

COMPARAISON DE DEUX METHODES DE DOSAGE DE LA CHLOROQUINE DANS LES URINES SUR LE TERRAIN*

par

M. COT^{1,2}, B. GINESTE², D. BARRO², A. ROISIN³,
A. YADA⁴ & P. CARNEVALE²

¹INSERM U.155, Université Paris VII, Paris, France

²Antenne ORSTOM auprès du Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

³Projet CCCD, Centers for Disease Control, Atlanta, USA

⁴Direction provinciale de la Santé, Province de la Comoé, Burkina Faso

Résumé — Deux méthodes de dosage de la chloroquinurie, une méthode utilisant le bleu de bromothymol (Bergqvist) et une méthode utilisant l'hélianthine (Haskins et Mount ou HMM II), ont été réalisées conjointement chez des femmes suivies pendant leur grossesse, dont 21 recevaient une prophylaxie hebdomadaire de 300 mg de chloroquine en prise orale, les 24 femmes restantes ne prenant pas de traitement.

La méthode de HMM II est plus sensible (100 %) et plus spécifique (91,7 %) que la méthode de Bergqvist (80,9 % et 83,3 % respectivement); les valeurs prédictive positive (91,3 % contre 80,9 %) et négative (100 % contre 91,3 %) sont également meilleures avec cette technique. En outre, la méthode de HMM II permet une estimation plus précise de la quantité de chloroquine éliminée dans les urines. Enfin, elle est plus rapide, plus simple d'utilisation et plus économique que la méthode de Bergqvist. Tous ces éléments en font la méthode de choix à appliquer sur le terrain.

KEYWORDS: Chloroquinuria; Field assay; Bergqvist methode; HMM II method; Burkina Faso

Introduction

A l'occasion d'un essai contrôlé de chimioprophylaxie anti-palustre pendant la grossesse réalisé au Burkina Faso (ville de Banfora) en 1987 (Cot et al., non publié), plusieurs enquêtes intermédiaires ont été effectuées en vue de vérifier le respect du protocole par les sujets inclus dans l'essai (pas de prise d'antipaludéens par les femmes du groupe témoin, prise régulière par les femmes du groupe traité). Ces enquêtes consistaient en un contrôle des données fournies par les enquêteurs, l'interrogatoire des femmes sur la prise ou non de médicaments antipaludéens pendant la durée du suivi, et le dosage de la chloroquine dans les urines.

Deux méthodes de dosage de la chloroquinurie ont été testées, l'une développée par Bergqvist en 1985 (1), l'autre par Haskins en 1958 (2),

* Les demandes de tirés-à-part doivent être adressées au Dr. Michel Cot, ORSTOM/OCEAC, B.P. 288, Yaoundé, Cameroun.

modifiée par Mount en 1986 (HMM II). Nous avons comparé la valeur diagnostique, la simplicité d'utilisation et le coût de ces deux méthodes, de manière à déterminer quelle était la plus avantageuse sur le terrain.

Matériel et méthodes

Les deux méthodes sont fondées sur l'extraction de la chloroquine et de ses métabolites d'une phase aqueuse (l'urine) vers une phase organique par couplage avec un indicateur coloré (bleu de bromothymol pour la méthode de Bergqvist, hélianthine pour la méthode HMM II) en présence d'un solvant (dichlorométhane ou chloroforme selon la méthode).

Réactifs

Méthode de Bergqvist: Solution-tampon de carbonate de potassium à pH 9,5 obtenue en mélangeant des solutions de KHCO_3 (1,0 mol/l) et de K_2CO_3 (1,0 mol/l) dans la proportion de 4 volumes pour 1. Solution de bleu de bromothymol à 0,65 mmol/l obtenue en ajoutant à la solution-tampon une solution à 0,01 mol/l de bleu de bromothymol (sel de Na) dans de l'eau distillée. Dichlorométhane du commerce.

Méthode HMM II: Solution-tampon phosphate à pH 8 obtenue en ajoutant 81 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et 2,5 g de KH_2PO_4 à 250 ml d'eau distillée. Solution d'hélianthine à 0,2 % obtenue en mélangeant 0,5 g d'hélianthine et 12,5 g d'acide borique (H_3BO_3) dans 250 ml d'eau distillée. Après l'avoir laissé reposer 4 heures, le mélange doit être filtré. Chloroforme du commerce.

