

Protocole type pour la surveillance des délétions des gènes *pfhrp2/pfhrp3*



**Organisation
mondiale de la Santé**

Protocole type pour la surveillance des délétions des gènes *pfhrp2/pfhrp3*



**Organisation
mondiale de la Santé**

Protocole type pour la surveillance des délétions des gènes pfhrp2/pfhrp3 [Surveillance template protocol for *pfhrp2/pfhrp3* gene deletions]

ISBN 978-92-4-000847-2 (version électronique)

ISBN 978-92-4-000848-9 (version imprimée)

© Organisation mondiale de la Santé 2020

Certains droits réservés. La présente publication est disponible sous la licence Creative Commons Attribution – Pas d'utilisation commerciale – Partage dans les mêmes conditions 3.0 IGO (CC BY NC-SA 3.0 IGO ; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>).

Aux termes de cette licence, vous pouvez copier, distribuer et adapter l'œuvre à des fins non commerciales, pour autant que l'œuvre soit citée de manière appropriée, comme il est indiqué ci-dessous. Dans l'utilisation qui sera faite de l'œuvre, quelle qu'elle soit, il ne devra pas être suggéré que l'OMS approuve une organisation, des produits ou des services particuliers. L'utilisation de l'emblème de l'OMS est interdite. Si vous adaptez cette œuvre, vous êtes tenu de diffuser toute nouvelle œuvre sous la même licence Creative Commons ou sous une licence équivalente. Si vous traduisez cette œuvre, il vous est demandé d'ajouter la clause de non responsabilité suivante à la citation suggérée : « La présente traduction n'a pas été établie par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). L'OMS ne saurait être tenue pour responsable du contenu ou de l'exactitude de la présente traduction. L'édition originale anglaise est l'édition authentique qui fait foi ».

Toute médiation relative à un différend survenu dans le cadre de la licence sera menée conformément au Règlement de médiation de l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle.

Citation suggérée. Protocole type pour la surveillance des délétions des gènes *pfhrp2/pfhrp3* [Surveillance template protocol for *pfhrp2/pfhrp3* gene deletions]. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2020. Licence : [CC BY-NC-SA 3.0 IGO](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo).

Catalogage à la source. Disponible à l'adresse <http://apps.who.int/iris>.

Ventes, droits et licences. Pour acheter les publications de l'OMS, voir <http://apps.who.int/bookorders>. Pour soumettre une demande en vue d'un usage commercial ou une demande concernant les droits et licences, voir <http://www.who.int/about/licensing>.

Matériel attribué à des tiers. Si vous souhaitez réutiliser du matériel figurant dans la présente œuvre qui est attribué à un tiers, tel que des tableaux, figures ou images, il vous appartient de déterminer si une permission doit être obtenue pour un tel usage et d'obtenir cette permission du titulaire du droit d'auteur. L'utilisateur s'expose seul au risque de plaintes résultant d'une infraction au droit d'auteur dont est titulaire un tiers sur un élément de la présente œuvre.

Clause générale de non responsabilité. Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'OMS aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les traits discontinus formés d'une succession de points ou de tirets sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'OMS, de préférence à d'autres de nature analogue. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les précautions raisonnables pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'OMS ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

Clause de non-responsabilité

1. Ce protocole type recommandé a été élaboré par l'OMS pour orienter la surveillance des délétions des gènes *pfhrp2/3* dans les pays où le paludisme est endémique ; cependant, l'OMS ne peut être tenue responsable de la réalisation d'études par des tiers adhérant au protocole.
2. Les études réalisées par des tiers appliquant le protocole ne peuvent être considérées comme des « études de l'OMS ». Il convient d'obtenir les approbations adéquates au niveau local et/ou national avant le début de telles études.

Titre	
Site(s) d'étude	Site 1 : Nom, ville, district et province Site 2 : Nom, ville, district et province Site 3 : Nom, ville, district et province <i>(Au besoin, ajouter des sites supplémentaires, ou inclure uniquement les canton/département et joindre une annexe répertoriant les établissements de soins concernés.)</i>
Date de soumission du protocole	jj/mm/aaaa
Numéro de protocole	Numéro de protocole unique/numéro de version
Investigateur principal	Nom : Diplôme : Établissement : Adresse : rue, ville, code postal, pays Tél. : E-mail :
Co-investigateurs (insérer des noms supplémentaires, si nécessaire)	Nom : Diplôme : Établissement : Adresse : rue, ville, code postal, pays Tél. : E-mail :
Établissements participants (au besoin, insérer des établissements supplémentaires)	Nom : Adresse postale complète : rue, ville, code postal, pays Tél. : E-mail :
Dates d'étude prévues	De mm/aaaa à mm/aaaa
Promoteur	Ministère de la Santé, pays Adresse postale complète : rue, ville, code postal, pays Tél. : E-mail :

Résumé du projet

Objectifs de la surveillance	<p>Cette activité de surveillance a pour objet de déterminer si la prévalence locale de mutations des gènes <i>hrp2/3</i> de <i>P. falciparum</i> entraînant des résultats faux négatifs dans les tests de dépistage rapide (TDR) a atteint un seuil susceptible de nécessiter un changement de stratégie de diagnostic au niveau local ou national. Les objectifs spécifiques sont les suivants :</p> <ol style="list-style-type: none">1. Mesurer la prévalence des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 chez les patients symptomatiques atteints d'une infection par <i>P. falciparum</i> détectée par microscopie ou par un TDR du Pf-LDH se rendant dans les établissements de santé publics ;2. Détecter la densité et la fréquence des parasites présentant des délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i> dans cette cohorte ;3. Déterminer la valeur prédictive des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 pour les délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i> dans différents contextes ;4. Identifier les provinces dans lesquelles la prévalence des délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i> entraînant des résultats faux négatifs au TDR de <i>P. falciparum</i> est supérieure ou égale à 5 %, justifiant un changement de TDR.
Site de surveillance	Établissements de santé publics présélectionnés représentant le spectre de transmission et la diversité géographique dans le pays.
Population cible	Personnes atteintes de fièvre cherchant à se faire soigner dans les établissements de santé.
Type d'étude	Transversale, multisites
Mesures des résultats primaires	<ol style="list-style-type: none">1. Prévalence de résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 chez les patients symptomatiques atteints de paludisme à <i>P. falciparum</i>.2. Prévalence des délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i> chez les patients symptomatiques pour <i>falciparum</i> avec un résultat faux négatif au TDR du HRP2.3. Prévalence des délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i> entraînant des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 pour tous les cas symptomatiques de paludisme à <i>P. falciparum</i> confirmés.
Mesures des résultats secondaires (facultatives)	<ol style="list-style-type: none">1. Densité des parasites, telle que mesurée par une PCR quantitative et/ou la microscopie, chez des patients ayant des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2.
Taille de l'échantillon	Un échantillon de 370 cas confirmés de paludisme à <i>P. falciparum</i> par domaine d'échantillonnage (37 par établissement de santé) est recommandé pour déterminer si la prévalence de la délétion du gène <i>pfhrp2</i> est supérieure à 5 % ou pas. Lorsque le nombre de 370 cas de patients atteints de paludisme à <i>P. falciparum</i> a été atteint pour

l'échantillon, il est alors possible de procéder à la confirmation moléculaire des délétions du gène *pfhrp2* chez les personnes infectées par *P. falciparum*.

**Méthode
d'échantillonnage**

Une étude transversale mesurera la prévalence suspectée et confirmée des délétions des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 dans au moins 10 établissements de santé présélectionnés par domaine d'échantillonnage, par exemple des provinces à risque. Il convient d'inclure 37 cas confirmés d'infection par *P. falciparum* dans chaque établissement de santé.

**Collecte des
données**

1. Identifiez les provinces à inclure dans l'étude.
2. Sélectionnez au moins 10 établissements de santé par province pour effectuer le test (la taille de l'échantillon d'établissements peut varier en fonction des contraintes logistiques et budgétaires). Tout établissement utilisant des TDR est éligible et des services de microscopie ne sont pas exigés.
3. Testez toutes les personnes suspectées d'être atteintes de paludisme en utilisant à la fois un TDR du HRP2 recommandé par l'OMS et une méthode non HRP2 (par exemple, un TDR du Pf-LDH [TDR avec une ligne de test unique séparée ou plusieurs lignes de test]) ou une microscopie de qualité garantie dans l'établissement de santé et recueillez au moins deux gouttes de sang séché (GSS).
4. Consignez les informations démographiques et les antécédents cliniques et tous les résultats des tests.
5. Administrez le traitement antipaludéen en fonction des résultats obtenus avec le TDR et/ou la microscopie, et conformément aux directives nationales.
6. Envoyez au moins deux GSS de tous les patients atteints par Pf ayant obtenu un résultat négatif au TDR du HRP2 et un résultat positif au TDR du Pf-LDH ou par microscopie pour l'analyse sérologique et/ou moléculaire¹.
7. L'activité de surveillance peut cesser dès que 370 personnes ayant reçu un diagnostic confirmé de paludisme à *P. falciparum* ont été recrutées lors de l'étape 4 (dans l'idéal ~37/par site dans les 10 sites de la province).
8. Des options supplémentaires pour la collecte de données sont décrites dans l'appendice 1.
9. Éliminez tous les TDR, toutes les lames de microscopie et les GSS après la finalisation et la rédaction du rapport des résultats de l'étude.

¹ L'utilisation des GSS à des fins autres que la surveillance des délétions des gènes *pfhrp2/3* et/ou leur conservation à long terme nécessiterait l'accord/l'assentiment du patient et un examen du protocole par un comité d'éthique.

Plan statistique et analytique

La prévalence de résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 et de délétions des gènes *pfhrp2/3* sera établie au niveau du domaine d'échantillonnage (par exemple, au niveau de la province), avec des intervalles de confiance (IC) à 95 % estimés pour toutes les estimations ponctuelles. Si vous le souhaitez, les estimations ponctuelles et les IC à 95 % peuvent être pondérés en fonction de la taille relative de l'établissement ou des flux de patients. Les différences entre les estimations ponctuelles dans l'ensemble des caractéristiques socio-démographiques et les niveaux de transmission, ou d'autres variables recueillies peuvent être déterminées en utilisant le χ^2 et/ou des régressions logistiques, si cela est souhaité.

