 80	69 à 81		
Burundi (Kayanza)	Hypo	DP>0	Algorithme du Projet de Lutte contre les Maladies Transmissibles et Carencielles	83	75	100 cas de fièvre + non fébriles	104
Thaïlande (Shoklo)	Hypo	DP>0 à <i>Plasmodium vivax</i> ou à <i>Plasmodium falciparum</i>	Histoire de fièvre avec céphalées et sans toux T ≥ 38°C	51	72	1 254 fièvres de 1527 enfants (2-15 ans)	86
				51	71		
Inde (Ballabgarh)	Hypo	DP>0 à <i>Plasmodium vivax</i> ou à <i>Plasmodium falciparum</i>	Pâleur Splénomégalie	71	59	136 cas de fièvre	94
				51	81		
Nigeria (Ibadan)	Hypo à méso.	DP>0	T ≥ 38°C Histoire de fièvre	61	56	313 enfants (<5 ans) malades sans diarrhée	87
				79	25		
Gambie (Fajara)	Méso à hyper	Histoire de fièvre et DP ≥ 5 000/μL	Algorithme IMCI (pour le traitement de l'enfant malade) de l'OMS T ≥ 38°C ou splénomégalie ou pâleur	100	9	440 enfants (< 5 ans)	101
				88	51		
Inde (Borigumma)	Hyper et hypo	DP>0	Analyse discriminante utilisant différentes combinaisons (fièvre, céphalée, vomissements, nausées, courbatures, diarrhée)	46 à 81	63 à 81	5 285 enfants et adultes malades	105
Malawi (Lilongwe)	Hyper	Histoire de fièvre et DP>0	Hyperthermie ou histoire de fièvre	96	16	1 599 enfants (< 5 ans) consultant pour toux ou fièvre	106
Gambie (Farafenni)	Hyper	T ≥ 37,5°C et DP ≥ 5 000/μL	Score calculé à partir de symptômes (sommolence, anorexie, pas de toux rapportée, frissons) et de signes (pâleur, absence de rash, pas de toux entendue, tachypnée, splénomégalie). «diagnostic de médecin sans laboratoire»	88	64	159 enfants 6 mois-9 ans (avec histoire de fièvre et sans cause évidente (mise au point)	95
				86	61		
Gambie (Basse)	Hyper	T ≥ 37,5°C et DP ≥ 5 000/μL	Score calculé à partir de symptômes (sommolence, anorexie, pas de toux rapportée, frissons) et de signes (pâleur, absence de rash, pas de toux entendue, tachypnée, splénomégalie). «diagnostic de médecin sans laboratoire»	88	62	518 enfants (5 mois-9 ans) avec histoire de fièvre et sans cause évidente (validation)	107
				82	61		
Kenya (Siaya) (< 5 ans)	Hyper	Histoire de fièvre et DP ≥ 5 000/μL	Algorithme IMCI (pour le traitement de l'enfant malade) de l'OMS	100	0	1 795 enfants	100
Tanzanie (Nyamisati)	Holo	Pas de cause évidente et DP>0	« diagnostic agent de santé » « diagnostic de médecin sans laboratoire » Fièvre intermittente	97	13	586 épisodes de fièvre de 249 enfants	22
				77	98	Enfants (0-9 ans)	

nombre des enfants admis dans des hôpitaux du Malawi et de Gambie et apparaissaient clairement comme insuffisamment spécifiques pour limiter l'emploi des antibiotiques et des antipaludiques aux seuls cas qui en avaient besoin (106,109). Cette superposition entre les présentations cliniques du paludisme et des pneumopathies a été retrouvée par d'autres auteurs (100).

#### QUELLES TECHNIQUES POUR ESTIMER LA PARASITEMIE ?

Différentes méthodes ont été proposées pour estimer la parasitémie. Certaines reposent sur la coloration, la détection et la numération des parasites, d'autres consistent à révéler la présence de molécules parasitaires. Les techniques de la goutte épaisse et du frottis mince sur lame de verre datent

du début du XX<sup>e</sup> siècle et servent de référence (112, 113). Elles sont simples et bon marché (de l'ordre de 0,03 à 0,7 US\$), mais elles sont laborieuses à mettre en œuvre et nécessitent une technicité particulière. Elles ont en revanche l'avantage de permettre l'estimation de la densité parasitaire et de pouvoir être conservées et réexaminées. Leur performance dépend de l'examineur et de la coloration, plus particulièrement de la qualité des colorants qui doivent parfois être filtrés et du pH des solutions. Les autres méthodes sont parfois plus sensibles et nécessitent un apprentissage moins long, mais elles sont généralement beaucoup plus chères et ne permettent pas d'estimer la densité parasitaire. La détection par PCR de l'ADN parasitaire est certainement la méthode la plus sensible. Son coût et sa technicité ne permettent pas son utilisation sur le terrain, mais elle peut trouver sa place pour le diagnostic chez les voyageurs de retour de zone d'endémie (114).

### Le frottis mince.

Le frottis mince, c'est-à-dire 1 à 1,5 µL de sang étalé sur 250 à 600 mm<sup>2</sup> et coloré, est la méthode de référence pour l'étude morphologique des hématozoaires et pour le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales. La lecture de 100 champs microscopiques (oculaires 5 à 7X et objectif à immersion 100X) représente seulement 1/200 à 1/100 µL de sang et la probabilité qu'un observateur expérimenté ne détecte pas une parasitémie inférieure à 200/µL est élevée. La densité parasitaire est généralement estimée par le pourcentage d'hématies parasitées. Le résultat peut être multiplié par un facteur pour l'exprimer en parasites par microlitres. D'autres méthodes d'estimation de la densité parasitaire ont été proposées (115).