Procédures de laboratoire

Méthode de Bergqvist: Mélanger 1 ml de l'urine à tester à 2 ml de solution de bleu de bromothymol et à 3 ml de dichlorométhane. Agiter le tout pendant 30 secondes dans un tube à essais en verre; après avoir laissé reposer 15 à 30 minutes ou après 5 minutes de centrifugation, éliminer la phase aqueuse surnageante. Ajouter 1 ml d'eau et 2 ml de solution de bleu de bromothymol. Agiter le tube pendant 30 secondes et laisser reposer (ou centrifuger) pour que la phase aqueuse et la phase organique se séparent. Une fois la phase aqueuse éliminée, la densité optique de la phase organique peut être mesurée, soit grâce à un spectrophotomètre ($\lambda = 410 \text{ nm}$), soit, comme nous l'avons fait, par simple comparaison visuelle avec des échantillons d'urine contenant des quantités connues et croissantes de chloroquine. Selon les recommandations de l'auteur, la gamme qui a été utilisée contenait les concentrations de chloroquine 0, 25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{mol/l}$.

Méthode HMM II: Mettre dans des tubes en verre 1 ml de tampon pH 8 et 2 ml de chloroforme. Ajouter dans chacun de ces tubes 2 ml d'urine à tester. Après avoir bouché les tubes, les retourner une vingtaine de fois et les laisser reposer; éliminer la phase aqueuse et ajouter 1 ml de solution d'hélianthine à 0,2 %. Boucher les tubes, les retourner une vingtaine de fois et les laisser reposer. Agiter vigoureusement la phase organique avec un coton-tige pour la clarifier. La densité optique de la phase

organique peut alors être lue au moyen d'un spectrophotomètre ($\lambda = 420 \text{ nm}$) ou par comparaison visuelle avec une gamme d'échantillons d'urines contenant des quantités connues de chloroquine. La gamme que nous avons utilisée contenait les concentrations de chloroquine 0; 3,6; 7,2; 14,4 et $43,2 \mu\text{mol/l}$ (correspondant respectivement à 0; 1,5; 3; 6 et $18 \mu\text{g/ml}$).

Sélection des sujets

Trois enquêtes, pour lesquelles nous disposions des deux techniques de dosage, ont été effectuées parmi les femmes suivies. A chacun des passages (juin, octobre, et novembre 1987), 20 femmes étaient tirées au sort et leurs urines prélevées. Dans 45 cas, la quantité d'urine prélevée a été suffisante pour réaliser conjointement les deux méthodes (17 en juin, 19 en octobre, 9 en novembre); ces femmes se répartissaient en 21 traitées (prenant une prophylaxie de 300 mg/semaine de chloroquine) et 24 témoins (ne recevant aucune prophylaxie en principe). Pour les femmes du groupe traité, le délai écoulé entre la prise du dernier comprimé hebdomadaire et la date du prélèvement d'urine a été noté.

Diagnostic de référence

Les deux méthodes ont été utilisées pour vérifier le respect du protocole par les sujets inclus dans l'enquête. Nous ne disposions donc pas d'un véritable diagnostic de certitude; nous avons cependant pris comme référence l'inclusion dans un groupe, confirmée par l'interrogatoire des femmes. Ont été considérées comme prenant une prophylaxie toutes les femmes appartenant au groupe traité dont l'interrogatoire a confirmé l'administration de chloroquine par les enquêteurs. Ont été considérées comme négatives toutes les femmes du groupe témoin dont l'interrogatoire a confirmé qu'elles n'avaient pas pris de prophylaxie.

Prise d'autres médicaments

Le suivi des femmes participant à l'essai de prophylaxie consistait en une visite hebdomadaire à domicile, au cours de laquelle la prise éventuelle de médicaments (antipaludéens et autres) était portée sur un questionnaire. Sur les 45 femmes contrôlées, aucune n'a mentionné une telle prise; par ailleurs, le mauvais approvisionnement de la pharmacie locale et le faible pouvoir d'achat des femmes rendait un tel traitement peu probable, en l'absence de pathologie manifeste.