1. Contexte et justification

Les kits de test de diagnostic rapide (TDR) offrent d'excellentes possibilités de diagnostic immédiat des infections paludéennes. Un diagnostic rapide permet un traitement en temps et en heure, en particulier en milieu rural. Les TDR sont des tests d'immuno-chromatographie à flux latéral qui détectent les antigènes du parasite *Plasmodium* dans le sang [1]. Trois antigènes sont détectés par les TDR actuels : la protéine riche en histidine 2 (HRP2), la lactatedéshydrogénase (LDH) et l'aldolase. Le HRP2 est une protéine abondante exprimée uniquement par *P. falciparum* et est la cible des TDR les plus communément utilisés. Même si les anticorps sur la bande de test sont prévus pour reconnaître l'antigène HRP2, ils peuvent aussi avoir une réaction croisée avec un autre antigène de la famille des HRP, à savoir le HRP3, en raison des grandes similitudes dans leurs séquences d'acides aminés [2]. Les TDR basés sur le HRP2 ont tendance à être plus sensibles et thermostables que les TDR qui détectent la LDH ou l'aldolase [3].

Alors que les TDR du HRP2 figurent parmi les tests les plus sensibles du paludisme à *P. falciparum* [3], des souches de parasites présentant des délétions dans les gènes codant pour la protéine HRP2 ou la protéine HRP3 similaire ont été récemment identifiées. Les souches présentant les délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* ne peuvent pas être détectées par les TDR du HRP2 [4]. Les TDR du HRP2 peuvent toutefois encore détecter les souches présentant une délétion du *pfhrp2* uniquement, en particulier lors d'infections à haute densité de parasites, en raison d'une réactivité croisée des anticorps avec les épitopes du HRP3 [4]. En 2010, Gamboa *et al.* [5] ont pour la première fois identifié des parasites *P. falciparum* présentant des délétions des gènes *pfhrp2/3* dans le bassin du fleuve Amazone au Pérou. Des analyses rétrospectives ultérieures en différents sites de la région de Loreto de l'Amazonie péruvienne ont montré une augmentation de la prévalence de parasites portant des délétions de gènes entre les spécimens collectés de 1998 à 2001 (20,7 %) et ceux collectés de 2003 à 2005 (40,6 %) [5]. La prévalence de parasites présentant des délétions des gènes *pfhrp2/3* présente une importante variabilité locale. Des études réalisées dans d'autres pays, comme l'Inde [6], le Mali [7], le Honduras [8], le Ghana [9], la Colombie [10, 11] le Myanmar [12], le Suriname [13], le Guyana [8] et le Sénégal [14], ont fourni des estimations inférieures de la prévalence, même si la rigueur des plans des études était variable. Dans des données récemment publiées provenant de l'Érythrée, la prévalence des doubles délétions *pfhrp2* et *pfhrp3* était très élevée (80 %) nécessitant une réponse urgente et un changement de politique pour renoncer à la stratégie de dépistage unique du HRP2 [15]. Aucun rapport n'a fait état de parasites n'exprimant pas la LDH ou l'aldolase, étant donné que ces cibles sont des enzymes essentielles au métabolisme et à la survie du parasite.

Dans les endroits où la microscopie n'est pas disponible ou opérationnelle en raison de contraintes de temps ou de ressources, il est impératif de traiter le paludisme en fonction des résultats des TDR. Il est donc primordial de surveiller l'exactitude des résultats des TDR. Les principales causes de résultats faux négatifs aux TDR sont liées à la qualité et à la performance du produit, aux conditions de conservation ou de transport, à une erreur du technicien ou à une densité de parasites inférieure à la limite de détection. Il faut toutefois tenir compte des délétions des gènes codant pour l'antigène cible [4]. Pour éviter toute crise comme celle qui s'est produite en Érythrée en 2016, l'OMS recommande aux pays dans lesquels sont signalées des délétions des gènes *pfhrp2/3*, ainsi qu'aux pays voisins, de surveiller les délétions des gènes *pfhrp2/3* en particulier chez les patients symptomatiques [3].

À ces fins, l'objet du présent document est de présenter une approche standard pour la surveillance des délétions des gènes *pfhrp2/3* cliniquement significatives dans les pays où *P. falciparum* est endémique. Les méthodes qui sont ici présentées peuvent être utilisées pour cartographier la répartition de ces délétions, estimer la valeur prédictive des résultats faux négatifs suspectés au TDR

du HRP2 pour la délétion des gènes et identifier les zones où il n'est pas nécessaire de changer de stratégie.

2. Objectifs de l'étude

Cette étude a pour objet de déterminer si la prévalence locale des délétions des gènes *hrp2/3* de *P. falciparum* entraînant des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 chez les patients symptomatiques pour *falciparum* a atteint un seuil susceptible de nécessiter un changement de TDR pour le paludisme à l'échelle nationale ou infranationale. Les objectifs spécifiques sont les suivants :

1. Mesurer la prévalence des délétions suspectées des gènes *pfhrp2/pfhrp3* chez les patients symptomatiques pour *falciparum* se rendant dans les établissements de santé publics.
2. Détecter la densité et la fréquence des parasites présentant des délétions des gènes *pfhrp2/3* dans cette cohorte.
3. Déterminer la valeur prédictive des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 pour les délétions des gènes *pfhrp2/3* dans différents contextes.
4. Identifier les provinces où la prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* est supérieure ou égale à 5 % dans cette cohorte, étant donné que cela révèle la nécessité de ne plus utiliser exclusivement les TDR basés sur le HRP2 pour détecter *P. falciparum*.

3. Site(s) de l'étude/population cible

Cette activité de surveillance se focalisera sur les personnes cherchant à se faire soigner pour un paludisme à *P. falciparum* confirmé par un TDR ou par microscopie dans des établissements de santé publics. Des résultats négatifs au TDR du HRP2, avec des résultats positifs pour Pf au TDR du Pf-LDH ou par microscopie indiquent la possibilité de délétions des gènes *pfhrp2/3* pour expliquer le résultat faux négatif. Étant donné l'importance du dépistage du HRP2 pour la stratégie de diagnostic, l'OMS invite les pays à risque à évaluer la prévalence de telles délétions de gènes chez *P. falciparum*. Les régions où la surveillance doit être prioritaire sont celles i) qui présentent une discordance reconnue entre les résultats au TDR du HRP2 et ceux de la microscopie, ii) où des rapports ont signalé des cas non représentatifs ou sporadiques de délétions des gènes *pfhrp2/3* dans le pays, et iii) qui avoisinent celles où des délétions fréquentes des gènes *pfhrp2/3* ont été identifiées. Ces pays doivent inclure des établissements de santé publics dans toutes les provinces à transmission du paludisme à *P. falciparum*. Les établissements éligibles pour une inclusion dans l'étude devraient dans l'idéal représenter la propagation géographique de la transmission du paludisme dans l'ensemble de la province.

3.1 Critères d'inclusion

- Satisfaire la définition de cas suspectés de paludisme.

3.2 Critères d'exclusion

- Avoir auparavant participé à l'étude.

4. Méthodes de surveillance

4.1 Plan

Un plan d'étude transversal sera utilisé pour mesurer les résultats primaires. Les établissements de santé appliqueront systématiquement aux cas suspectés de paludisme un TDR du HRP2 et une autre méthode (TDR du Pf-LDH ou microscopie) et recueilleront aux moins deux GSS. Le résultat principal 1 sera la fréquence de résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 chez les patients symptomatiques atteints de paludisme à *P. falciparum*. Un test moléculaire des GSS provenant des personnes présentant des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 déterminera la prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* dans la cohorte des faux négatifs au TDR du HRP2 (résultat 2) et dans la cohorte de tous les cas symptomatiques de paludisme à *P. falciparum* confirmés (résultat 3).

4.2 Indicateurs de résultats primaires

Les indicateurs suivants feront office de résultats primaires de l'étude :

1. Prévalence des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 (c'est-à-dire les résultats négatifs au TDR du HRP2, mais positifs au TDR du Pf-LDH ou positifs pour Pf à la microscopie et à la PCR) chez les patients symptomatiques atteints de paludisme à *P. falciparum*.
2. Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* chez les patients symptomatiques pour *falciparum* avec un résultat faux négatif au TDR du HRP2.
3. Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 chez tous les cas symptomatiques à *P. falciparum* confirmés.

L'étude identifiera la proportion de patients présentant des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 au moyen de tests de diagnostic de routine dans les établissements de santé utilisant le test à double méthode (TDR du HRP2 plus microscopie ou TDR du pf-LDH²). Afin d'économiser du temps et des ressources, des tests moléculaires et/ou sérologiques visant à confirmer une infection par *P. falciparum* et à identifier des délétions des gènes *pfhrp2/3* seront uniquement réalisés sur les GSS recueillies sur des personnes ayant obtenu des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2. Des résultats diagnostiques discordants peuvent être dus à d'autres facteurs, comme des lignes de test faux positifs pour le Pf-LDH (possiblement dues à une réactivité croisée avec des espèces autres que *falciparum*) ou de faibles densités inférieures ou égales à la limite de détection des TDR du HRP2 et du Pf-LDH. De plus, il existe plusieurs cas où cet indicateur peut ne pas reconnaître une vraie délétion des gènes *pfhrp2/3* (voir le tableau 3 ci-dessous). En premier lieu, les personnes ne seront pas détectées si leur infection est à faible densité non décelée par le TDR du Pf-LDH ou la microscopie, ni par le TDR du HRP2 en raison de délétions des gènes *pfhrp2/3*. En deuxième lieu, le TDR du HRP2 peut encore détecter certaines infections en présence d'une délétion du gène *pfhrp2* en raison d'une réactivité croisée des anticorps avec le HRP3. Enfin, le protocole de test ne détectera pas les délétions des gènes *pfhrp2/3* chez des patients co-infectés par des clones exprimant le HRP2 à moins d'utiliser de nouvelles techniques telles que le séquençage en profondeur et la PCR numérique. Cela explique pourquoi cet indicateur représente la limite inférieure de la réelle prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3*.

² Les TDR utilisés devraient contenir des lignes de test spécifiques pour le Pf-LDH et non des lignes de test pour le pan-pLDH. Cela garantira que seules les infections à *P. falciparum* seront détectées et évitera l'identification des espèces autres que *falciparum* (Pv, Pm, Po), ce qui pourrait entraîner des résultats discordants (négatifs pour le HRP2, positifs pour le pan-pLDH).

4.3 Indicateurs de résultats secondaires (facultatifs)

1. Densité des parasites, telle que mesurée par une PCR quantitative et/ou la microscopie, chez des patients ayant des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2.