### La goutte épaisse.

La goutte épaisse (GE) contient idéalement 3 à 5 µL de sang sur 50 à 90 mm<sup>2</sup> et en moyenne 15 à 20 leucocytes par champ microscopique. Un champ microscopique représente alors 1/500 à 1/350 µL de sang et l'examen de 100 champs couvre 1/5 à 1/3 µL de sang. Dans ces conditions, les parasites passent rarement inaperçus si la densité parasitaire est supérieure ou égale à 25/µL. Sa sensibilité est 20 à 30 fois plus élevée que celle du frottis mince. La GE peut être séchée, colorée et lue en l'espace d'une heure (112). La GE est largement utilisée pour le diagnostic en routine car elle permet d'examiner rapidement un volume de sang important (112, 113). Le manque d'expérience de certains biologistes limite cependant son utilisation et son enseignement. Les parasites sont pourtant facilement détectés sur la GE même si ils peuvent parfois être plus difficiles à identifier que sur un frottis mince. Cela est dû au fait que les hématies ont été lysées par la coloration sans fixation de l'étalement de sang. Seuls les leucocytes et les parasites sont visibles. L'apparence de ces derniers peut être altérée à cause de la déshémoglobination et du lent séchage de l'étalement pendant sa préparation (112). Les jeunes trophozoïtes peuvent apparaître comme des anneaux incomplets ou des taches de cytoplasme bleu avec un point rouge séparé (chromatine). Le cytoplasme des trophozoïtes âgés de *Plasmodium vivax* peut être fragmenté et

les grains de Schüffner moins évidents que sur un frottis mince. La forme en bande de *Plasmodium malariae* est souvent moins caractéristique. La distinction entre *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* peut parfois être difficile. Les schizontes et les gamétocytes gardent généralement leur apparence habituelle. L'interprétation des parasites vus sur les GE nécessite une certaine expérience qui peut être facilement acquise en étudiant d'abord leur morphologie sur des frottis minces puis en cherchant les formes correspondantes sur les GE. En pratique clinique, il est surtout important de détecter rapidement des parasitémies même faibles. Le problème de diagnostic d'espèce se pose rarement, généralement sur peu de parasites et l'incertitude est le plus souvent sans conséquence sur la conduite à tenir ou sur l'appréciation du tableau parasito-clinique. La GE est donc l'examen parasitologique de choix en clinique.

Différentes méthodes ont été proposées pour estimer la densité parasitaire (116). Earle et Perez ont calibré le volume de sang déposé et examiné sur les lames de verre (117). L'estimation du nombre de parasites par leucocytes combinée à la leucocytémie permet d'obtenir une estimation précise de la densité parasitaire (118,119). Cette méthode est particulièrement lourde à mettre en œuvre et on utilise généralement une leucocytémie moyenne (120), par exemple 8 000/µL. En faisant l'hypothèse que la GE a une épaisseur standard, certains ont calculé que 2 000 leucocytes représentaient 0,2 µL de sang (121). Pour pallier le problème de la variabilité de la leucocytémie, il est possible d'exprimer la densité parasitaire par le ratio parasites / leucocytes (122). D'autres ont estimé la densité parasitaire en considérant la proportion des champs microscopiques avec au moins un parasite détecté mais cette méthode est peu discriminante parmi les densités parasitaires élevées (123, 124). Il a ensuite été proposé de dénombrer les parasites par champs microscopiques pour les fortes densités et de calculer la proportion de champs positifs pour les densités les plus faibles (125). Certaines de ces méthodes d'estimation de la densité parasitaire ont été comparées directement (125,126).

### Microscopie et fluorescence.

Plusieurs méthodes reposant sur la coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange (AO) ou par la benzothioicarboxypurine (BCP) ont été proposées (127-132). Le kit commercial QBC® (*quantitative buffy-coat*) de Becton Dickinson comme la technique de Kawamoto font appel à l'AO (128,129). Ces techniques sont rapides et faciles à mettre en œuvre. Elles ont généralement une sensibilité et une spécificité équivalentes à celle de la goutte épaisse (133,134). La lecture des étalements de sang colorés à l'AO selon la méthode Kawamoto peut cependant être difficile dans les conditions du terrain (135). Les colorations par l'AO ou la BCP n'étant pas spécifiques des parasites, le microscopiste doit donc apprendre à différencier les parasites fluorescents des autres cellules ou débris cellulaires contenant des acides nucléiques. Même si des différences morphologiques peuvent être repérées (130), ces méthodes ne permettent pas de porter un diagnostic d'espèce plasmodiale (133), ni d'estimer la densité parasitaire (130). Le QBC® nécessite un



équipement particulier adaptable aux microscopes, une centrifugeuse et des tubes capillaires spécifiques. Il coûterait environ 1,7 US\$ par test (133). Il permet une concentration des parasites et leur détection rapide, même à des densités parasitaires faibles. Becton Dickinson a arrêté la commercialisation de l'équipement et arrêtera prochainement celle des réactifs. La méthode de Kawamoto ne nécessite qu'une paire de filtres adaptables aux microscopes conventionnels, coûterait 0,03 à 0,07 US\$ par test et l'AO peut être achetée aisément. L'examen des parasites colorés par la BCP nécessite d'avoir recours à un microscope à fluorescence.

### Détection d'antigènes parasitaires.

Il existe plusieurs kits commerciaux reposant sur l'immuno-capture d'antigènes parasitaires. Par rapport aux méthodes microscopiques, ces tests permettent d'obtenir un résultat plus rapidement (10 à 15 minutes), nécessitent un entraînement plus limité et ont des performances comparables ou meilleures (132, 133). Deux d'entre eux, le test *ParaSight F*® (Becton Dickinson) et le test ICT Malaria Pf® (ICT Diagnosis) détectent l'antigène HRP-2 (*histidine-rich protein-2*). Ces deux tests sont spécifiques de *Plasmodium falciparum*, ont des performances comparables (136), mais ne permettent pas d'estimer la densité parasitaire.

