

**RAPPORT D'UNE ETUDE POUR LA PARTICIPATION
AU CONCOURS DU PRIX DE TRAVAIL DE TERRAIN
DANS UN PAYS A RESSOURCES LIMITEES**

Titre:

**Evaluation du Test de Diagnostic Rapide du paludisme
(Malaria Ag *P.f* HRP2/pLDH (3 BANDES)) en République du Congo**

Auteurs : **AKIANA Jean**, MOKONDJIMOBÉ Etienne, BOKILO DZIA LEPCFOUNDOU
Amélia et Pr Henri-Joseph PARRA

Adresse des correspondances: AKIANA Jean, B.P: 120, Laboratoire National de Santé
publique de Brazzaville (République du Congo), E-mail : jeakiana2000@yahoo.fr,
Tél.: 00242 05 531 75 91/ 00242 05 531 75 91

Résumé: Dans la prise en charge du paludisme dans les pays subsahariens qui croupissent sous le poids d'une grande endémicité, l'un des problèmes qui se posent avec acuité reste les difficultés de faire rapidement et efficacement le diagnostic biologique pour orienter le traitement. En effet, les structures de santé en milieu rural manquent souvent les techniciens formés au bon diagnostic microscopique et l'alternative pourraient y être l'utilisation des Tests de Diagnostic Rapide (TDR) qui ont une bonne sensibilité et une spécificité démontrée. Malaria Ag P.f HRP2/pLDH (3 BANDES) nous a semblé le bon test qui devrait contribuer à corriger ce manque de technologie de diagnostic biologique dans les zones rurales où le diagnostic microscopique est difficile. Avec sa bande T2 qui permet de rechercher la présence de la protéine pLDH, qui disparaît quand le traitement est efficace et fait disparaître le *Plasmodium falciparum*, il est possible d'en faire un bel outil de contrôle de l'efficacité des antipaludiques au cours des traitements du paludisme à *Plasmodium falciparum*.

C'est pourquoi, nous avons réalisé l'évaluation de ce TDR en République du Congo où l'endémicité du paludisme était en baisse considérable à partir de 2005. Cela nécessitait donc une étude préliminaire pour pouvoir identifier les sites qui n'ont pas un faciès hypoendémique afin de faciliter le recrutement des malades sans lesquels aucune évaluation n'est possible. A l'issue de celle-ci, Gamboma, Ollombo, Oyo et Owando, aussi bien sur l'approche entomologique, épidémiologique que parasitologique, se sont révélés comme des sites aux faciès hypoendémiques. Pour cela, Ouesso dans la sangha et Tanry dans la likouala, avec, respectivement 13% et 17,60% de prévalence en population ont été retenus comme sites d'évaluation du TDR.

L'évaluation du TDR a consisté à réaliser une Goutte épaisse et un TDR à tous les sujets reçus en consultation dans les structures de santé de Ouesso et de Tanry et traiter ceux qui ont les TDR positifs pendant trois jours avec les combinaisons d'artesunatt-Amodiaquine. Revoir ce sujets à J3, J7, J17, J14, J21, J28 et J35, en leur prélevant, chaque fois, un TDR et une goutte. Les TDR ont montré un taux d'infection palustre de 74,66% (327/438) sur l'ensemble des sites d'étude. Au moyen de la Goutte épaisse, le taux de l'infection palustre ou l'indice plasmodique a été de 73,30% (321/438) ; 2,30% de l'indice plasmodique du à *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae* n'a pas été observé dans notre population d'étude. En considérant essentiellement *Plasmodium falciparum*, l'indice plasmodique a été de 71% (311/438). La densité parasitaire observée avait une moyenne de 480 parasites/ μ l de sang, un minimum de 80 parasites/ μ l de sang et un maximum de 292000 parasites/ μ l de sang à J0.

Nous avons noté une corrélation entre la parasitémie à la goutte épaisse et le résultat du TDR observé à partir du trait de la protéine pLDH. L'HRP2 baisse plus lentement par rapport à la parasitémie microscopique et la présence de la protéine pLDH observée au TDR. Même pour les faibles densités parasitaires au microscope, le trait pLDH est apparu, donc, l'identification de cette protéine ne dépend pas de la densité parasitaire. De manière générale, le test Malaria P.f. Ag HRP2/pLDH a présenté, dans le diagnostic de l'infection palustre à *Plasmodium falciparum* et par rapport à la goutte épaisse, une sensibilité de 97,76%, soit 98,02% par HRP2 et 97,50% par pLDH. Le TDR a une spécificité de 100% aussi bien en combinant l'HRP2 et la pLDH qu'en les prenant séparément lors de la recherche de l'infection palustre à *Plasmodium falciparum*.