4.4 Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon dépend de la volonté d'obtenir des estimations relativement précises des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 provoqués par des délétions des gènes *pfhrp2/3* au niveau du domaine de l'étude (province, état ou similaire) au sein des pays appliquant ce protocole. Les estimations de la taille de l'échantillon sont fondées sur une proportion obtenue à partir d'un échantillonnage simple aléatoire, avec un effet du plan de sondage (EPS) = 1,5 (pour tenir compte des observations corrélées dans les cliniques vis-à-vis des délétions des gènes *pfhrp2/3*) et une probabilité d'erreur de type 1 = 95 % (test unilatéral), de sorte que l'intervalle de confiance à 95 % ne chevauche pas le seuil de 5 %. À noter qu'un effet du plan différent de 1,5 peut être utilisé s'il existe des données sur les gènes *pfhrp2/3* (ou d'autres résultats pertinents) et que ces données peuvent être utilisées pour estimer un effet du plan.

$$n \geq \text{def} \left[\frac{Z^2(P)(1-P)}{D^2} \right]$$

La taille de l'échantillon est fondée sur l'estimation des indicateurs de résultats 1 et 2³, où la limite supérieure de l'IC à 95 % ne chevauche pas le seuil de 5 % pour les estimations dans lesquelles la prévalence observée des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 résultant des délétions des gènes *pfhrp2/3* est inférieure à 5 % (indiquant que le niveau observé des délétions des gènes *pfhrp2/3* est inférieur à 5 % avec un intervalle de confiance à 95 %), et où la limite inférieure de l'IC à 95 % ne chevauche pas le seuil de 5 % pour les estimations dans lesquelles la prévalence observée est supérieure à 5 % (indiquant que le niveau observé des délétions des gènes *pfhrp2/3* est supérieure à 5 % avec un intervalle de confiance à 95 %).

Lors de l'analyse statistique, les établissements de santé devraient être inclus comme un effet aléatoire de sorte que les estimations de la prévalence et les IC à 95 % soient ajustées en termes de variabilité dans la probabilité de trouver un cas de paludisme dans un établissement de santé.

Pour démontrer que la prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* (entraînant des résultats faux négatifs aux TDR) chez les patients symptomatiques infectés par *P. falciparum* est inférieure ou égale à 5 %, il convient de prendre une taille d'échantillon fondée sur une prévalence attendue dans la population de 3,2 % (n = 370) ou de 8 % (n = 318), respectivement, par domaine d'échantillonnage. Par conséquent, d'après la formule ci-dessus une taille d'échantillon d'au minimum 370 personnes infectées par *P. falciparum* par domaine d'échantillonnage (par exemple, la province) est recommandée (37 personnes par établissement de santé, 10 établissements de santé par domaine d'échantillonnage). Au sein du domaine, il convient de sélectionner les établissements de santé d'après une probabilité proportionnelle à la taille en fonction du nombre de cas de fièvre ou de suspicion de paludisme.

Au fur et à mesure que la prévalence des délétions du *pfhrp2* s'approche du seuil de 5 %, pour déterminer si elle est en dessous ou au-dessus du seuil, il faut disposer d'un échantillon de taille de plus en plus grande, jusqu'à atteindre la taille d'échantillon maximale de plus de 30 000 cas de

³ Proportion de tous les patients atteints de paludisme à *P. falciparum* qui présentent des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 (positifs au TDR du Pf-LDH ou à la microscopie et négatifs aux tests du HRP2) ; proportion de tous les patients atteints de paludisme à *P. falciparum* qui obtiennent des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 et qui présentent des délétions des gènes *pfhrp2/3*.

paludisme à *P. falciparum* par domaine lorsqu'une estimation est faite à 5 % +/- 0,2 %, d'après la formule ci-dessus.

Ainsi, il est d'abord recommandé de réaliser une étude sur un échantillon de 370 personnes par domaine. Il convient de réaliser une analyse moléculaire sur des échantillons de GSS pour déceler les délétions des gènes *pfhrp2/3* et de faire une analyse statistique de la prévalence avec un IC de 95 %. L'analyse donnera l'un des trois résultats suivants par province :

Résultat 1 : la proportion estimée est inférieure à 5 % et la limite supérieure de l'IC à 95 % est en dessous de 5 %. Dans ce cas, il existe une probabilité statistique élevée que la proportion de parasites présentant des délétions des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 chez des patients symptomatiques pour Pf soit inférieure à 5 %.

Résultat 2 : la proportion estimée est supérieure à 5 % et la limite inférieure de l'IC à 95 % est au-dessus de 5 %. Ce résultat indique qu'il existe une probabilité statistique élevée que la proportion de parasites présentant des délétions des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR chez des patients symptomatiques pour Pf soit supérieure à 5 %.

Résultat 3 : l'analyse statistique montre qu'il n'est pas possible de conclure (5 % contenus dans l'IC à 95 %) si la prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR chez les patients symptomatiques pour Pf est supérieure ou inférieure à 5 %.

4.5 Échantillonnage

En général, dans chaque province, il convient de sélectionner un échantillon aléatoire systématique d'au moins 10 établissements de santé au sein d'une liste complète de l'ensemble des établissements, de le stratifier par type d'établissement et d'inclure une mesure de la taille de l'établissement (par exemple, nombre de patients en ambulatoire atteints de fièvre ou suspectés d'être atteints de paludisme examinés dans l'établissement de santé lors d'un mois moyen). Pour chaque province, il convient de sélectionner les établissements en fonction de la taille relative de chaque établissement, de manière à fonder l'échantillonnage sur une probabilité proportionnelle à la taille (PPT). Si le budget le permet, on peut inclure plus de 10 établissements de santé par province pour recruter les personnes de l'échantillon requis, ce qui augmentera la précision de l'estimation et diminuera le laps de temps nécessaire pour satisfaire les objectifs de recrutement.

4.6 Collecte des données et travail de terrain

Il convient de suivre les étapes suivantes pour la collecte des données. **[À noter qu'il sera nécessaire pour chaque pays d'élaborer un mode opératoire normalisé (MON) pour adapter ces étapes à leur contexte et à leurs besoins particuliers].**

1. Le Programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) devrait identifier les provinces à étudier. Il convient de fonder cette sélection sur une évaluation des provinces qui sont le plus à risque de présenter des délétions des gènes *pfhrp2/3* (voir la section 3). Les provinces où la transmission faible, modérée ou élevée devraient être prises en compte, tandis que celles où l'on n'observe aucune transmission du paludisme devraient être omises. Les tailles d'échantillon peuvent être obtenues plus rapidement dans les régions à transmission modérée à élevée ; toutefois, la prévalence plus élevée attendue d'infections multiclonales peut masquer la présence de parasites avec des délétions de gènes *pfhrp2/3*. Cela surviendrait moins probablement dans des régions à faible transmission.

2. Sélectionnez un nombre donné d'établissements de santé publics (au minimum 10) dans chaque province du pays utilisant régulièrement des TDR du paludisme pour les inclure dans l'étude.
 - Le nombre d'établissements par province à inclure dans l'échantillon devrait tenir compte du nombre moyen attendu de patients suspectés d'être atteints de paludisme examinés chaque semaine dans l'établissement et du taux moyen de positivité au test dans la région cible afin de déterminer le nombre attendu de cas positifs chaque semaine. En règle générale, le but est de finir le travail de terrain et d'obtenir une taille d'échantillon minimale de 370 cas positifs au cours d'une période de 8 semaines.
 - Il convient de sélectionner les établissements de santé à inclure dans l'échantillon parmi une liste complète (base d'échantillonnage) d'établissements de santé dans chaque province, en faisant appel à un échantillonnage aléatoire systématique fondé sur la PPT [17] (et proportionnel à la taille des strates de types d'établissement dans chaque domaine). La base d'échantillonnage doit inclure une estimation de la taille (nombre de cas de fièvre ou de suspicion de paludisme) et du type d'établissement (par exemple public, privé, niveau, etc.).
 - *À noter que si des contraintes budgétaires ou logistiques empêchent la sélection et l'inclusion d'établissements par un échantillonnage aléatoire, il est possible d'utiliser un échantillon d'établissements déterminé (ou de commodité). Cependant, il convient alors de noter que les estimations au niveau de la province des délétions des gènes pfhrp2/3 ne seront pas statistiquement représentatives de la province.*
3. Les patients sont triés conformément aux procédures normales. Tout patient suspecté par le prestataire de soins courants (par exemple, un médecin ou une infirmière) d'être atteint de paludisme conformément aux directives nationales, sera testé selon le mode d'emploi du fabricant par deux TDR séparés, y compris le TDR du HRP2 utilisé dans le programme national de lutte contre le paludisme et un TDR du Pf-LDH ou le TDR du HRP2 utilisé dans le programme national de lutte contre le paludisme et la microscopie de qualité garantie disponible dans l'établissement de santé.
 - Le TDR du HRP2 doit satisfaire les critères d'approvisionnement de l'OMS et son utilisation doit être approuvée par le Ministère de la santé. Ce doit être le type généralement utilisé par le PNLP pour le diagnostic du paludisme, conformément aux directives nationales.
 - Un TDR du Pf-LDH satisfaisant les critères d'approvisionnement de l'OMS (tableau 1) ou la microscopie doivent être utilisés pour le diagnostic secondaire. Il n'existe actuellement aucun TDR satisfaisant les critères de performance de l'OMS pour la détection de *P. falciparum* fondé uniquement sur la ligne de test du pf-LDH. [16] ; par conséquent, aux fins de l'étude, les pays peuvent choisir exceptionnellement des TDR à base du Pf-LDH qui i) ont été évalués par des tests de l'OMS portant sur les produits de TDR pour le paludisme, ii) satisfont les critères de performance pour la détection de *P. falciparum* exprimant le HRP2 et iii) ont un PDS >90 à 2 000 p/μL et des taux de faux positifs et de non valides < 2% (voir le tableau 1).

- S'il faut faire appel à la microscopie, préparez un film de sang mince et un film de sang épais selon les directives nationales alignées avec les MON de l'OMS pour la microscopie pour le paludisme⁴.

⁴ http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/mm_sop/en/

TABLEAU 1.