Le test ICT Malaria Pf/Pv® détecte l'antigène HRP2 de *Plasmodium falciparum* et celui de *Plasmodium vivax*, probablement celui de *Plasmodium ovale*, mais apparemment pas celui de *Plasmodium malariae* (137). La sensibilité de ce dernier test est sensiblement moins bonne pour *Plasmodium vivax* que pour *Plasmodium falciparum* : un résultat négatif ne permet pas d'exclure une parasitémie  $\leq 300/\mu\text{L}$  pour *Plasmodium falciparum* et  $\leq 1\ 500/\mu\text{L}$  pour *Plasmodium vivax* (138).

Les tests peuvent rester positifs quelques jours après une guérison parasitologique à cause de la persistance de l'antigène (139). Le *ParaSight F*® test peut être faussement positif en présence de facteur rhumatoïde (140). Le test ICT doit être conservé à +4°C alors que le test *ParaSight F* peut être stocké à +37°C.

Le test OptiMAL® (DiaMed) détecte la pLDH (lactate-déhydrogénase parasitaire) de *Plasmodium falciparum* d'une part et de l'ensemble des *Plasmodii* humains d'autre part. Il se présente sous la forme d'une bandelette pour un test individuel ou en plaques de 96 puits pour quantifier cet antigène par une méthode immuno-enzymatique. La pLDH disparaît plus rapidement que l'HRP2 après un traitement antipaludique efficace et sa concentration semble varier parallèlement avec la densité parasitaire.

Le coût de ces tests sur bandelette reste cependant encore trop élevé. Alors qu'un prix unitaire de 0,4 US\$ serait considéré comme acceptable pour la plupart des zones d'endémie (132), les prix relevés dans les pays en développement étaient bien supérieurs : 1,5 à 1,8 US\$ pour le test ICT Malaria Pf® (136), 1,2 à 2,25 US\$ pour le test *ParaSight F*® (133,136) et 3 US\$ pour le test OptiMAL® (132).

### QUELLE DEFINITION DE L'ACCES PALUSTRE ?

Nous avons décrit la nature de la relation entre la parasitémie et les manifestations cliniques, les différentes manières d'utiliser la densité parasitaire pour attribuer les épisodes pathologiques au paludisme, l'apport de la clinique dans le diagnostic et les méthodes d'estimation de la parasitémie. Le choix d'une définition de l'accès palustre dépend de nombreux facteurs : l'objectif (clinique, épidémiologique, scientifique), les moyens disponibles (financiers, personnels, matériels), le contexte épidémiologique (transmission rare et saisonnière à transmission élevée et pérenne), le caractère individuel ou communautaire du diagnostic. Il n'y a donc pas de réponse unique et de schéma transposable en toutes circonstances. Chaque situation doit être analysée.

En l'absence de microscopie et de techniques d'estimation de la parasitémie, un algorithme ou des critères cliniques pour le diagnostic du paludisme est généralement possible et utile pour prescrire plus rationnellement les antipaludiques, particulièrement en cas d'augmentation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax*. Leur mise au point et leur validation doivent répondre à des règles rigoureuses. Les travaux menés en Gambie ont un bon exemple de ce qui peut être réalisé (95, 107).

Il a été montré que l'utilisation de la microscopie pouvait être plus rentable que le traitement présomptif des fièvres (141).

Pour faire face au défi lancé par la résistance aux antipaludiques, plusieurs Etats ont décidé d'équiper plus largement leurs structures sanitaires en microscopes (141, 142). Cela peut avoir un impact sur la prise en charge du paludisme, mais aussi d'autres maladies infectieuses comme la tuberculose. Encore faut-il s'assurer que la qualité de la lecture des lames est satisfaisante et que l'utilisation des informations parasitologiques par les cliniciens est adaptée (142). L'intérêt économique et clinique de faire reposer le diagnostic des accès palustres sur l'estimation de la parasitémie deviendra de plus en plus important au fur et à mesure que les traitements deviendront plus chers et parfois plus toxiques. Cet intérêt est certainement plus important dans les zones de faible endémie (142). Dans les centres urbains et/ou pendant les longues périodes de saison sèche, l'absence de détection d'une parasitémie devrait inciter les cliniciens à ne pas traiter par antipaludiques (142). La goutte épaisse colorée au Giemsa ou à l'acridine orange ou les tests de détection des antigènes parasitaires sont alors particulièrement utiles. Les tests sur bandelette sont sensiblement plus chers, mais aussi plus rapides et plus faciles à utiliser. Leur mise en œuvre ne nécessite pas un personnel particulièrement qualifié. Dans les zones d'endémie plus élevée où les infections plasmodiales asymptomatiques sont plus fréquentes, l'utilisation des techniques parasitologiques devrait être ciblée sur les situations cliniques particulières où elles auraient le plus d'influence sur la prise en charge des malades. Ce peut être, par exemple, les patients avec des symptômes persistants malgré un traitement antipaludique, les suspicions de formes graves ou compliquées de paludisme ou les manifestations cliniques qui peuvent être attribuées à plusieurs



causes, dont le paludisme. Le traitement par antipaludique des personnes présentant des signes et de symptômes évocateurs de paludisme reste l'approche la plus raisonnable dans la plupart des situations (142).

Nous avons vu que le seuil pyrogène que nous avons identifié à Dielmo ne pouvait pas être utilisé dans les structures sanitaires des zones de forte endémie à cause de l'hétérogénéité de leur recrutement. Dans une population exposée de façon homogène à la transmission, c'est-à-dire à petite échelle, il est cependant possible d'utiliser un seuil pyrogène ou un seuil diagnostique pour décider sur des critères cliniques et parasitologiques du traitement par antipaludique (18, 20, 54).