Méthodes statistiques

Le test de corrélation des rangs de Spearman a été utilisé pour comparer les résultats quantitatifs obtenus par les deux méthodes.

Résultats

Valeur diagnostique

Ont été considérés comme positifs, les prélèvements dont la couleur se rapprochait de celle du premier tube de la gamme de référence ($25\mu\text{mol/l}$ pour la méthode de Bergqvist; $3,6\mu\text{mol/l}$ pour la méthode HMM II) et au-delà. Les résultats des tests en fonction du statut (Traité ou Témoin), vérifié par l'interrogatoire des femmes, sont portés sur les tableaux 1 a (Bergqvist) et 1 b (HMM II). Les valeurs diagnostiques sont indiquées sur le tableau 2. En raison du nombre peu élevé de couples de résultats discordants, il n'a pas

TABLEAU 1a
Résultats du test (\pm) en fonction du statut. Méthode de Bergqvist

	Traité	Témoin	Total
Test positif	17	4	21
Test négatif	4	20	24
Total	21	24	45

TABLEAU 1b
Résultats du test (\pm) en fonction du statut. Méthode HMM II

	Traité	Témoin	Total
Test positif	21	2	23
Test négatif	0	22	22
Total	21	24	45

TABLEAU 2
Valeurs diagnostiques (en %) des tests de Bergqvist et HMM II

	Bergqvist	HMM II
Sensibilité	80,9	100
Spécificité	83,3	91,7
V.P.P.*	80,9	91,3
V.P.N.**	91,3	100

- * Valeur prédictive positive
- ** Valeur prédictive négative

été possible de comparer par un test statistique les sensibilités et spécificités des deux méthodes.

*Liaison entre la quantité de chloroquine mesurée
et le délai de prise du médicament*

Chaque femme prenant la même dose hebdomadaire de chloroquine (300 mg), la quantité éliminée dans les urines doit logiquement décroître en fonction inverse du délai écoulé entre la prise de la prophylaxie et le prélèvement d'urine.

Dans le cas de la méthode de Bergqvist, les résultats des dosages en fonction de l'intervalle écoulé entre la dernière prise et le prélèvement (en jours) ont été représentés sur la Figure 1. Les données de l'interrogatoire étaient insuffisantes pour déterminer avec précision la date de prise de la chloroquine chez deux sujets. Pour les 15 sujets restants, la dose de chloroquine mesurée par le test a été notée de 1 à 5 (en fonction du tube de la gamme dont la couleur se rapprochait le plus de celle de l'échantillon testé, correspondant donc à des concentrations de 25 à 400 $\mu\text{mol/l}$). Pour tester la liaison entre le délai et cette dose, la distribution de cette variable étant très éloignée de la normalité et le nombre de mesures étant faible, nous avons calculé le coefficient de corrélation des rangs de Spearman, qui est de $-0,25$ (13 ddl), non significatif.

Dans le cas de la méthode HMM II, les données de l'interrogatoire étaient insuffisantes chez 3 individus (sur les 21 positifs); les résultats ont été portés