Options de TDR non basés sur le HRP2 pouvant être utilisées pour l'étude et leurs caractéristiques de performance correspondantes d'après les séries 1 à 8 de tests de produits de TDR de l'OMS pour le paludisme

Critères de performance (surlignés en vert si satisfaits) :

A : Score de détection sur panel (PDS) de *P. falciparum*^a ≥ 75 % à 200 parasites/μL

B : Score de détection sur panel (PDS) de *P. vivax*^a ≥ 75 % à 200 parasites/μL

C : Taux de faux positifs (FP) par rapport aux vrais négatifs < 10 %

D : Taux de non valides (TNV) < 5 %

E : Score de détection sur panel (PDS) de *P. falciparum* négatif pour le *pfhrp2* > 75 % à 200 parasites/uL (dans les zones où les délétions du *pfhrp2* sont prévalentes)

			Panels à <i>P. falciparum</i> exprimant le HRP2 et négatifs pour <i>P. Vivax</i> et le paludisme					Panel à <i>P. falciparum</i> n'exprimant par le HRP2				
Produit		Fabricant	PDS*	FP		IR	Satisfait aux critères d'approvisionnement de l'OMS ^h	PDS		Satisfait aux critères d'approvisionnement de l'OMS pour la détection de <i>P. falciparum</i> avec des délétions <i>pfhrp2/3</i> ^k	Applicable pour une utilisation avec le TDR du HRP2 en tant qu'outil de dépistage pour les études portant sur les études des délétions du gène <i>pfhrp2</i> ^l	Série
			A ^b	B ^c	C ^d	D ^e		E ⁱ	Pf à) 2 000 p/μL ^j			
Pf uniquement												
CareStart™ Malaria Pf (HRP2/pLDH) Ag Combo 3-line RDT ^f	RMSM-02571	Access Bio Inc.	82 (81/40) ^f	S.O.	0,5	0,0	Non (non préqualifié par l'OMS)	12,5 (0/12,5) ^f	100	Non	Oui	8
SD BIOLINE Malaria Ag P.f (HRP2/pLDH) ^f	05FK90	Standard Diagnostics Inc. (Alere)	90 (88/71) ^f	S.O.	0,0	0,1	Oui ^g	32,5 (0/32,5) ^f	100	Non	Oui	8
Pf, Pf et Pv												
SD BIOLINE Malaria Ag P.f/P.f/P.v ^f	05FK120	Standard Diagnostics Inc. (Alere)	89 (89/62) ^f	97,1	0,0	0,0	Oui ^g	20 (0/20) ^f	100	Non	Oui	8

NC– non connu ; Pf, *Plasmodium falciparum* ; Pv, *Plasmodium vivax*

a - Un échantillon est considéré comme étant détecté uniquement si tous les TDR des deux lots analysés par le premier technicien, à une vitesse d'analyse minimale donnée, sont positifs

b - Série 1, n=79 ; Série 2, n=100 ; Série 3, n=99 ; Série 4, n=98 ; Série 5, n=100 ; Série 6, n=100 ; Série 7, n=100 ; Série 8, n=100

c - Série 1, n=20 ; Série 2, n=40 ; Série 3, n=35 ; Série 4, n=34 ; Série 5, n=35 ; Série 6, n=35 ; Série 7, n=35 ; Série 8, n=35

d - Série 1, n=168 ; Série 2, n=200 ; Série 3, n=200 ; Série 4, n=232 ; Série 5, n=236 ; Série 6, n=208 ; Série 7, n=220 ; Série 8, n=208

e - Série 1, n=954 ; Série 2, n=1 240 ; Série 3, n=1 204 ; Série 4, n=1 192 ; Série 5, n=1 214 ; Série 6, n=1 210 ; Série 7, n=1 210 ; Série 8, n=1 210

f - Le PDS présenté dans le tableau est fondé sur une ligne de test positive pour Pf (soit HRP2 soit Pf-LDH). Les résultats entre parenthèses correspondent au PDS seul pour les lignes de test du PDS et du Pf-LDH, respectivement.

g - Indique un produit préqualifié par l'OMS (en date du 15 février 2019), voir les mises à jour à l'adresse : https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/malaria/public_report/en/

h- <https://www.who.int/malaria/news/2019/rdt-procurement-criteria/en/>

i - Série 8, n = 40 (18 doubles délétions : *pfhrp2*-/*pfhrp3* - ; 22 délétions simples ; *pfhrp2*-/*pfhrp3*+)

j - Résultats (PDS) d'une évaluation ponctuelle des TDR de la série 8 contenant du pfLDH par rapport au panel négatif pour le HRP2 à haute densité : n = 40 (18 doubles délétions : *pfhrp2*-/*pfhrp3* - ; 22 délétions simples ; *pfhrp2*-/*pfhrp3*+)

k - Ces résultats doivent être pris en compte au moment d'effectuer l'approvisionnement en TDR dans les zones où les délétions du *pfhrp2* et/ou du *pfhrp3* sont prévalentes.

l - Des TDR incluant des lignes de test individuelles du pf-LDH ayant un PDS >90 % par rapport aux échantillons de parasites avec une délétion du *pfhrp2* de 2 000 parasites/μL peuvent être utilisés pour déceler des délétions du *pfhrp2* conformément au présent protocole type d'étude de l'OMS.

4. Pendant la période d'étude, outre le renseignement habituel du registre de l'établissement de soins, le prestataire de soins traitant devrait remplir la fiche de pointage de l'établissement de l'étude (appendice 2) dans laquelle tous les résultats des cas suspectés de paludisme sont consignés par ordre chronologique.

Ces informations sont uniquement utilisées pour montrer le moment où la taille d'échantillon requise de cas de paludisme confirmés à *P. falciparum* est atteinte (par exemple, 37).

- Pour chaque cas suspecté de paludisme, le prestataire de soins remplit un formulaire pré-étiqueté de rapport de cas de l'étude, par ordre chronologique (appendice 3), l'agent de santé consigne les réponses aux questions de routine, notamment l'âge, le sexe, les antécédents récents de tests de diagnostic du paludisme, le traitement et les déplacements.
 - À l'aide des étiquettes jointes au formulaire de rapport de cas de l'étude (portant le même numéro d'ID que le formulaire), l'agent de santé étiquettera 2 TDR différents ou 1 TDR et une lame de microscopie et au minimum une GSS de tous les cas suspectés de paludisme. Il réalise les tests, consigne les résultats sur le formulaire de rapport de l'étude (appendice 3) et communique les résultats au patient, administre un traitement en cas de résultats de test positifs au TDR primaire ou secondaire, ou à la microscopie conformément aux directives nationales. Les résultats de l'un ou l'autre TDR doivent être suivis d'effet étant donné que les deux sont préqualifiés par l'OMS. De plus, la microscopie est aussi considérée comme une alternative acceptable aux TDR du paludisme. Les résultats négatifs au TDR doivent être traités conformément aux directives nationales.
 - Une divergence entre les TDR ou entre un TDR et la microscopie peut survenir pour plusieurs raisons, mais s'explique le plus souvent par les limites de détection variables entre les TDR et la microscopie, des lectures variables (les TDR peuvent produire des lignes de test plus ou moins claires ou foncées) ou une compétence variable des opérateurs (surtout pour la microscopie).
5. Tous les TDR utilisés et, le cas échéant, les lames de microscopie de chaque cas suspecté de paludisme seront conservés jusqu'au terme de l'étude dans un endroit sec et protégé, à des fins de contrôle qualité de routine.
 6. Les deux GSS au moins (50 µL par goutte) sur papier filtre ou un papier de transfert de protéines devraient être conservées dans un endroit propre, sec et protégé, et laissées sécher pendant 24 heures.
 - Après le séchage, le papier filtre est placé avec le dessiccant (provenant du paquet du TDR) dans un sachet en plastique imperméable. (Étiquetez le sachet avec une ID de l'étude si cette dernière n'a pas été directement collée).
 7. Après obtention de la taille d'échantillon souhaitée de personnes infectées dans chaque établissement, les formulaires de l'étude et les TDR et GSS correspondants doivent être regroupés et adressés au centre de coordination centralisée. Aucun nom ou information d'identification unique ne doit apparaître dans les formulaires de rapport de cas de l'étude, les fiches de pointage, les TDR ou les GSS.
 8. À réception des formulaires/TDR/GSS, le superviseur de l'équipe de l'étude doit examiner la section des résultats des TDR du formulaire de rapport (appendice 3, section 7), déterminer quelles GSS envoyer en vue d'une analyse moléculaire, spécifiquement, les résultats négatifs au

TDR du HRP2 et les résultats positifs pour le pf-LDH ou la microscopie et peut-être un sous-ensemble des résultats positifs pour le HRP2 (voir données supplémentaires), et lesquels éliminer (tous les résultats négatifs des TDR et les TDR positifs non PF et tous les [ou certains des] résultats positifs au TDR du HRP2).

- a. En fonction du nombre de résultats discordants entre les TDR ou le TDR et la microscopie, il est possible de calculer la proportion de cas à *P. falciparum* ayant obtenu des résultats faux négatifs au TDR du HRP2 (indiquant une possible délétion des gènes *pfhrp2/3*) dans l'établissement ou la province à l'aide de la formule ci-dessous.

$$\begin{array}{lcl} \text{Proportion de cas à } P. \textit{falciparum} & & \text{Nombre de cas présentant des résultats de TDR ou de} \\ \text{avec une suspicion de} & = & \text{TDR-microscopie discordants} \\ \text{délétion des gènes } pfhrp2/3 & & \hline & & \text{Nombre de cas à } P. \textit{falciparum} \text{ confirmés (par TDR ou} \\ & & \text{microscopie)} \end{array}$$

9. Conditionnez et expédiez les formulaires de rapport de l'étude et les GSS correspondantes (2 au minimum) pour les tests de confirmation de *P. falciparum* et l'analyse moléculaire et/ou sérologique pour les délétions des gènes *pfhrp2/3*.
 - a. Il est nécessaire d'obtenir la confirmation moléculaire des délétions des gènes *pfhrp2/3* susceptibles d'engendrer des résultats faux négatifs du TDR pour s'assurer que les résultats discordants ne s'expliquent pas autrement que par des délétions des gènes *pfhrp2/3*. Ces autres raisons sont une erreur de l'opérateur, des lignes de tests du Pf-LDH faux positifs, des résultats faux positifs à la microscopie ou des échantillons à la limite de détection des TDR, qui peuvent parfois réagir suffisamment pour donner lieu à une ligne de test faux positif, mais pas toujours. La contribution de ces autres causes de résultats discordants est variable.
 - b. La confirmation sérologique des délétions des gènes *pfhrp2/3* peut aussi être obtenue à l'aide de tests immunologiques, en particulier sur des échantillons où les résultats du TDR et de la PCR sont discordants.
10. Lorsque l'on connaît le vrai nombre de cas de délétions des gènes *pfhrp2/3* qui donnent lieu à des résultats faux négatifs au TDR du HRP2, il est possible alors de calculer le résultat primaire de l'étude pour chaque domaine d'échantillonnage, par exemple une province.

$$\begin{array}{lcl} \text{Proportion de cas à } P. \textit{falciparum} & & \text{Nombre de patients à } P. \textit{falciparum} \text{ confirmés avec des délétions des} \\ \text{avec des résultats faux négatifs} & = & \text{gènes } pfhrp2/3 \text{ et ayant obtenu des résultats négatifs au TDR du HRP2} \\ \text{au TDR du HRP2 dus à des délétions} & & \hline \text{des gènes } pfhrp2/3 & & \text{Nombre de cas à } P. \textit{falciparum} \text{ confirmés (par TDR ou} \\ & & \text{microscopie)} \end{array}$$

11. L'analyse statistique de la proportion calculée à l'étape 10 ci-dessus inclut le calcul des résultats correspondants avec un IC à 95 %. L'analyse donnera l'un des trois résultats suivants par province :
 - a. **Résultat 1** : la proportion estimée est inférieure à 5 % et la limite supérieure de l'IC à 95 % est en dessous de 5 %. Dans ce cas, il existe une probabilité statistique élevée que la proportion de parasites présentant une délétion des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR chez des patients symptomatiques soit inférieure à 5 %.