Le choix d'une définition des accès palustres est plus facile lorsqu'il s'agit d'estimer l'incidence de la morbidité par paludisme au niveau de populations. La méthode de la fraction attribuable est certainement la plus pratique lorsqu'il n'est pas nécessaire de distinguer les épisodes cliniques individuels. Dans ce cas, il est inutile et inadapté de définir des seuils diagnostiques. La méthode de la fraction attribuable est plus sûre et plus souple, particulièrement dans les zones d'endémie moyenne ou élevée. En zone de faible endémie, un critère associant la détection d'une parasitémie, quel que soit son niveau, avec des manifestations cliniques évocatrices, est souvent le plus adapté. Il est important de tenir compte de l'hétérogénéité de la population. La relation entre la parasitémie et les manifestations cliniques dépend souvent de l'âge dont la prise en compte doit toujours être envisagée. Dans le cadre d'études multicentriques, des différences importantes de critères diagnostiques ou de calcul de la fraction attribuable peuvent exister entre des localités proches de quelques kilomètres (15, 19). L'utilisation de médicaments antipaludiques modifie aussi la relation observée entre parasitémie et manifestations cliniques. Sa prise en compte est rendue particulièrement difficile par l'augmentation de la résistance aux antipaludiques.

Dans les études où il est nécessaire de distinguer chaque accès palustre (15, 18-20, 27, 28, 31, 49, 53, 54), on a généralement recours à des seuils diagnostiques ou à un seuil pyrogène (20), le plus souvent variables avec l'âge et avec le niveau d'endémicité.

**Remerciements** • Nous remercions B. Pradines et T. Fusai pour leur lecture critique et constructive de ce manuscrit. Nous remercions aussi Jean-François Trape et Tom Smith pour les discussions instructives qui nous ont permis d'appréhender cette problématique.

## REFERENCES

- 1 - GRASSI B. - La malaria propagata per mezzo di peculiari insetti. Il nota preliminare. *Rend. Lincei* 1898; **7** : 234-240.
- 2 - ROSS R. - The role of the mosquito in the evolution of the malaria parasite. *Lancet* 1898; **ii** : 488-489.
- 3 - TRAPE J-F., GREENWOOD B. - Approches nouvelles en épidémiologie du paludisme. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités* 1994; **5** : 259-269.
- 4 - SNOW R.W., MENON A., GREENWOOD B.M. - Measuring morbidity from malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1989; **83** : 321-323.
- 5 - NABARRO D.N., TAYLER E.M. - The « Roll Back Malaria » campaign. *Science* 1998; **280** : 2067-2068.
- 6 - WHITE N.J., CHAPMAN D., WATT G. - The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; **86** : 590-597.
- 7 - DELLEY V., BOUVIER P., BRESLOW N. et Coll. - What does a single determination of malaria parasite density mean? A longitudinal survey in Mali. *Trop. Med. Int. Health* 2000; **5** : 404-412.
- 8 - CHERNIN E. - The malariatherapy of neurosyphilis. *J. Parasitol.* 1984; **70** : 611-617.
- 9 - COLLINS W.E., JEFFERY G.M. - A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum* : development of parasitologic and clinical immunity during primary infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **61 Suppl.** : 4-19.
- 10 - COLLINS W.E., JEFFERY G.M. - A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum* : development of parasitologic and clinical immunity following secondary infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **61 Suppl.** : 20-35.
- 11 - COLLINS W.E., JEFFERY G.M. - A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum* in patients previously infected with heterologous species of Plasmodium: effect on development of parasitologic and clinical immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **61 Suppl.** : 36-43.
- 12 - COLLINS W.E., JEFFERY G.M. - A retrospective examination of the patterns of recrudescence in patients infected with *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **61 Suppl.** : 44-48.
- 13 - EARLE W.C., PEREZ M., DEL RIO R., ARZOLA C. - Observations on the course of naturally acquired malaria in Puerto Rico. *Puerto Rico J. Public. Health Trop. Med.* 1939; **14** : 391-406.
- 14 - MILLER M.J. - Observations on the natural history of malaria in the semi-resistant West African. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1958; **79** : 435-442.
- 15 - ROGIER C., TALL A., DIAGNE N. et Coll. - *Plasmodium falciparum* clinical malaria : lessons from longitudinal studies in Senegal. *Parassitologia* 1999; **41** : 255-259.
- 16 - FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIAGNE N. et Coll. - High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; **56** : 247-253.
- 17 - FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIATTA M. et Coll. - Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; **91** : 647-652.
- 18 - TRAPE J-F., ROGIER C., KONATE L. et Coll. - The Dielmo project : a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; **51** : 123-137.
- 19 - ROGIER C., TRAPE J-F. - Etude de l'acquisition de la prémunition en zones d'holo et de mésoendémie palustre à Dielmo et à Ndiop (Sénégal) : résultats préliminaires, 1990-1994. *Med. Trop.* 1995; **55** : 71S-76S.
- 20 - ROGIER C., COMMENGES D., TRAPE J-F. - Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; **54** : 613-619.
- 21 - MCGUINNESS D., KORAM K., BENNETT S. et Coll. - Clinical case definitions for malaria : clinical malaria associated with very low parasite densities in African infants. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; **92** : 527-531.
- 22 - ROTH I., BJORKMAN A. - Fever episodes in a holoendemic malaria area of Tanzania: parasitological and clinical findings and diagnostic aspects related to malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; **86** : 479-482.
- 23 - SMITH T., GENTON B., BAEA K. et Coll. - Relationship between *Plasmodium falciparum* infection and morbidity in a highly endemic area. *Parasitology* 1994; **109** : 539-549.