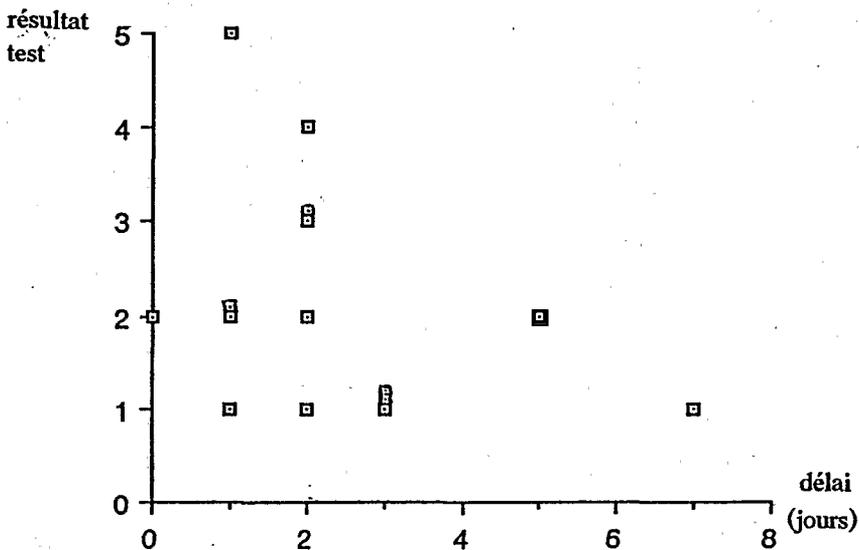


Figure 1.

Résultats des dosages de chloroquinurie en fonction de la date de prise de la prophylaxie (méthode de Bergqvist, N = 15). Le résultat du test est noté de 1 à 5 en fonction du tube de la gamme dont la couleur se rapproche le plus de celle du tube testé.

Test de corrélation des rangs de Spearman: $r = -0,25$; 13 ddl; non significatif.

sur la Figure 2 et la dose de chloroquine a été également notée de 1 à 5 (elle correspond ici à des concentrations de 3,6 à 43,2 $\mu\text{mol/l}$). Le coefficient de corrélation des rangs de Spearman est de $-0,713$ (16 ddl; $p < 0,0001$).

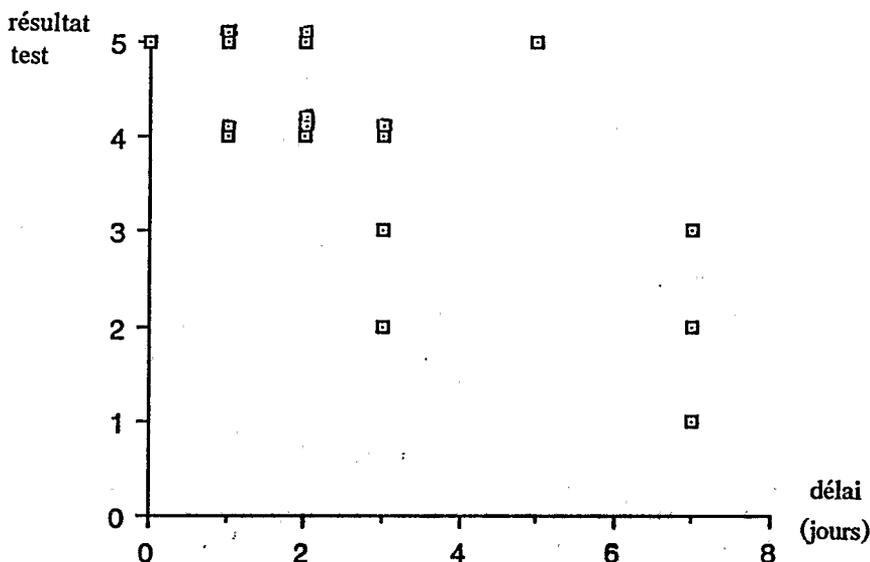


Figure 2.

Résultats des dosages de chloroquinurie en fonction de la date de prise de la prophylaxie (méthode HMM II, N = 18). Le résultat du test est noté de 1 à 5 en fonction du tube de la gamme dont la couleur se rapproche le plus de celle du tube testé.
 Test de corrélation des rangs de Spearman: $r = -0,71$; 16 ddl; $p < 0,0001$.

Coût et simplicité d'utilisation

Le dichlorométhane étant très volatil, les tubes ne peuvent être agités simultanément dans la méthode de Bergqvist et l'ensemble de la procédure nous a pris 5 minutes par examen sur la base de 20 tests, en disposant d'une centrifugeuse.

L'emploi du chloroforme comme solvant permet, pour la méthode HMM II, le retournement simultané d'une vingtaine de tubes et chaque examen nous a pris, sur la base de 20 tests, 30 secondes environ, sans nécessiter d'appareillage particulier.

