

Intérêts et difficultés de la microscopie pour le diagnostic de présomption de la peste

Rahalison L¹, Rasoamanana B^{1,2}, Razafimahefa M³, Rasolomaharo M³,
Buchy P³, Chanteau S¹

RESUME : Le diagnostic bactériologique de la peste est basé sur la microscopie et l'isolement de *Yersinia pestis* à partir de prélèvements suspects. Lorsque la culture et l'inoculation à la souris sont négatives, l'examen direct du frottis permet de poser un diagnostic de présomption de peste. Examen simple à réaliser a priori, la microscopie pose cependant de réelles difficultés de lecture et de reproductibilité entre deux laboratoires. Cette étude compare les résultats obtenus au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Mahajanga et au Laboratoire Central de la Peste (LCP), lors des deux épidémies successives de peste en 1995 et 1996.

En prenant la culture comme référence, la microscopie réalisée à Mahajanga est plus sensible mais moins spécifique que celle réalisée au LCP. Entre l'année 1995 (350 patients) et 1996 (245 patients), la concordance entre les 2 laboratoires s'est améliorée, passant de 55% à 75%. Malgré une sensibilité et une spécificité assez faibles par rapport à la culture (elle-même peu sensible aussi en raison des conditions de transport des prélèvements), la microscopie conserve toute sa valeur pour le diagnostic de présomption de la peste lorsqu'elle est faite par un personnel entraîné. La solution idéale à terme sera un test immunodiagnostique simple et rapide, réalisable par des agents de santé non biologistes.

Mots-clés : Peste - *Yersinia pestis* - Diagnostic - Microscopie - MADAGASCAR.

ABSTRACT : "Presumptive diagnosis of plague : interests and difficulties of microscopical examination". Plague biological diagnosis was based on the microscopical examination and the isolation of *Yersinia pestis* from suspected pathological samples. When no *Y. pestis* is isolated, it is possible to state for a presumption of plague when the smear examination is positive. Apparently a very simple technique, reliable and reproducible results are however difficult to obtain from centre to centre. This study compared the results obtained in Mahajanga hospital and in the Central Plague Laboratory (CPL) during the two successive epidemics in 1995 and 1996 .

As compared to the culture as a reference method, the microscopy performed in Mahajanga was more sensitive but less specific than in the CPL. Between 1995 (350 patients) and 1996 (245 patients), the agreement between the two laboratories significantly improved from 55% to 75%. In spite of its low sensitivity and specificity as referred to the culture (itself of low sensitivity in the malagasy conditions), the microscopy is valuable for the presumptive diagnosis of plague when performed by a trained technician. The ideal test will be a rapid and simple immunodiagnostic assay to be performed by non biologist health workers.

Key words : Plague - *Yersinia pestis* - Diagnosis - Microscopy - MADAGASCAR.

INTRODUCTION

Dans les pays d'endémie pesteuse, le diagnostic de la peste est basé sur les signes cliniques et la notion de contagion. Il s'ensuit immédiatement un traitement spécifique du malade. La confirmation biologique de la peste est rétrospective et basée sur la microscopie et l'isolement de *Yersinia pestis*. Lorsque l'examen direct (ED) est positif, on se trouve devant un cas probable de peste. Le diagnostic de certitude n'est affirmé que lorsque le bacille *Y. pestis* est isolé.

A Madagascar, la microscopie est faite en périphérie au niveau des hôpitaux de district ou des

Services de Santé de District [1]. Par contre, la culture et l'inoculation à la souris pour la recherche de *Y. pestis* ne sont réalisables qu'au Laboratoire Central de la Peste (LCP), situé à l'Institut Pasteur de Madagascar à Antananarivo. Un deuxième frottis est aussi adressé au LCP pour la microscopie. Nous présentons les résultats comparatifs de l'examen direct obtenus au LCP et au laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Mahajanga (MJG). Celui-ci n'avait aucune expérience de la microscopie de la peste avant l'épidémie de 1995. La formation du personnel et l'expérience acquise ont contribué à l'augmentation de la performance de ce laboratoire en 1996.

¹ Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

² Laboratoire Central de la Peste, Ministère de la Santé, Direction de la Lutte contre les Maladies Transmissibles (DLMT), BP 460 - 101 Antananarivo - Madagascar.

³ Centre Hospitalier Universitaire Androva - 401 Mahajanga - Madagascar.

MATERIELS ET METHODES

1- Définitions

Un prélèvement est positif à l'examen direct (coloration Gram) lorsqu'il y a présence de coccobacilles Gram négatif à coloration bipolaire, caractéristiques de *Y. pestis*. Un prélèvement est dit douteux à la microscopie lorsque l'examen direct montre la présence de bacilles polymorphes Gram négatif.

Un cas de peste confirmé est un malade pour lequel une souche de *Y. pestis* a été isolée, quel que soit le résultat de la microscopie. Un cas probable de peste est un malade négatif à la culture (ou prélèvement non disponible pour la culture) mais présentant un examen direct positif. Un cas douteux est un malade négatif à la culture (ou prélèvement non disponible pour la culture) mais douteux à la microscopie. Un cas négatif est un malade négatif aux deux tests. Les malades non prélevés mais notifiés par le médecin sont étiquetés malades suspects cliniques de peste. A Madagascar, ne sont déclarés à l'OMS que les cas confirmés et les cas probables de peste [2].