- 24 - VOUNATSOU P., SMITH T., KITUA A.Y. et Coll. - Apparent tolerance of *Plasmodium falciparum* in infants in a highly endemic area. *Parasitology* 2000; **120** : 1-9.
- 25 - COX M.J., KUM D.E., TAVUL L. et Coll. - Dynamics of malaria parasitaemia associated with febrile illness in children from a rural area of Madang, Papua New Guinea. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; **88** : 191-197.
- 26 - PRYBYLSKI D., KHALIQA., FOX E. et Coll. - Parasite density and malaria morbidity in the Pakistani Punjab. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **61** : 791-801.
- 27 - ROGIER C., LY A.B., TALL A. et Coll. - *Plasmodium falciparum* clinical malaria in Dielmo, a holoendemic area in Senegal : no influence of acquired immunity on initial symptomatology and severity of malaria attacks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **60** : 410-420.
- 28 - TRAPE J.F., ROGIER C. - Efficacy of Spf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Lancet* 1995; **345** : 134-135.
- 29 - GREENWOOD B.M., BRADLEY A.K., GREENWOOD A.M. et Coll. - Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of the Gambia, West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987; **81** : 478-486.
- 30 - PETERSEN E., HOGH B., MARBIAH N.T. et Coll. - Clinical and parasitological studies on malaria in Liberian adults living under intense malaria transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1991; **85** : 577-584.
- 31 - CONTAMIN H., FANDEUR T., ROGIER C. et Coll. - Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; **54** : 632-643.
- 32 - BATE C.A., TAVERNE J., PLAYFAIR J.H. - Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology* 1988; **64** : 227-231.
- 33 - KWIATKOWSKI D., CANNON J.G., MANOGUE K. et Coll. - Tumour necrosis factor production in Falciparum malaria and its association with schizont rupture. *Clin. Exp. Immunol.* 1989; **77** : 361-366.
- 34 - SCRAGG I.G., HENSMANN M., BATE C.A., KWIATKOWSKI D. - Early cytokine induction by *Plasmodium falciparum* is not a classical endotoxin-like process. *Eur. J. Immunol.* 1999; **29** : 2636-2644.
- 35 - MCGUIRE W., D'ALESSANDRO U., STEPHENS S. et Coll. - Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; **92** : 50-53.
- 36 - KWIATKOWSKI D., BATE C.A., SCRAGG I.G. et Coll. - The malarial fever response—pathogenesis, polymorphism and prospects for intervention. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1997; **91** : 533-542.
- 37 - KWIATKOWSKI D., MOLYNEUX M.E., STEPHENS S. et Coll. - Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q. J. Med.* 1993; **86** : 91-98.
- 38 - KWIATKOWSKI D., NOWAK M. - Periodic and chaotic host-parasite interactions in human malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88** : 5111-5113.
- 39 - TAVERNE J., BATE C.A., KWIATKOWSKI D. et Coll. - Two soluble antigens of *Plasmodium falciparum* induce tumor necrosis factor release from macrophages. *Infect. Immun.* 1990; **58** : 2923-2928.
- 40 - PLAYFAIR J.H., TAVERNE J., BATE C.A., DESOUZA J.B. - The malaria vaccine : anti-parasite or anti-disease. *Immunol. Today* 1990; **11** : 25-27.
- 41 - BATE C.A., TAVERNE J., ROMAN E. et Coll. - Tumour necrosis factor induction by malaria exoantigens depends upon phospholipid. *Immunology* 1992; **75** : 129-135.
- 42 - BATE C.A., TAVERNE J., KARUNAWEEERA N.D. et Coll. - Serological relationship of tumor necrosis factor-including exoantigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Infect. Immun.* 1992; **60** : 1241-1243.
- 43 - BATE C.A., TAVERNE J., KWIATKOWSKI D., PLAYFAIR J.H. - Phospholipids coupled to a carrier induce IgG antibody that blocks tumour necrosis factor induction by toxic malaria antigens. *Immunology* 1993; **79** : 138-145.
- 44 - FASAN P.O., LAMBO A.O. - Malaria parasitaemia and body temperature in a semi-immune population in southern Nigeria. *Bull. World Health Organ.* 1969; **41** : 309-311.
- 45 - DELFINI L.F. - The relationship between body temperature and malaria parasitaemia in rural forest areas of Western Nigeria. *J. Trop. Med. Hyg.* 1973; **76** : 111-114.
- 46 - SMITH T., SCHELLENBERG J.R., HAYES R. - Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic areas. *Stat. Med.* 1994; **13** : 2345-2358.
- 47 - ALONZO P.L., SMITH T., SCHELLENBERG J.R. et Coll. - Randomised trial of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Med. Trop.* 1995; **55 Suppl. 4** : 41-46.
- 48 - FARNERT A., SNOUNOU G., ROTH I., BJORKMAN A. - Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; **56** : 538-547.
- 49 - ARIBOT G., ROGIER C., SARTHOU J.L. et Coll. - Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; **54** : 449-457.
- 50 - DIAGNE N., ROGIER C., CISSE B., TRAPE J.F. - Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; **91** : 166-170.
- 51 - DIAGNE N., ROGIER C., SOKHNA C.S. et Coll. - Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period. *N. Engl. J. Med.* 2000; **343** : 598-603.
- 52 - OEUVRAY C., THEISEN M., ROGIER C. et Coll. - Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect. Immun.* 2000; **68** : 2617-2620.
- 53 - ROGIER C., TRAPE J.F. - Malaria attacks in children exposed to high transmission: who is protected ? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; **87** : 245-246.
- 54 - ROGIER C., BRAU R., TALL A. et Coll. - Reducing the oral quinine-quinidine-cinchonin (Quinimax) treatment of uncomplicated malaria to three days does not increase the recurrence of attacks among children living in highly endemic area of Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996; **90** : 175-178.
- 55 - ROUGEMONT A., BRESLOW N., BRENNER E. et Coll. - Epidemiological basis for clinical diagnosis of childhood malaria in endemic zone in West Africa. *Lancet* 1991; **338** : 1292-1295.
- 56 - BOUVIER P., ROUGEMONT A., BRESLOW N. et Coll. - Seasonality and malaria in a west African village : does high parasite density predict fever incidence ? *Am. J. Epidemiol.* 1997; **145** : 850-857.
- 57 - TRAPE J.F., PEELMAN P., MORAULT-PEELMAN B. - Criteria for diagnosing clinical malaria among a semi-immune population exposed to intense and perennial transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985; **79** : 435-442.
- 58 - BAUDON D., GAZIN P., SANOU J.M. - Morbidité palustre en milieu rural au Burkina faso: Etude de 526 cas fébriles. *Med. Afr. Noire* 1986; **33** : 767-776.
- 59 - CHIPPAUX J.P., AKOGBETO M., MASSOUGBODJI A. et Coll. - Mesure de la parasitémie palustre et évaluation du seuil pathogène en région de forte transmission permanente. In « ROBERT V., CHIPPAUX J-P., DIOMANDÉ L. - Le paludisme en Afrique de l'ouest, Etudes entomologiques et épidémiologiques en zone rizicole et en milieu urbain ». ORSTOM ed., Paris, 1991, p.p. 55-65.
- 60 - RICHARD A., LALLEMANT M., TRAPE J-F et Coll. - Le paludisme dans la région forestière de Mayombe, République populaire du Congo III. Place du paludisme dans la morbidité générale. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1988; **68** : 317-29.