Il est très malaisé, dans le cas de la méthode de Bergqvist, de distinguer à l'œil nu le tube de référence (pas de chloroquine) du premier tube de la gamme. Cette distinction est beaucoup plus facile à faire dans le cas de la méthode HMM II.

Enfin, les réactifs utilisés dans la méthode de Bergqvist sont d'un coût plus élevé que les réactifs de la méthode HMM II (prix de revient d'un examen: 0,44 FF contre 0,14 FF — références catalogues SIGMA et SDF 1990).

Discussion

Nous avons comparé les deux techniques diagnostiques (Bergqvist et HMM II) à l'occasion de leur utilisation sur le terrain; le schéma expérimental utilisé n'a pas été conçu dans ce but, ce qui explique le nombre relativement faible d'individus explorés et l'impossibilité de réaliser des tests sur séries appariées pour comparer la sensibilité et la spécificité des deux méthodes. Par ailleurs, certaines remarques peuvent être faites.

Diagnostic de référence

Les résultats exposés ci-dessus supposent que toutes les femmes testées ont correctement suivi le protocole (selon qu'elles appartenaient au groupe traité ou au groupe témoin); or c'est précisément pour détecter les écarts éventuels au protocole que les deux tests ont été pratiqués.

Nous disposions, avec l'interrogatoire des femmes en-dehors de la présence des enquêteurs, d'un autre moyen de vérification de l'observance du traitement. Une des femmes interrogées a déclaré recevoir de la chloroquine d'un des enquêteurs alors qu'elle appartenait au groupe témoin; elle a été exclue de l'analyse. Pour toutes les autres femmes, l'interrogatoire était en accord avec le schéma prophylactique qui leur avait été attribué au départ. Les femmes ne pouvaient manifestement pas ignorer leur appartenance à l'un ou l'autre groupe et la prise des comprimés était contrôlée par les enquêteurs chargés de leur distribution. Par ailleurs, les enquêteurs n'étaient pas mis au courant de la date des contrôles et ils n'y participaient pas; ils ne pouvaient donc pas orienter les réponses des femmes lors des interrogatoires. L'inclusion dans un groupe, confirmée par les données de l'interrogatoire a donc été prise comme critère de référence de la prise de chloroquine.

Ces données étaient du reste en parfait accord avec les résultats des tests diagnostiques lorsque ceux-ci étaient simultanément positifs ou négatifs.

Pour ce qui est des résultats discordants entre les deux tests, dans quatre cas, la méthode de Bergqvist a donné un résultat négatif alors que la femme disait suivre une prophylaxie (et faisait partie du groupe traité). Les données de l'interrogatoire ont montré qu'il s'agissait pour trois femmes d'une prise ancienne du médicament (7 jours); pour une seule, la prise était relativement récente (3 jours). Les résultats de la méthode de HMM II étaient modérément positifs (de l'ordre d'une dizaine de $\mu\text{mol/l}$). Toutes ces situations sont compatibles avec un défaut de sensibilité de la méthode de Bergqvist.

Cinq femmes ont dit ne pas suivre de prophylaxie (et faisaient partie du groupe témoin) alors qu'une des deux méthodes donnait un résultat positif. Il s'agissait dans deux cas d'une positivité de la méthode HMM II

correspondant à une concentration de chloroquine très faible (de l'ordre de $4 \mu\text{mol/l}$) et dans les trois cas restants d'une positivité de la méthode de Bergqvist, également à des concentrations faibles (entre 0 et $25 \mu\text{mol/l}$). Les cinq femmes ont été réinterrogées et ont confirmé l'absence de prise du médicament. Il est hautement probable que ces cinq cas correspondent à un défaut de spécificité d'une ou des deux méthodes.

Seuil de sensibilité

Les gammes de référence explorées par les deux tests correspondent à des concentrations beaucoup plus faibles pour la méthode de HMM II que pour la méthode de Bergqvist (la concentration de chloroquine correspondant au premier tube étant de $3,6 \mu\text{mol/l}$ pour la première et de $25 \mu\text{mol/l}$ pour la seconde). Si l'on en croit Bergqvist (4), l'administration orale de 5 mg/kg de chloroquine donne des concentrations urinaires de l'ordre de $25 \mu\text{mol/l}$ après 8 jours et 15 à $20 \mu\text{mol/l}$ après 14 jours; il semble donc que la méthode de HMM II dont le seuil est plus bas soit mieux adaptée au dosage de la chloroquine urinaire chez les sujets prenant des doses prophylactiques que la méthode de Bergqvist, probablement mieux appropriée pour des doses thérapeutiques. Cette différence de seuil explique bien la différence de sensibilité constatée entre les deux méthodes.