- b. **Résultat 2** : la proportion estimée est supérieure à 5 % et la limite inférieure de l'IC à 95 % est au-dessus de 5 %. Ce résultat indique qu'il existe une probabilité statistique élevée que la proportion des délétions des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR chez des patients symptomatiques pour Pf soit supérieure à 5 %.
 - c. **Résultat 3** : l'analyse statistique montre qu'il n'est pas possible de conclure (5 % contenus dans l'IC à 95 %) si la prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR chez les patients symptomatiques pour Pf est supérieure ou inférieure à 5 %.
12. Si, dans une quelconque province, le résultat 2 est obtenu, les délétions du gène *pfhrp2* sont prévalentes (IC à 95 % inférieur > 5 %), et les programmes du pays devraient adopter, à l'échelle du pays, des TDR qui ne se fient pas exclusivement au HRP2 pour dépister *P. falciparum*, la priorité étant fondée sur la prévalence des délétions du gène *pfhrp2* dans l'ensemble des provinces.
- a. On a choisi un seuil de 5 %, car c'est environ aux alentours de ce seuil que la proportion de cas non décelés par les TDR du HRP2, en raison de la non-expression du *hrp2*, peut être supérieure au nombre de cas qui ne seraient pas décelés par des TDR à base du pLDH moins sensibles.
 - b. Il est suggéré d'opérer un changement à l'échelle du pays, car les modèles mathématiques montrent que les parasites dépourvus du gène *pfhrp2* se propageront⁵ sous la pression du TDR du HRP2 uniquement, et l'utilisation de plusieurs TDR dans un pays peut compliquer les pratiques d'approvisionnement et de formation.
13. Si le résultat 1 est obtenu dans toutes les provinces, il est recommandé à ce pays d'établir un mécanisme de suivi selon lequel cette étude sera de nouveau réalisée deux ans plus tard.
14. Si le résultat 3 est obtenu dans une ou plusieurs provinces, ce pays dispose de plusieurs options en fonction des ressources disponibles :
- a. établir un mécanisme de suivi selon lequel cette étude sera de nouveau réalisée deux ans plus tard (comme avec le résultat 1) ; ou
 - b. réaliser de nouveau l'étude une année plus tard ;
 - c. continuer à dépister les patients pour obtenir un échantillon plus grand qui permettra d'obtenir une mesure plus précise de la réelle prévalence de la délétion du gène *pfhrp2*. Le tableau 2 présente des tailles d'échantillon pour déterminer si la réelle prévalence de la délétion du gène *pfhrp2* est supérieure ou inférieure au seuil de 5 % au niveau du domaine de l'étude (par exemple, une province).

⁵ Gatton ML, Dunn J, Chaudhry A, Ciketic S, Cunningham J, Cheng Q. Use of PfHRP2-only RDTs rapidly selects for PfHRP2-negative parasites, with serious implications for malaria case management and control. J Infect Dis. 2017. doi: 10.1093/infdis/jix094.

TABLEAU 2

Tailles d'échantillon pour déterminer si la réelle prévalence de la délétion du gène *pfhrp2* est supérieure ou inférieure au seuil de 5 % au niveau du domaine de l'étude (province)

Pourcentage de délétions confirmées du gène <i>pfhrp2</i> entraînant des résultats faux négatifs au TDR du HRP2	Nombre minimum de personnes atteintes d'une infection confirmée à <i>P. falciparum</i> à inclure par domaine, pour estimer la taille d'échantillon nécessaire permettant de s'assurer que l'intervalle de confiance à 95 % (test unilatéral) n'inclut pas une prévalence de délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i> de 5 %
%	n
3,0	205
3,2	260
3,4	369
3,6	487
3,8	757
4,0	1 082
4,2	2 016
4,4	3 484
4,6	11 133
4,8	32 202
5,0	
5,2	34 739
5,4	10 240
5,6	4 379
5,8	2 457
6,0	1 590
6,2	1 123
6,4	841
6,6	658
6,8	531
7,0	459
7,2	386
7,4	331
7,6	287
7,8	253
8,0	224
8,2	205

TABLEAU 3.

Récapitulatif des combinaisons de résultats des tests et des limites de l'approche incluant uniquement les personnes présentant des résultats discordants au TDR du HRP2 (positifs pour le Pf-LDH ou la microscopie ET négatifs au TDR du HRP2)

TDR du HRP2	TDR du Pf-LDH ou microscopie	Analyse moléculaire réalisée	Interprétation des résultats et limites de la détection des délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i>
+	+	Non	<ul style="list-style-type: none"> • Peut être une infection avec une délétion du gène <i>pfhrp2</i>, mais le HRP3 a été détecté par le TDR du HRP2 • Peut être une infection multiclonale avec des parasites ayant ou pas une délétion des gènes <i>pfhrp2/3</i>
+	-	Non	<ul style="list-style-type: none"> • Faux positif au TDR du HRP2 (ou HRP2 persistant après la résolution de l'infection) • Peut être une infection avec une délétion du gène <i>pfhrp2</i>, mais le HRP3 a été détecté par le TDR du HRP2 ou peut être une infection multiclonale avec des parasites ayant ou pas une délétion des gènes <i>pfhrp2/3</i>. <p>ET</p> <ul style="list-style-type: none"> • Faible densité des parasites inférieure ou égale à la limite de détection des TDR du Pf-LDH et/ou de la microscopie
-	+	Oui	<ul style="list-style-type: none"> • Résultats faux positifs au TDR du Pf-LDH ou à la microscopie • Faible densité des parasites égale à la limite de détection des TDR (réactivité variable des lignes de test)
-	-	Non	<ul style="list-style-type: none"> • Impossible d'exclure une infection à faible densité non décelée par les deux TDR, avec une délétion des gènes <i>pfhrp2/3</i> non décelée

4.7 Conservation des échantillons

Il convient de conserver les TDR, les lames de microscopie et les GSS sur papier filtre provenant de toutes les personnes suspectées d'être atteintes de paludisme, portant uniquement l'ID de l'étude dans des sachets en plastique imperméables au gaz jusqu'au terme de l'étude et de l'analyse des données, au cas où il serait nécessaire de résoudre des incohérences au niveau des données ou pour obtenir des échantillons d'ADN supplémentaires. **Une fois le rapport de l'étude terminé, tous les échantillons doivent être supprimés. Ils ne doivent pas être conservés ni utilisés à d'autres fins.**

Seules les GSS sur papier filtre de patients présentant des résultats discordants (et possiblement un sous-ensemble de résultats positifs et négatifs pour le HRP2 [voir appendice 1]) seront envoyées pour une analyse moléculaire [y compris un séquençage de l'ADN] et/ou sérologique à un laboratoire participant qualifié (écrivez à l'adresse malaria_rdt@who.int pour recevoir des liens vers des laboratoires spécifiques). Pour le transport, la GSS/le papier filtre seront conservés dans un sachet en plastique imperméable avec un dessiccant provenant du paquet du TDR. Tout sang ou ADN non utilisé restant après le test moléculaire ou les tests immunologiques devrait dans l'idéal être congelé entre -20 °C et -70 °C jusqu'à ce que les résultats aient été analysés et communiqués. Toutes les GSS seront détruites après communication des résultats de l'étude.

4.8 Conservation et gestion des données

Tous les formulaires de rapport de l'étude seront conservés dans un endroit fermé à clé. Les données devraient être à la fois saisies dans un établissement au niveau provincial ou central et dans les installations des laboratoires participants, à l'aide des écrans de saisie des données fournis. Il sera peut-être nécessaire d'adapter les questionnaires et les modèles de saisie des données à chaque pays ; des guides de codage seront mis au point pour toutes les variables de l'étude et devraient être utilisés par tous les sites pour garantir la comparabilité.

Après comparaison des doubles saisies de données et réconciliation des erreurs, les données seront en permanence nettoyées. Toutes les données seront recueillies avec des numéros d'identification uniques reliant les données épidémiologiques et de laboratoire et conservées dans des fichiers sécurisés protégés par mot de passe. Tous les registres au format papier seront conservés dans un endroit sécurisé sous clé.

Les données seront classées en données individuelles du patient, données d'infection par le paludisme et données de laboratoire. Il n'est pas possible de relier le nom du patient ou de quelconques caractéristiques d'identification unique aux ID de l'étude. Pour sauvegarder l'intégrité des données, l'ensemble du personnel de l'étude/de surveillance devra utiliser des ordinateurs protégés par mot de passe pour accéder aux données. Un cryptage sera nécessaire pour tous les dispositifs électroniques de capture des données ou les tablettes utilisées à des fins de collecte de données. Une permission devra être obtenue pour la réutilisation des données. Les gestionnaires de données sur site et leurs assistants seront formés pour tous les processus de saisie des données et de gestion, et leurs journaux de formation seront maintenus à jour et archivés à des fins de vérification d'assurance qualité des données.

L'ensemble des prestataires de soins des sites de surveillance devra être formé à la conduite éthique de la collecte de données d'étude et de surveillance pour la santé publique. Le personnel sera informé quant à l'importance de maintenir la cohérence dans les protocoles et les procédures de sélection des patients et de collecte de données.

L'approche d'assurance qualité sera axée sur la fourniture d'aide pour la sélection de sujets et de sites pour l'étude, la collecte de données et les procédures de gestion. Les techniques de vérification des données incluront des contrôles de logique, des plages et de cohérence. La validation des données se fera par des mécanismes de saisie électronique des données, comme des masques de saisie, la logique conditionnelle et des règles de validation. Le personnel de surveillance sera informé quant à la justification et l'importance des processus de vérification et de la validation des données, à l'aide d'exemples spécifiques pour décrire les implications possibles des résultats de l'étude. Des analyses statistiques intermédiaires feront office de contrôles de détection et de correction en identifiant les changements dans les taux de recrutement, les écarts vis-à-vis du protocole, la duplication des valeurs de saisie des données ou des valeurs de données incorrectes. Ces résultats seront communiqués de manière hebdomadaire à tous les membres du personnel clés tant que la collecte des données transversales est en cours. La conservation des données aussi bien au format papier qu'au format électronique servira de contrôle secondaire de l'exactitude des données.