- 61 - VELEMA J.P., ALIHONOU E.M., CHIPPAUX J-P. et Coll. - Malaria morbidity and mortality in children under three years of age on the coast of Benin, West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991; **85** : 430-435.
- 62 - GENTON B., AL-YAMAN F., BECK H.P. et Coll. - The epidemiology of malaria in the Wosera area, East Sepik Province, Papua New Guinea, in preparation for vaccine trials. II. Mortality and morbidity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1995; **89** : 377-390.
- 63 - PETERSEN E., HOGH B., MARBIAH N.T. et Coll. - Clinical and parasitological studies on malaria in Liberian adults living under intense malaria transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1991; **85** : 577-584.
- 64 - BENASSENI R., GAZIN P., CARNEVALE P., BAUDON D. - Le paludisme urbain à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). 3. Etude de la morbidité palustre. *Cah. Orstom ser. Ent. Med. Parasitol.* 1987; **25** : 165-170.
- 65 - BAUDON D., GAZIN P., GALAUP B. et Coll. - Fiabilité de l'examen clinique dans le diagnostic des fièvres palustres en zone d'endémie ouest-africaine. *Med. Trop.* 1988; **48** : 123-126.
- 66 - BAUDON D., GALAUP B., OUEDRAOGO L., GAZIN P. - Une étude de la morbidité palustre en milieu hospitalier au Burkina faso (Afrique de l'Ouest). *Med. Trop.* 1988; **48** : 9-13.
- 67 - GAYE O., BAH I.B., DIALLO S. et Coll. - Une étude de la morbidité palustre en milieu rural et urbain au Sénégal. *Med. Trop.* 1989; **49** : 59-62.
- 68 - HENRY M.C., ROGIER C., NZEYIMANA I. et Coll. - Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in the Savannah of Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Health* 2001 (sous presse).
- 69 - WACHOLDER S., MCLAUGHLIN J.K., SILVERMAN D.T., MANDEL J.S. - Selection of controls in case-control studies. I. Principles. *Am. J. Epidemiol.* 1992; **135** : 1019-1028.
- 70 - GENDREL D., KOMBILA M., MARTZ M. et Coll. - Parasitémie au cours des accès palustres à *Plasmodium falciparum* chez l'enfant. *Presse Med.* 1992; **21** : 1805-1808.
- 71 - GAYE O., BAH I.B., BENGUE E. et Coll. - Morbidité palustre en milieu urbain. Etude de 353 accès fébriles. *Med. Trop.* 1989; **49** : 401-404.
- 72 - ARMSTRONG-SHELLENBERG J.R., SMITH T., ALONSO P.L., HAYES R.J. - What is clinical malaria? Finding case definitions for field research in highly endemic areas. *Parasitol. Today* 1994; **10** : 439-442.
- 73 - DABIS F., DRUCKER J., MOREN A. - Epidémiologie d'intervention. Arnette ed., Paris, 1992, 589 p.
- 74 - JENICEK M., CLEROUX R. - Epidémiologie. Principes, Techniques, Applications. Maloine ed., Paris, 1984.
- 75 - ROOTH I., BJORKMAN A. - Suppression of *Plasmodium falciparum* infections during concomitant measles or influenza but not during pertussis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992; **47** : 675-681.
- 76 - HURT N., SMITH T., TANNER M. et Coll. - Evaluation of C-reactive protein and haptoglobin as malaria episode markers in an area of high transmission in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; **88** : 182-186.
- 77 - ALONSO P.L., SMITH T., SHELLENBERG J.R. et Coll. - Randomised trial of efficacy of Spf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 1994; **344** : 1175-1181.
- 78 - BENICHOU J. - Methods of adjustment for estimating the attributable risk in case-control studies: a review. *Stat. Med.* 1991; **10** : 1753-1773.
- 79 - BRUZZI P., GREEN S.B., BYAR D.P. et Coll. - Estimating the population attributable risk for multiple risk factors using case-control data. *Am. J. Epidemiol.* 1985; **122** : 904-914.
- 80 - BENICHOU J., GAIL M.H. - Variance calculations and confidence intervals for estimates of the attributable risk based on logistic models. *Biometrics* 1990; **46** : 991-1003.
- 81 - STIRATELLI R., LAIRD N.M., WARE J.H. - Random-effects models for serial observations with binary response. *Biometrics* 1984; **40** : 961-971.