2- Prélèvements et méthodes d'analyses bactériologiques

En raison des 2 épidémies successives de peste en 1995 et 1996 [3, 4], le laboratoire du CHU de Mahajanga est le laboratoire qui effectue le plus grand nombre d'ED, à l'exception du LCP qui reçoit les lames de tout le pays.

Les prélèvements étaient des liquides de ponction de bubon, ou d'organes lorsqu'il s'agissait de prélèvement post-mortem. Pour chaque prélèvement, 2 frottis sont préparés : une des deux lames est colorée au Gram et lue au CHU de Mahajanga. L'autre lame ainsi que le prélèvement destiné à la culture (en milieu de transport Cary Blair) sont acheminés au LCP à Antananarivo.

Nous avons analysé les résultats des 350 patients (ou lames) de 1995 et des 245 patients de 1996.

Les patients sont classés en fonction des résultats obtenus à la microscopie (positif, négatif ou douteux). Ces résultats sont comparés avec ceux de la culture, test de référence. Les résultats sont analysés par année.

RESULTATS

1- Année 1995

Au CHU de Mahajanga (ED-MJG), sur 350 lames analysées, 107 lames (30,6%) sont positives, 182 lames (52%) sont négatives et 61 lames sont douteuses (17,4%). Au LCP (ED-LCP) nous avons respectivement 62 (17,7%), 278 (79,5%) et 10 (2,8%). La concordance globale entre les résultats

ED-MJG et ED-LCP n'est que de 55% : 9,1% (32) de lames positives, 45,1% (158) de lames négatives et 0,8% (3) de lames douteuses (Tableau I).

Tableau I : Comparaison ED-LCP et ED-MJG en 1995

ED-MJG	ED - LCP			Total (%)
	+	-	D*	
+	32	74	1	107 (30,5)
-	18	158	6	182 (52)
D*	12	46	3	61 (17,4)
Total (%)	62 (17,7)	278 (79,4)	10 (2,9)	350 (100)

ED-LCP : Examen Direct au Laboratoire Central Peste

* : cas douteux

Par comparaison avec les résultats de la culture, la spécificité de la microscopie (% sujets positifs parmi les sujets confirmés à la culture) n'est que de 16,8% au CHU de Mahajanga (Tableau I). Cependant, 8,8% des sujets négatifs et 21,3% des sujets douteux sont aussi confirmés par la culture. Au LCP à Antananarivo, la spécificité est de 21%. Là aussi 11,5% des sujets négatifs et 13,4% des sujets douteux à l'examen direct sont confirmés à la culture. La concordance entre l'examen direct et la culture est de 52,6% pour Mahajanga et de 74% pour le LCP.

Quant à la sensibilité (% de positifs à la microscopie parmi les sujets confirmés), elle est de 38,2% pour le CHU Mahajanga et 27,6% pour le LCP.

Tableau II : Comparaison entre la bactériologie et la microscopie obtenue au CHU de Mahajanga et au Laboratoire Central de la Peste en 1995

Isolement <i>Y. pestis</i>	Résultats microscopie (année 1995)					Total examinés	(%)	
	CHU Mahajanga							
	+	(%)	-	(%)	D*			(%)
+	18	(29,5)	18	(10,3)	5	(50)	41	(16,7)
-	43	(70,5)	156	(89,7)	5	(50)	204	(83,3)
	61	(100)	174	(100)	10	(100)	245	(100)
Isolement <i>Y. pestis</i>	Laboratoire Central de la Peste					Total examinés	(%)	
	+	(%)	-	(%)	D			(%)
	+	7	(50)	26	(12,2)			8
-	7	(50)	187	(87,8)	10	(56)	204	(83,3)
	14	(100)	213	(100)	18	(100)	245	(100)

* : cas douteux

2- Année 1996

Sur 245 lames (ou patients) prises en compte dans cette étude, l'examen direct à Mahajanga a conclu à 24,9% de lames positives (61), 71% de lames négatives (174) et 4,1% de lames douteuses (10), tandis qu'au LCP, ce sont respectivement 5,7% (14), 87% (213) et 7,3% (18). La concordance des résultats entre le CHU de Mahajanga et le LCP est de 75% : 4,9% de positifs, 68,2% (167) de négatifs et 2,5% (6) de lames douteuses (Tableau III).

Tableau III : Comparaison ED-LCP et ED-MJG en 1996

ED-MJG	ED - LCP			Total (%)
	+	-	D*	
+	12	43	6	61 (24,9)
-	1	167	6	174 (71)
D*	1	3	6	10 (4,1)
Total (%)	14 (5,7)	213 (87)	18 (7,3)	245 (100)

ED-LCP : Examen Direct au Laboratoire Central Peste

* : cas douteux

En comparant avec la culture, la spécificité du test est de 29,5% à Mahajanga et la concordance avec la culture de 71%, soit une nette amélioration par rapport à l'année 1995. Au LCP, la spécificité est de 50% et la concordance avec la culture de 79,2%, soit peu de différence avec l'année 1995.