4.9 Analyses de laboratoire

4.9.1 Tests de diagnostic rapide

Les tests de diagnostic rapide seront effectués conformément aux instructions des fabricants.

4.9.2 Caractérisation moléculaire

Il convient de réaliser la caractérisation moléculaire dans un laboratoire expérimenté dans les techniques moléculaires et/ou sérologiques du paludisme et souscrivant au système d'assurance

externe de la qualité (AEQ) pour les tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN) ou tout autre système de méthodes moléculaires pour le paludisme. Une préférence est accordée à la PCR quantitative par rapport à d'autres méthodes d'amplification non quantitative des acides nucléiques si la densité des parasites n'est pas mesurée par microscopie.

Les méthodes proposées ci-dessous sont fondées sur Cheng *et al.*, mais peuvent varier en fonction du laboratoire de référence [4].

4.9.2.1 Extraction et contrôle de la qualité de l'ADN

Pour la vérification de la qualité de l'ADN, il convient d'utiliser une aliquote de l'ADN pour l'amplification des gènes *msp1*, *msp2* et *glurp*, conformément aux protocoles standards publiés [18].

4.9.2.2 Diagnostic de l'espèce moléculaire

Il convient d'utiliser des paires d'amorces spécifiques pour quatre ou cinq réactions d'amplification séparées et spécifiques de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*.

4.9.2.3 Caractérisation des séquences et délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* dans les échantillons

Des séquences d'amorces, conditions de PCR et tailles des produits d'amplification attendus ont été proposées dans des publications [4]. Il convient de caractériser les gènes *Pfhrp2* et *pfhrp3* par amplification de deux segments de gènes. Un segment s'étend depuis l'extrémité de l'exon 1 jusqu'au début de l'exon 2, et comprend l'intron de chaque gène. L'autre segment comprend la totalité de l'exon 2, qui code la région répétée riche en histadine-alanine de chaque protéine. Les tests de PCR devraient inclure des contrôles adéquats, y compris de l'ADN de souches de laboratoire dont les délétions sont connues, comme les DD2 (délétion du gène *pfhrp2*) et HB3 (délétion du gène *pfhrp3*). Si le gène *pfhrp2* peut être amplifié, la séquence de l'amplicon de l'exon 2 sera déterminée et traduite en une séquence d'acides aminés. Cela permettra de classer la protéine HRP2 de Pf en tant que type A, type B ou type C/groupe structurel limite, selon le nombre multiple de répétitions de type 2 et de type 7 (voir ci-dessus). S'il n'est pas possible d'amplifier les gènes *pfhrp2* et/ou *pfhrp3* malgré la bonne qualité de l'ADN (voir 4.9.2) démontrée par l'amplification d'autres séquences de gènes en copie unique, cela peut laisser à penser que les gènes ont été délétés. Afin de confirmer et caractériser davantage les délétions subtélomériques, il est possible d'amplifier les gènes flanquants en amont et en aval des gènes *pfhrp2* et/ou *pfhrp3* : le gène HPC230 situé ~5,5 kb en amont et le gène HSP70 situé ~6,5 kb en aval du gène *pfhrp2* ; et le gène HPC475 situé ~1,7 kb en amont et ACL situé ~4,4 kb en aval du gène *pfhrp3*.

4.9.3 Sérologie

À partir d'une GSS, il est possible d'utiliser une détection ultrasensible du HRP2 et du pLDH par dosage immunologique multiplexe à billes ou ELISA pour confirmer les résultats du génotypage et en particulier pour résoudre les incohérences entre les résultats du TDR et de la PCR.

4.10 Procédures d'analyse des données

Après la double saisie des données (voir section 4.8) et la résolution d'éventuelles erreurs, la prévalence de résultats faux négatifs au TDR du HRP2 (fondée sur le diagnostic) suspectée comme étant le résultat de délétions des gènes *pfhrp2/3* (indicateur de résultat 1) sera déterminée au niveau du domaine/de la province, avec des IC à 95 % estimés pour toutes les estimations ponctuelles. Ce processus devrait respecter le format du tableau de la maquette fourni (appendice 4). Les estimations au niveau de la province du résultat 1 seront ensuite ventilées par tranche d'âge, sexe, village/domicile et traitement antipaludique récent afin

d'observer s'il en émerge des tendances. Si cela est souhaité, les estimations ponctuelles et les IC à 95 % peuvent être pondérées en fonction de la taille relative de l'établissement ou des flux de patients. Les différences entre les estimations ponctuelles dans l'ensemble des variables socio-démographiques ou d'autres variables recueillies peuvent être déterminées en utilisant le χ^2 et/ou des régressions logistiques, si cela est souhaité.

Après la réalisation des analyses de laboratoire, la prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* définie par génotypage et/ou sérologie sera estimée dans la cohorte suspectée (indicateur de résultat 2) au niveau de la province et du pays (indicateur de résultat 3) avec des IC à 95 % pour toutes les estimations ponctuelles. Ce processus devrait respecter le format du tableau de la maquette fourni (appendice 4). Le résultat 3 sera ventilé par province, tranche d'âge, sexe, village/domicile et traitement antipaludique récent afin d'observer s'il en émerge des tendances. Si cela est souhaité, les estimations ponctuelles et les IC à 95 % peuvent être pondérés en fonction de la taille relative de l'établissement ou des flux de patients, ainsi que par la taille relative de la province pour les estimations au niveau national. Les différences entre les estimations ponctuelles dans l'ensemble des variables socio-démographiques ou d'autres variables recueillies peuvent être déterminées en utilisant le χ^2 et/ou des régressions logistiques, si cela est souhaité.

De plus, l'analyse inclura :

- Le nombre total de cas de paludisme suspectés dépistés ;
- Le taux de résultats positifs du TDR par établissement de santé ;
- La performance comparative des TDR et des lignes de test des TDR pour la détection de *P. falciparum*.

4.11 Diffusion des résultats

Au terme de l'étude, l'agent responsable en chef de l'étude soumettra un rapport de l'étude et de son principal résultat. Ce rapport sera communiqué au Programme national de lutte contre le paludisme et au Ministère de la santé ; il permettra de formuler des recommandations et aidera le Ministère de la santé à prendre des décisions éclairées sur la nécessité de mettre à jour les directives actuelles. Les données seront également communiquées au Programme mondial contre le paludisme de l'OMS afin de les intégrer dans les Cartes des menaces du paludisme (<https://apps.who.int/malaria/maps/threats/>) et le Rapport sur le paludisme dans le monde.

Il convient également d'indiquer s'il est prévu de présenter l'étude à l'occasion d'une réunion scientifique ou de la publier, et de préciser comment les résultats seront communiqués à la population de l'étude.

5. Calendrier de l'étude

Il convient de noter que le temps nécessaire pour atteindre le nombre souhaité de participants à l'étude sera fonction : 1) du nombre de cas de paludisme suspectés examinés chaque semaine dans l'établissement ; 2) du taux de résultats positifs au test (nombre de résultats positifs par cas suspecté de paludisme) dans chaque établissement ; et 3) de la taille d'échantillon nécessaire pour déceler si la prévalence observée de résultats faux négatifs au TDR du HRP2 provoqués par des délétions des gènes *pfhrp2/3* est inférieur ou égal au seuil de 5 % (voir section 4.4). Avant d'appliquer ce protocole, le PNLP et les équipes de surveillance devraient évaluer le temps escompté pour atteindre le nombre souhaité de répondants dans chaque province et s'organiser en conséquence.

Un exemple de calendrier figure au tableau 4 ; il est à noter que le mois de début dépendra du contexte de transmission local.

TABLEAU 4.
Exemple de calendrier de l'étude

Activités	Année									
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O
Élaboration de la base d'échantillonnage										
Sélection des provinces et des établissements										
Approvisionnement de toutes les fournitures pour l'étude										
Engagement de la communauté (selon les besoins)										
Recrutement et formation des personnes participant à la collecte de données										
Collecte des données dans les établissements										
Saisie des données										
Analyses de laboratoire										
Analyse des données										
Présentation des résultats										

6. Sujets humains

6.1 Présentation

L'ensemble du personnel de surveillance devrait être formé à la conduite éthique d'études portant sur des sujets humains, sur les objectifs de l'étude/de la surveillance, les méthodes pour une communication efficace avec les participants à l'étude, et le respect de la confidentialité de données de grande qualité lors de la collecte.

Même si l'OMS considère que ce protocole type concerne la surveillance et non la recherche, il est conseillé que les équipes de surveillance se rapprochent des comités d'éthique/des comités institutionnels de révision avant de commencer leur travail sur le terrain.

6.2 Risques pour les sujets humains

Cette activité de surveillance présente un risque minime pour les participants. La quantité de sang recueillie est très faible (~100–200 µl), et les participants présenteront uniquement un petit hématome sur le site du prélèvement de sang. La piqûre initiale peut provoquer une gêne ou une douleur minime passagère. Le personnel formé fera des prélèvements sur les doigts afin de s'assurer que ces piqûres soient les plus sûres possible. Des précautions seront prises pour éviter le saignement en appliquant immédiatement une compresse d'ouate sur le site de prélèvement. Le risque d'infection sera minimisé en nettoyant le doigt avec un tampon imbibé d'alcool avant le

prélèvement et en utilisant des lancettes jetables (une par personne pour éviter toute contamination croisée/transmission d'agents infectieux). Tout problème relatif à des risques éventuels sera atténué autant que possible par une sensibilisation de la communauté au sujet de l'étude.

6.3 Protection contre les risques

Les données de surveillance recueillies ne sont pas considérées comme des données sensibles. De ce fait, les participants devraient être exposés à des risques minimes. De plus, aucune information personnelle ou identifiable ne sera recueillie et tous les matériels recueillis seront détruits après la communication des résultats de l'étude. Les formulaires de rapport de l'étude seront étiquetés de manière à porter un numéro d'ID chronologique et unique et aucun dossier portant le nom du patient ne sera conservé. Aucun lien ne sera établi entre les registres cliniques (contenant des informations personnelles) et les formulaires de rapport de l'étude. Les échantillons de papier filtre et d'autres échantillons ne porteront que le numéro d'ID de l'étude.