- 82 - ALONSO P.L., LINDSAY S.W., ARMSTRONG-SHELLENBERG J.R. et Coll. - A malaria control trial using insecticide-treated bed-nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, West Africa. 6. The impact of the interventions on mortality and morbidity from malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; **87 Suppl. 2** : 37-44.
- 83 - BASSETT M.T., TAYLOR P., BVIRAKARE J. et Coll. - Clinical diagnosis of malaria: can we improve? *J. Trop. Med. Hyg.* 1991; **94** : 65-69.
- 84 - SMITH T., HURT N., TEUSCHER T., TANNER M. - Is fever a good sign for clinical malaria in surveys of endemic communities? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; **52** : 306-310.
- 85 - O'HOLAHAN D.R. - Clinical and laboratory presentation of malaria: an analysis of one thousand subjects with malaria parasitaemia. *J. Trop. Med. Hyg.* 1976; **79** : 191-196.
- 86 - LUXEMBURGER C., NOSTEN F., KYLE D.E. et Coll. - Clinical features cannot predict a diagnosis of malaria or differentiate the infecting species in children living in an area of low transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; **92** : 45-49.
- 87 - GBADEGESIN R.A., SODEINDE O., ADEYEMO A.A., ADEMOWO O.G. - Body temperature is a poor predictor of malaria parasitaemia in children with acute diarrhoea. *Ann. Trop. Paediatr.* 1997; **17** : 89-94.
- 88 - SHELLENBERG J.R., GREENWOOD B.M., GOMEZ P. et Coll. - Diurnal variation in body temperature of Gambian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; **88** : 429-431.
- 89 - WORLD HEALTH ORGANISATION - Expert committee on malaria. Eighteenth report. WHO ed., Geneva, 1986, WHO Tech Rep Ser n°375.
- 90 - BAUDON D., ROUX J., CARNEVALE P., REY J.L. et Coll. - Systematic chemotherapy of febrile cases: a substitute strategy for malaria control in rural areas of Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986; **80** : 164
- 91 - BAUDON D., ROUX J., CARNEVALE P., GUIGUEMDE T.R. - La chimiothérapie systématique des accès fébriles: une stratégie de relais dans la lutte contre le paludisme en milieu rural. *Med. Trop.* 1983; **43** : 341-345.
- 92 - SOWUNMI A., AKINDELE J.A. - Presumptive diagnosis of malaria in infants in an endemic area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; **87** : 422
- 93 - OLIVAR M., DEVELOUX M., CHEGOU ABARI A., LOUTAN L. - Presumptive diagnosis of malaria results in a significant risk of mistreatment of children in urban Sahel. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991; **85** : 729-730.
- 94 - ANAND K., KANT S., KUMAR G., KAPOOR S.K. - Clinical case definition of malaria at a secondary level hospital in northern India. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health* 1999; **30**:243-5.
- 95 - OLALEYE B.O., WILLIAMS L.A., D'ALESSANDRO U. et Coll. - Clinical predictors of malaria in Gambian children with fever or a history of fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; **92** : 300-304.
- 96 - GENTON B., SMITH T., BAEA K. et Coll. - Malaria: how useful are clinical criteria for improving the diagnosis in a highly endemic area? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; **88** : 537-541.
- 97 - MUHE L., OLJIRA B., DEGEFU H. et Coll. - Clinical algorithm for malaria during low and high transmission seasons. *Arch. Dis. Child* 1999; **81** : 216-220.
- 98 - RICHENS J., SMITH T., MYLIUS T., SPOONER V. - An algorithm for the clinical differentiation of malaria and typhoid: a preliminary communication. *PNG Med. J.* 1992; **35** : 298-302.
- 99 - REDD S.C., KAZEMBE P.N., LUBY S.P. et Coll. - Clinical algorithm for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Lancet* 1996; **347** : 223-227.
- 100 - PERKINS B.A., ZUCKER J.R., OTIENO J. et Coll. - Evaluation of an algorithm for integrated management of childhood illness in an area of Kenya with high malaria transmission. *Bull. World Health Organ.* 1997; **75 Suppl. 1** : 33-42.
- 101 - WEBER M.W., MULHOLLAND E.K., JAFFAR S. et Coll. - Evaluation of an algorithm for the integrated management of childhood illness in an area with seasonal malaria in the Gambia. *Bull. World Health Organ.* 1997; **75 Suppl. 1** : 25-32.