La sensibilité est de 43,9% à Mahajanga et de 17% au LCP (Tableau IV).

Tableau IV : Comparaison entre la bactériologie et la microscopie obtenue au CHU de Mahajanga et au Laboratoire Central de la Peste en 1996

Isolement <i>Y. pestis</i>	Résultats microscopie (année 1996)				Total examinés	(%)
	CHU Mahajanga					
	+	(%)	-	(%)	D*	(%)
+	18	(16,8)	16	(8,8)	13	(21,3)
-	89	(83,2)	166	(91,2)	48	(78,7)
	107	(100)	182	(100)	61	(100)
					305	(100)
	Laboratoire Central de la Peste					
	+	(%)	-	(%)	D	(%)
+	13	(21)	32	(11,5)	2	(20)
-	49	(79)	246	(88,5)	8	(80)
	62	(100)	278	(100)	10	(100)
					305	(100)

* : cas douteux

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats montrent qu'aussi bien en 1995 qu'en 1996, la microscopie effectuée au CHU de Mahajanga est plus sensible mais moins spécifique que celle effectuée au LCP. Une amélioration de la spécificité a été remarquée en 1996 à Mahajanga, expliquée par un personnel plus expérimenté. La concordance entre les deux laboratoires s'est accrue entre 1995 (55%) et 1996 (75%). A titre de comparaison, la concordance entre le LCP et le laboratoire de l'ancienne circonscription d'Ambositra (parmi les plus performants du pays) était de 75% pendant la période 1984 à 1994 [5].

On remarque que 8 à 12% des sujets négatifs à l'examen direct sont confirmés par la culture et sont donc des faux négatifs. Le manque apparent de sensibilité de la microscopie peut être expliqué par un volume de prise d'essai plus petit avec la microscopie qu'avec des techniques de culture et d'injection à la souris et bien entendu la multiplication de *Y. pestis* chez la souris ou dans les milieux de culture.

Le manque de spécificité de la microscopie (positif à l'examen direct mais négatif à la culture) peut être expliqué, au moins partiellement, par les mauvaises conditions d'acheminement des prélèvements au LCP (entre une semaine et 2 mois), entravant la viabilité des bacilles. Ainsi, un certain nombre de ces faux positifs observés en microscopie sont en fait des vrais positifs si la culture et l'infection des souris avaient pu être réalisées sur place. Ceci a pu être vérifié par la présence d'antigène F1 dans les prélèvements suspects, et par les nombreuses séroconversions en anticorps anti-F1 observées chez ces malades. La culture de *Y. pestis* est donc peu performante dans les conditions opérationnelles malgaches et les outils immunodiagnostiques confortent l'intérêt de la microscopie, malgré son apparente mauvaise performance par rapport à la culture.

Cette étude a montré que de nombreux patients dont le résultat de la microscopie est douteux, sont confirmés par la culture. La recherche d'antigène F1 dans le prélèvement suspect ou d'anticorps anti-F1 pendant la phase de convalescence confirme les résultats de la culture.

Néanmoins, un résultat fiable en microscopie reste difficile à atteindre car il nécessite une bonne qualité de préparation des lames (étalement et coloration) et une lecture faite par un microscopiste entraîné. En périphérie comme au LCP, il est fort souhaitable que l'examen direct puisse être remplacé par un test plus simple et fiable comme la détection de l'antigène F1 sous la forme d'un test en bandelette.

REMERCIEMENTS

Le Programme National de Lutte contre la Peste est soutenu financièrement par le Gouvernement Malgache à travers une aide de la Banque Mondiale (CRESAN) et le Ministère de la Coopération Française (FAC Santé 1995-1998).

REFERENCES

- 1- **Ministère de la Santé de Madagascar : Direction des Services Sanitaires et Médicaux.** Note technique sur la Peste. Antananarivo : Ministère de la Santé, 1990.
- 2- **World Health Organization.** Human Plague in 1994. *Wkly Epidemiol Rec* 1996; **71** : 165-168.
- 3- **Rasolomaharo M, Rasoamanana B, Andrianirina Z, Buchy P, Rakotoarimanana N, Chanteau S.** Plague in Mahajanga. *Lancet* 1995; **346** : 1234.
- 4- **Boisier P, Rasolomaharo M, Ranaivoson G, Rasoamanana B, Rakoto L, Andrianirina Z, Andriamahefazy B, Chanteau S.** Urban epidemic of bubonic plague in Mahajanga, Madagascar : epidemiological aspects. *Trop Med Int Health* 1997; **2** : 422-427.
- 5- **Ramalagasy A.** Diagnostic bactériologique de la peste : réflexions sur les résultats obtenus au Laboratoire Central et au laboratoire de la CM d'Ambositra de 1984 à 1994. [Thèse de Médecine]. Antananarivo: Faculté de Médecine, 1995.