La stratégie proposée pour réduire les risques inclut ce qui suit :

1. Explication des procédures physiques à chaque participant pour lui faire comprendre l'éventuelle douleur associée à la collecte de données sur le paludisme, et que cette douleur sera la plus vraisemblablement passagère.
2. Explication précisant que le matériel sera détruit et ne sera pas conservé au-delà du terme de l'étude.
3. Faire en sorte que les professionnels de la santé puissent répondre aux questions les plus fréquemment posées et comprennent la nature des questions posées.
4. Faire en sorte que la compétence des professionnels de la santé utilisant des TDR dans leur travail de routine soit avérée pour la collecte et la manipulation d'échantillons biologiques et que l'ensemble du personnel responsable de la saisie des données (pouvant aussi être des professionnels de la santé) soit informé des notions de confidentialité et de sécurité ; que l'ensemble des membres de l'équipe de surveillance soit informé quant aux précautions universelles pour la manipulation d'échantillons biologiques.
5. Formation des superviseurs sur le terrain sur la gestion du protocole. Des contrôles ponctuels du personnel de supervision permettront d'évaluer plus avant la gestion du protocole.
6. Utilisation des procédures de test les plus efficaces disponibles pour garantir une collecte de données et des tests biologiques stériles et sans danger.
7. Évaluation des pratiques de protection contre les infections transmissibles par le sang, y compris le VIH, conformément aux directives nationales, et des plans d'action correctifs dans les cas où une telle infection se produirait après une piqûre d'aiguille lors de la collecte de données. Une formation/un recyclage sur les précautions standards universelles (utilisation de gants et d'équipement stérile pour toutes les manipulations impliquant des liquides) minimisera les possibilités de transmission d'agents infectieux des participants aux personnes chargées de la collecte de données et inversement. En cas de piqûre par une aiguille, la personne recevra immédiatement des conseils et un traitement adéquats dans l'établissement de santé pertinent le plus proche conformément au protocole national.
8. Faire en sorte que les procédures de confidentialité soient conçues pour satisfaire tous les cas de figure afin de préserver la confidentialité de tous les participants.

6.4 Suivi des données et plan de protection

Toutes les données seront conservées dans des armoires fermées à clé et des ordinateurs protégés par mot de passe accessibles uniquement au personnel de surveillance de base.

7. Références

1. Howard RJ, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, Lew AM, *et al.* Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Cell Biol. 1986;103(4):1269-77.
2. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, *et al.* Effect of sequence variation in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: implications for rapid diagnostic tests for malaria. J Clin Microbiol. 2006;44(8):2773-8.
3. False-negative RDT results and implications of new reports of P. falciparum histidine-rich protein 2/3 gene deletions. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2017 (WHO/HTM/GMP.2017.18 ; <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/information-note-hrp2-based-rdt/en/>).
4. Cheng Q, Gatton ML, Barnwell J, Chiodini P, McCarthy J, Bell D, *et al.* Plasmodium falciparum parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. Malar J. 2014;13:283.
5. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, *et al.* A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. PLoS One. 2010;5(1):e8091.
6. Bharti PK, Chandel HS, Ahmad A, Krishna S, Udhayakumar V, Singh, N. Prevalence of pfhrp2 and/or pfhrp3 gene deletion in Plasmodium falciparum population in eight highly endemic states in India. PLoS One. 2016;11(8):e0157949.
7. Koita OA, Doumbo OK, Ouattara A, Tall LK, Konaré A, Diakité M, *et al.* False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(2):194-8.
8. Abdallah JF, Akinyi Okoth S, Fontecha GA, Mejia Torres RE, Banegas EI, Matute ML, *et al.* Prevalence of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. Malar J. 2015;14:19.
9. Amoah LE, Abankwa J, Oppong A. Plasmodium falciparum histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana. Malar J. 2016;15:101.
10. Murillo Solano C, Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, *et al.* Deletion of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (pfhrp2) and histidine-rich protein 3 (pfhrp3) genes in Colombian parasites. PLoS One. 2015;10(7):e0131576.
11. Dorado EJ, Akinyi Okoth S, Montenegro N, Diaz G, Barnwell JW, Udhayakumar V, *et al.* Genetic characterisation of Plasmodium falciparum isolates with deletion of the pfhrp2 and/or pfhrp3 genes in Colombia: the Amazon region, a challenge for malaria diagnosis and control. PLoS One. 2016;11(9):e0163137.
12. Li P, Xing H, Zhao Z, Yang Z, Cao Y, Li W, *et al.* Genetic diversity of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 in the China-Myanmar border area. Acta Trop. 2015;152:26-31.
13. Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Ceron N, Adhin MR, Chandrabose J, Krishnalall K, *et al.* Variation in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (pfhrp2) and Plasmodium falciparum histidine-rich protein 3 (pfhrp3) gene deletions in Guyana and Suriname. PLoS One. 2015;10(5):e0126805.

14. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, *et al.* Pfhrp2 and pfhrp3 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malar J.* 2013;12:34.
15. Berhane, A., Anderson, K. F., Mihreteab, S., Gresty, K., Rogier, E., Mohamed, S....Cunningham, J. (2018). Major Threat to Malaria Control Programs by Plasmodium falciparum Lacking Histidine-Rich Protein 2, Eritrea. *Emerging Infectious Diseases*, 24(3), 462-470.
16. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016–2018). Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2017 (<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/978924151268/en/>).
17. Levy PS, Lemeshow S. Sampling of populations: methods and applications. 3^e édition. New York : John Wiley & Sons; 1999.
18. Ranford-Cartwright LC, Taylor J, Umasunthar T, Taylor LH, Babiker HA, Lell B, *et al.* Molecular analysis of recrudescence parasites in a Plasmodium falciparum drug efficacy trial in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(6):719-24.

8. Appendices

Appendice 1 : Options pour la collecte de données supplémentaires

Appendice 2 : Fiche de pointage de l'établissement

Appendice 3 : Formulaire de rapport de cas de l'étude

Appendice 4 : Plan de tabulation pour la prévalence de délétions des gènes *pfhrp2/3*

Appendice 1 : Options pour la collecte de données supplémentaires pour déterminer la prévalence de délétions des gènes *pfhrp2/3*

Afin d'obtenir les mesures de résultats primaires du protocole de l'étude, des échantillons de patients ayant obtenu de résultats faux négatifs aux TDR sont prioritaires pour l'analyse des délétions des gènes *pfhrp2/3*. Cette approche réduit le nombre d'échantillons de patients à transporter et à analyser par PCR et/ou sérologie. Cependant, comme indiqué dans le tableau A1, cette approche comporte des limites, car d'autres patients suspectés d'être atteints de paludisme portant des délétions des gènes *pfhrp2/3* ne seront pas détectés. Si les ressources humaines et financières le permettent, certaines limites peuvent être levées. Par exemple, en analysant au moyen de la PCR et/ou de la sérologie un sous-ensemble de GSS de personnes ayant obtenu un résultat négatif au TDR, il est possible de déterminer par PCR la prévalence des délétions des gènes *pfhrp2/3* chez les personnes présentant des infections par *P. falciparum* confirmées de faible densité, non détectées par les TDR ou par un TDR et la microscopie. En revanche, si le budget le permet, les GSS d'un sous-ensemble ou de tous les patients suspectés d'être atteints de paludisme à *P. falciparum* peuvent être analysées quel que soit le diagnostic, afin de confirmer les délétions des gènes *pfhrp2/3* chez les cas positifs. Cette approche permet d'identifier les infections provoquées par des parasites négatifs pour le *pfhrp2*, mais positifs pour le *pfhrp3* qui réagissent toutefois aux TDR basés sur le HRP2 en raison d'une réactivité croisée entre le HRP2 et le HRP3, ainsi que les infections multiclonales par des parasites avec ou sans délétion des gènes *pfhrp2/3*.

Des discussions entre les institutions responsables de la collecte des données et les laboratoires responsables des procédures moléculaires et sérologiques devraient avoir lieu au stade de planification pour s'accorder sur un plan d'analyse prioritaire des échantillons.

TABLEAU A1

Options supplémentaires pour l'analyse des gouttes de sang séché et limites correspondantes pour la détection des délétions des gènes *pfhrp2/3*

TDR du HRP2	Pf-LDH/ microscopie	Diagnostic	Ordre de priorité pour l'analyse des GSS	Interprétation des résultats et limites de la détection des délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i>
+	+	<i>P. falciparum</i>	2	<ul style="list-style-type: none"> • Peut être une infection avec une délétion du gène <i>pfhrp2</i>, mais le HRP3 a été détecté par le TDR du HRP2 • Peut être une infection multiclonale avec des parasites ayant ou pas une délétion des gènes <i>pfhrp2/3</i>
+	-	<i>P. falciparum</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> • Faux positif au TDR du HRP2 (ou HRP2 persistant après la résolution de l'infection) • Peut être une infection avec une délétion du gène <i>pfhrp2</i>, mais le HRP3 a été détecté par le TDR du HRP2 • Peut être une infection par Pf de faible densité qui n'entraîne pas une réaction du Pf-LDH au TDR en raison de la faible concentration d'antigènes • Peut être une infection multiclonale avec des parasites ayant ou pas une délétion des gènes <i>pfhrp2/3</i>
-	+	<i>P. falciparum</i>	1	<ul style="list-style-type: none"> • Résultats faux positifs au TDR du Pf-LDH ou à la microscopie • Faible densité des parasites à la limite de détection des TDR entraînant une réactivité variable au TDR
-	-	Résultat négatif pour le paludisme	4	<ul style="list-style-type: none"> • Impossible d'exclure une infection de faible densité non décelée par les deux TDR, avec une délétion des gènes <i>pfhrp2/3</i> non décelée. Utilisation de la PCR pour exclure une infection par le paludisme.

Appendice 2 : Fiche de pointage de l'établissement pour l'étude sur les délétions des gènes *Pfhrp2/3*

Cette fiche doit être remplie par tous les établissements qui participent à la surveillance des délétions des gènes *pfhrp2/3*. Dans chaque province, après avoir examiné 370 personnes atteintes de paludisme à *P. falciparum* (37 dans chacun des 10 sites de recrutement par province), calculez la proportion de diagnostics discordants (résultats positifs pour le Pf-LDH ou la microscopie ET négatifs au TDR du HRP2) parmi tous les diagnostics positifs. Consultez ensuite les points 10 et 11 de la section 4.6 pour déterminer l'interprétation des résultats et les mesures associées après l'analyse statistique des données de confirmation moléculaire et/ou sérologique.

A	B	C	D	E	F	G
	ID du patient	Date de la visite/du test (JJ/MM/AA)	Consentement éclairé/accord	Cas de Pf confirmé par au moins une méthode de diagnostic	Nombre cumulé de cas positifs pour Pf (de la colonne E)	Cas de résultats faux négatifs suspectés pour le HRP2 (résultats positifs pour le Pf-LDH ou la microscopie ET négatifs au TDR du HRP2)
1			O/ N	O / N/ S.O.		O / N/ S.O.
2			O / N	O / N/ S.O.		O / N/ S.O.
3			O / N	O / N/ S.O.		O / N/ S.O.
4			O / N	O / N/ S.O.		O / N/ S.O.
5			O / N	O / N/ S.O.		O / N/ S.O.