- 102 - ROUGEMONT A. - Prise en charge rationnelle des problèmes prioritaires de santé; processus décisionnel et consignes permanentes. *Med. Hyg.* 1992; **50** : 2690-2696.
- 103 - VAN DER STUYFT P., MANIRANKUNDA L., DELACOLLETTE C. - L'approche de risque dans le diagnostic du paludisme-maladie en régions d'altitude. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1993; **73** : 81-89.
- 104 - GOMES M., ESPINO F.E., ABAQUIN J. et Coll. - Symptomatic identification of malaria in the home and in the primary health care clinic. *Bull. World Health Organ.* 1994; **72** : 383-390.
- 105 - GOVARDHINI P., MANOHARAN A., SUBRAMANIAN S. et Coll. - Symptomatic diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in field conditions. *Indian J. Malariol.* 1991; **28** : 55-62.
- 106 - REDD S.C., BLOLAND P.B., KAZEMBE P.N. et Coll. - Usefulness of clinical case-definitions in guiding therapy for African children with malaria or pneumonia. *Lancet* 1992; **340** : 1140-1143.
- 107 - BOJANG K.A. - A prospective evaluation of a clinical algorithm for the diagnosis of malaria in gambian children. *Trop. Med. Int. Health* 2000; **5** : 231-236.
- 108 - AKPEDE G.O., ABIODUN P.O., SYKES R.M. - Relative contribution of bacteraemia and malaria to acute fever without localizing signs of infection in under-five children. *J. Trop. Pediatr.* 1992; **38** : 295-298.
- 109 - O'DEMPSEY T.J., McARDLE T.F., LAURENCE B.E. et Coll. - Overlap in the clinical features of pneumonia and malaria in African children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; **87** : 662-665.
- 110 - WALSH J.A., WARREN K.S. - Selective primary health care: an interim strategy for disease control in developing countries. *N. Engl. J. Med.* 1979; **301** : 967-974.
- 111 - WORLD HEALTH ORGANISATION - Acute respiratory infections in children : case management in small hospitals in developing countries. WHO ed., Geneva, 1990, WHO/ARI/90.5. mimeographed document.
- 112 - GILLES H.M., WARRELL D.A. - Bruce-Chwatt's essential malariology. Edward Arnold ed., London, 1993, 340 p.
- 113 - WORLD HEALTH ORGANISATION - Malaria : eighth report of the expert committee. WHO ed., Geneva, 1961, WHO Tech Rep Ser n°243.
- 114 - ZHONG K.J., KAIN K.C. - Evaluation of a colorimetric PCR-based assay to diagnose *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37** : 339-341.
- 115 - CHIPPAUX J.P., MASSOUGBODJI A. - Description d'une méthode simple de mesure de la parasitémie palustre. *Cah. Sante* 1991; **1** : 324.
- 116 - BRUCE-CHWATT L.J. - Essential malariology. Heineman ed., London, 1985.
- 117 - EARLE W.C., PEREZ M. - Enumeration of parasites in the blood of malaria patients. *J. Lab. Clin. Med.* 1932; **17** : 1124-1130.
- 118 - BRUCE-CHWATT L.J. - Evaluation of synthetic anti-malarial drugs in children from a hyperendemic area in West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1951; **44** : 563-592.
- 119 - BRUCE-CHWATT L.J. - Parasite index in malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1958; **52** : 389.
- 120 - SHUTE P.G., MARYON M. - An improved technique for staining malaria parasites with Giemsa stain. *Arch. Roum. Pathol. Microbiol.* 1963; **22** : 887-893.
- 121 - DOWLING M.A., SHUTE G.T. - A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull. World Health Organ.* 1966; **34** : 249-267.
- 122 - TRAPE J.F. - Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985; **79** : 181-184.
- 123 - MOLINEAUX L., GRAMICCIA G. - Le projet Garki. Recherches sur l'épidémiologie du paludisme et la lutte antipaludique dans la savane soudanienne de l'Afrique occidentale. Organisation Mondiale de la Santé ed., Genève, 1980, 354 p.
- 124 - COOSEMANS M., VAN DER STUYFT P., DELACOLLETTE C. - A hundred per cent of fields positive in a thick film : a useful indicator of relative changes in morbidity in areas with seasonal malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1994; **88** : 581-586.
- 125 - GREENWOOD B.M., ARMSTRONG J.R. - Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991; **85** : 186-188.
- 126 - PETERSEN E., MARBIAH N.T., NEW L., GOTTSCHAU A. - Comparison of two methods for enumerating malaria parasites in thick blood films. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; **55** : 485-489.
- 127 - AMBROISE-THOMAS P., MICHEL-BRUN J., DESPEIGNES J. - Identification rapide des parasites sanguicoles par coloration à l'acridine orange et microscopie de fluorescence. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1965; **58** : 639-643.
- 128 - KAWAMOTO F. - Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscopy and interference filter. *Lancet* 1991; **i** : 200-202.
- 129 - BAIRD J.K., PURNOMO, JONES T.R. - Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; **86** : 3-5.
- 130 - RAPHENON G., PARZY D., N'DIHOKUBWAYO J.B., LECAMUS J-L. - Diagnostic parasitologique du paludisme par le QBC: principe, mode d'emploi, applications. *Feuillets Biol.* 1993; **34** : 21-30.
- 131 - MAKLER M.T., RIES L.K., RIES J. et Coll. - Detection of *Plasmodium falciparum* infection with the fluorescent dye benzo-thiocarboxypurine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; **44** : 11-16.
- 132 - MAKLER M.T., PALMER C.J., AGER A.L. - A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1998; **92** : 419-433.
- 133 - CRAIG M.H., SHARP B.L. - Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; **91** : 279-282.
- 134 - LOWE B.S., JEFFA N.K., NEW L. et Coll. - Acridine orange fluorescence techniques as alternatives to traditional Giemsa staining for the diagnosis of malaria in developing countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996; **90** : 34-36.
- 135 - DELACOLLETTE C., VAN DER STUYFT P. - Direct acridine orange staining is not a « miracle » solution to the problem of malaria diagnosis in the field. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; **88** : 187-188.
- 136 - KILIAN A.H., MUGHUSU E.B., KABAGAMBE G., VON SONNENBURG F. - Comparison of two rapid HRP-2 based diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; **91** : 666-667.
- 137 - DYER M.E., TJITRA E., CURRIE B.J., ANSTEY N.M. - Failure of the 'pan-malarial' antibody of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test to detect symptomatic *Plasmodium malariae* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000; **94** : 518.
- 138 - SINGH N., SAXENA A., VALECHA N. - Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v immunochromatographic test for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection in forest villages of Chhindwara, central India. *Trop. Med. Int. Health* 2000; **5** : 765-770.
- 139 - SINGH N., SINGH M.P., SHARMA V.P. - The use of a dipstick antigen-capture assay for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in a remote forested area of central India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; **56** : 188-191.
- 140 - GROBUSCH M.P., ALPERMANN U., SCHWENKE S. et Coll. - False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet* 1999; **353** : 297.
- 141 - JONKMAN A., CHIBWE R.A., KHOROMANA C.O. et Coll. - Cost-saving through microscopy-based versus presumptive diagnosis of malaria in adult outpatients in Malawi. *Bull. WHO* 1995; **73** : 223-227.
- 142 - BARAT L., CHIPIPA J., KOLCZAK M., SUKWA T. - Does the availability of blood slide microscopy for malaria at health centers improve the management of persons with fever in Zambia? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **60** : 1024-1030.