En conclusion, la valeur diagnostique (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative) de la méthode de HMM II semble meilleure que pour la méthode de Bergqvist; elle est en outre plus rapide et plus simple à utiliser et son prix de revient est moindre. Elle apparaît donc comme la plus appropriée à l'utilisation sur le terrain.

Remerciements — Les auteurs tiennent à remercier les Drs J.D. Sexton et F. Churchill, des Centres for Disease Control d'Atlanta, pour leur aide dans la mise au point de la méthode HMM II. L'essai contrôlé de prophylaxie a été réalisé grâce à un financement de l'INSERM (Réseau Nord-Sud n° 486 NS 2) et la chloroquine (Nivaquine Forte) a été gracieusement fournie par les laboratoires SPECIA.*

Comparison of two methods for field assay of chloroquine in urine.

Summary — Two methods of chloroquinuria assay were tested in pregnant women in the town of Banfora (Burkina Faso): the method with bromothymol blue (Bergqvist) and the method with methyl-orange (Haskins and Mount or HMM II). Urinary assay of chloroquine was performed with both methods in 45 women chosen at random whether or not under chemoprophylactic treatment (21 taking a weekly prophylaxis of 300 mg of chloroquine, and 24 controls).

The HMM II method proved to be more sensitive (100 %) and more specific (91,7 %) than the Bergqvist method (80,9 % and 83,3 % respectively); it was also more reliable with regard to positive (91,3 % versus 80,9 %) and negative (100 % versus 91,3 %) predictive values. Moreover, the quantitative appreciation of the levels of chloroquine excretion proved to be superior with the HMM II method. Finally, this method is faster to perform, easier to use and cheaper, making it the method of choice for field assay of chloroquine in urine.

Vergelijking van twee methoden van chloroquine dosering in urine op het terrein.

Samenvatting — Twee methoden voor de dosering van chloroquinurie werden getest bij zwangere vrouwen in Banfora (Burkina Faso); de methode met bromothymol blauw (Bergqvist) en de methode met helianthine (Haskins en Mount of HMM II). Beide methoden werden uitgevoerd bij 45 at-random gekozen vrouwen, waarvan 21 een wekelijkse dosis van 300 mg chloroquine namen en 24 controles zonder chemoprophylaxis.

De HMM II methode bleek meer gevoelig (100 %) en meer specifiek (91,7 %) dan de Bergqvist methode (respectievelijk 80,9 % en 83,3 %; ze is ook meer betrouwbaar op het vlak van de positieve (91,3 % tegen 80,9 %) en de negatieve (100 % tegen 91,3 %) predictieve waarde. Bovendien was de kwantitatieve appreciatie van de afgescheiden chloroquine superieur met de HMM II methode.

Tenslotte is deze methode sneller, eenvoudiger en goedkoper, waardoor het de aangewezen methode is voor de dosering van chloroquine in de urine op het terrein;

Reçu pour publication le 13 août 1990.

REFERENCES

1. Bergqvist Y., Hed C, Funding L, Suther A: Determination of chloroquine and its metabolites in urine: a field method based on ion-pair extraction. Bull. WHO, 1985, 63, 893-898.
2. Haskins WT: A simple qualitative test for chloroquine in urine. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1958, 7, 199-200.
3. Mount DL, Patchen LC, Williams SB, Churchill FC: Colorimetric and thinlayer chromatographic methods for field assay of chloroquine and its metabolites in urine. Bull. WHO, 1987, 65, 615-623.
4. Rombo L, Bergqvist Y, Hellgren U: Chloroquine and desethylchloroquine concentrations during regular long-term malaria prophylaxis. Bull. WHO, 1987, 65, 879-883.