* Ajoutez des rangs en fonction des besoins

Total des personnes suspectées de paludisme (colonne A)

Décompte total après détection de 37 cas de *P. falciparum* par établissement (la dernière entrée de la colonne E est égale à 37)

Nombre de résultats faux négatifs au TDR du HRP2 (colonne F - somme des réponses « Oui ») (a)

Total des diagnostics positifs de *P. falciparum* quel que soit le test (colonne E - dernière entrée)

(b) _____

Pourcentage de tous les cas de Pf avec des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 nécessitant une analyse moléculaire et/ou sérologique pour les délétions des gènes *pfhrp2/3* (a/b)


Objectif : 37 cas de *P. falciparum* détectés par établissement (dernière entrée de la colonne E)

Appendice 3 : Formulaire de rapport de cas de l'étude

Remarque : chaque formulaire de l'étude devrait être pré-étiqueté chronologiquement, le nombre d'étiquettes devrait être suffisant pour pouvoir les apposer sur les TDR, les GSS et les sachets en plastique. Dans l'idéal, le formulaire devrait être produit en deux exemplaires.

Un exemplaire est destiné au PNLP pour une analyse de l'indicateur 1 et l'autre est destiné au laboratoire avec le papier filtre pour une analyse des indicateurs 2 et 3.

Les formulaires devraient être préremplis pour indiquer l'établissement de santé et les informations relatives au TDR, à savoir, nom, code du produit, antigènes cibles, etc. et les sections qui ne sont pas applicables (S.O.).

À compléter avant l'entrevue du participant								
1.	Code-barres/ID du patient	Collez l'étiquette						
2.	Établissement de santé	Prérempli pour chaque établissement de santé sur un formulaire imprimé ou combiné avec une ID de l'étude						
3.	Nom de l'agent de santé/l'assistant de laboratoire							
4.	Date de la visite	Jour____ Mois____ Année____						
5.	Prérempli pour chaque établissement de santé sur un formulaire imprimé : TDR 1 (doit inclure le TDR du HRP2 du programme national) a. Nom : b. Code du produit : c. Numéro de lot : d. Date de péremption : e. Antigènes cibles : 1. T1 : 2. T2 : 3. T3 :	 <table border="1" style="margin-top: 10px;"> <tr> <td></td> <td>Case 1</td> </tr> <tr> <td>Contrôle</td> <td>P. f. HRP2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">+ / -</td> <td style="text-align: center;">+ / -</td> </tr> </table> <p>Entourez le résultat correct dans chaque case ci-dessus.</p> <p>Entourez le résultat du TDR : 1. Négatif 2. <i>P. falciparum</i> 3. Non valide (recommencez et prenez un nouveau formulaire de résultats du TDR)</p>		Case 1	Contrôle	P. f. HRP2	+ / -	+ / -
	Case 1							
Contrôle	P. f. HRP2							
+ / -	+ / -							

6.	<p>TDR 2 (TDR de l'étude)</p> <p>a. Nom :</p> <p>b. Code du produit :</p> <p>c. Numéro de lot :</p> <p>d. Date de péremption :</p> <p>e. Antigènes cibles :</p> <p>1. T1 :</p> <p>2. T2 :</p> <p>3. T3 :</p>	<div data-bbox="643 197 1374 405" data-label="Image"> </div> <table border="1" data-bbox="486 441 1339 712"> <tr> <td></td> <td>Case 2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Contrôle</td> <td>T2 Pf-LDH</td> <td>T1 HRP2</td> </tr> <tr> <td>+ / -</td> <td>+ / -</td> <td>+ / -</td> </tr> </table> <p>Entourez le résultat correct dans chaque case ci-dessus.</p> <p>Entourez le résultat du TDR : 1. Négatif 2. <i>P. falciparum</i> 3. Non valide (recommencez et prenez un nouveau formulaire de résultats du TDR)</p>		Case 2		Contrôle	T2 Pf-LDH	T1 HRP2	+ / -	+ / -	+ / -											
	Case 2																					
Contrôle	T2 Pf-LDH	T1 HRP2																				
+ / -	+ / -	+ / -																				
7.	<p>a. Le TDR1 est-il positif pour <i>P. falciparum</i> ?</p> <p>b. Le TDR2 est-il positif pour <i>P. falciparum</i> ?</p>	<p>O / N</p> <p>O / N</p> <p>Si la réponse est OUI à l'une quelconque des questions, administrez le traitement.</p>																				
8.	GSS prélevée ?	O / N																				
9.	Microscopie	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Microscopie</th> <th>Positive/négative/S.O.</th> <th>Espèce</th> <th>Décompte de parasites (parasites par microlitre)</th> <th>Initiales du microscopiste</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Établissement de santé sur le terrain</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Contrôle par le laboratoire national (résultat 1)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Contrôle par le laboratoire national (résultat 2)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Microscopie	Positive/négative/S.O.	Espèce	Décompte de parasites (parasites par microlitre)	Initiales du microscopiste	Établissement de santé sur le terrain					Contrôle par le laboratoire national (résultat 1)					Contrôle par le laboratoire national (résultat 2)				
Microscopie	Positive/négative/S.O.	Espèce	Décompte de parasites (parasites par microlitre)	Initiales du microscopiste																		
Établissement de santé sur le terrain																						
Contrôle par le laboratoire national (résultat 1)																						
Contrôle par le laboratoire national (résultat 2)																						

À obtenir pour chaque cas suspect de paludisme		
10.	Âge en années	_____
11.	Sexe	a. M b. F
12.	Village où habite le cas suspect de paludisme	_____ <i>Choix dans une liste pré-établie si possible</i>
13.	Au cours des 2 dernières semaines, avez-vous passé un test de dépistage du paludisme ?	a. Non → Allez à la question 14 b. Oui
14.	Quel a été le résultat du test ?	a. Positif b. Négatif c. Ne sais pas
15.	Au cours des 2 dernières semaines, avez-vous pris des médicaments antipaludiques ?	c. Non → Allez à la question 17 d. Oui
16.	Médicament antipaludique pris	<i>Choix dans une liste pré-établie</i> d. CTA (quand la CTA est le médicament de première intention dans le pays) e. Autres CTA (le médicament de première intention peut porter un nom différent) f. Fansidar / SP / Sulfadoxine/pyriméthamine g. Quinine h. Acétaminophène (antipyrétiques disponibles dans le pays) i. Autre _____ j. Non connu k. S.O.
17.	Vous êtes-vous déplacé(e) vers un autre lieu dans le pays au cours des 30 derniers jours ?	a. Non → Fin b. Oui → Allez à la question 18
18.	Vers où vous êtes-vous déplacé(e) ?	a. Pays _____ b. Région _____ c. District _____ d. Ville/Village _____ e. S.O. Remarque : les réponses devraient figurer dans la liste déroulante et des choix multiples être possibles

RÉSERVÉ AU SUPERVISEUR		
S1	<p>a. La réponse de la case 1 est-elle négative ?</p> <p>b. La réponse de la case 2 est-elle positive ?</p>	<p>O / N</p> <p>O / N</p> <p>Si la réponse est OUI pour la partie a et la partie b, le résultat est discordant.</p>
RÉSERVÉ AU LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE		
17.	Analyse moléculaire	<p>a. copie unique gène 1 – présent/absent/non effectué</p> <p>b. copie unique gène 2 – présent/absent/non effectué</p> <p>c. copie unique gène 3 – présent/absent/non effectué</p> <p>d. Exon 1 HRP2 – présent/absent/non effectué</p> <p>e. Exon 2 HRP2 – présent/absent/non effectué</p> <p>d. 230 flanquant HRP2 – présent/absent/non effectué</p> <p>e. 228 flanquant HRP2 – présent/absent/non effectué</p> <p>h. Exon 1 HRP3 présent/absent/non effectué</p> <p>i. Exon 2 HRP3 – présent/absent/non effectué</p> <p>j. 485 flanquant HRP3 – présent/absent/non effectué</p> <p>k. 475 flanquant HRP3- présent/absent/non effectué</p> <p>l. Signal luminex HRP2 - valeur/non effectué</p> <p>m. ng/ml HRP2 – valeur/non effectué</p>
18.	Sérologie	<p>a. pfhrp2+/pan-LDH+</p> <p>b. pfhrp2-/pan-LDH-</p> <p>c. pfhrp2+/pan-LDH-</p> <p>d. pfhrp2-/pan-LDH+</p>

Appendice 4 : Plan de tabulation pour la prévalence de délétions des gènes *pfhrp2/3*^a

	Prévalence des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 ^b (n=XX)	Prévalence confirmée des délétions des gènes <i>pfhrp2/3</i> ^c (n=XX)
Caractéristique	(IC à 95 %)	(IC à 95 %)
Âge en années		
<2		
3-5		
6-9		
10-19		
20-29		
30-39		
40-49		
50-59		
≥60		
Sexe		
Homme		
Femme		
Lieu		
Urbain		
Rural		
Province (domaine de l'étude)		
Province 1		
Province 2		
Province 3		
Province 4		
Province 5		
Établissement de santé (facultatif)		
Établissement 1		
Établissement 2		
Établissement 3		
Établissement 4		
Établissement 5		
Établissement 6		
Établissement 7		
Établissement 8		
Établissement 9		
Établissement 10		
Traitement antipaludique au cours des 2 dernières semaines		
Oui		
Non		
Total		

*a – Les tabulations sont fondées uniquement sur le dépistage de la délétion des gènes *pfhrp2/3* dans les cas infectés par *P. falciparum* obtenant des résultats discordants. Si tous les cas de Pf ou tous les cas suspectés sont examinés pour des délétions des gènes *pfhrp2/3*, ce formulaire devrait alors être revu en conséquence.*

*b – Prévalence des résultats faux négatifs suspectés au TDR du HRP2 à *P. falciparum* = nombre de résultats discordants (résultats négatifs pour le HRP2 et positifs pour le Pf-LDH ou la microscopie)/tous les cas d'infections par *P. falciparum* confirmés quel que soit le diagnostic.*

*c – Prévalence de la délétion des gènes *pfhrp2/3* = nombre de cas d'infection par Pf avec une délétion des gènes *pfhrp2/3* entraînant des résultats faux négatifs au TDR du HRP2/total du nombre de cas d'infections par *P. falciparum*.*