La protéine pLDH fait que ce TDR peut permettre de suivre l'efficacité des antipaludiques lors du traitement de paludisme, même là où l'on ne dispose pas du diagnostic microscopique. En somme, son utilisation dans les structures de santé peut constituer une première moyen efficace et simple dans la surveillance de l'émergence des résistances de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques.

Mots clés: Paludisme, diagnostic, TDR, *P. falciparum*, antipaludiques, République du Congo

1. Introduction

Avec la mise en œuvre de nombreuses stratégies de lutte antipaludiques, la morbi-mortalité a considérablement baissé. En effet, la forte accélération de la distribution de moustiquaires dans le monde, l'extension des programmes de pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des bâtiments et l'accès accru à un traitement rapide du paludisme ont réduit les taux de mortalité attribuables à cette maladie de plus d'un quart au niveau mondial et d'un tiers en Afrique depuis 2000. Mais le maintien du rythme de progression actuel ne suffira pas à atteindre les cibles mondiales en matière de lutte contre le paludisme.

Cependant, le paludisme se transmet encore dans 99 pays et représente toujours un très lourd fardeau pour les systèmes de santé de nombreux pays africains. Puisque l'on estime qu'en 2010, cette maladie, qu'il est tout à fait possible de prévenir et de traiter, a tué 655 000 personnes, dont environ 560 000 enfants, soit encore un enfant par minute.

C'est ainsi que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a invité instamment la communauté sanitaire mondiale à accroître encore les investissements pour lutter contre le paludisme dans le cadre de l'initiative dite en anglais des **3T: Test, Treat, Track [dépister, traiter, suivre]**. Les pays d'endémie doivent pouvoir dépister tout cas présumé de paludisme, traiter tous les cas confirmés au moyen d'antipaludiques de qualité vérifiée, et suivre la maladie grâce à des systèmes de surveillance ponctuels et exacts. Aujourd'hui, les systèmes de surveillance du paludisme ne détectent qu'un dixième du nombre de cas estimés au niveau mondial.

L'OMS appelle donc la communauté sanitaire mondiale à investir encore davantage dans les tests de diagnostic, les traitements et la surveillance du paludisme pour sauver plus de vies et faire un grand pas vers la réalisation, en 2015, des objectifs du Millénaire pour le développement liés à la santé.

Pour cela, les pays d'endémie devraient être en mesure de garantir que chaque cas suspect de paludisme fait l'objet **d'un test**, que chaque cas confirmé fait l'objet **d'un traitement médicamenteux de qualité** et qu'un **suivi de la maladie est assuré par des systèmes permettant une surveillance précise** en temps voulu.

C'est pourquoi, l'OMS a élaboré des orientations techniques pour les trois volets de l'initiative T3: Test. Treat. Track (Tester. Traiter. Tracer): elle a déjà publié des Directives pour le traitement du paludisme. Autrement, «tant que les pays ne seront pas en mesure de

dépister, de traiter et de notifier chaque cas de paludisme, nous ne viendrons pas à bout de cette maladie», avait déclaré le Dr Margaret Chan, à l'occasion d'une visite en Namibie à l'occasion de la Journée mondiale de lutte contre le paludisme. Bien entendu, cela passe par le fait que tous les pays d'endémie palustre et la communauté sanitaire mondiale doivent prendre un engagement politique ferme et durable pour mener cette lutte jusqu'à son terme. Il y'a de nombreux défis à relever dont les plus importants sont:

- Dans la moitié des pays d'Afrique où le paludisme est endémique, plus de 80% des cas sont encore traités sans test préalable. Quand les tests de diagnostic seront universels, les patients présentant un état fébrile recevront le traitement le plus approprié et les médicaments antipaludiques seront utilisés de manière rationnelle et correcte. Par exemple, les pays, comme le Sénégal, qui ont déjà généralisé les tests de diagnostic économisent des centaines de milliers de traitements chaque année.
- Dans de nombreux pays, l'accès aux antipaludiques s'est beaucoup amélioré. En 2010, les pouvoirs publics de 60 pays fournissaient gratuitement des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) à toutes les tranches d'âge de la population. Mais des millions de gens n'ont toujours pas accès à un traitement approprié. Il faut redoubler d'efforts afin de chaque cas confirmé de paludisme soit traité.
- Une meilleure surveillance des cas de paludisme et des décès causés par cette maladie aidera les pays à déterminer quelles sont les régions ou les catégories de la population les plus touchées. Elle permettra également aux ministères de la santé de repérer les résurgences de la maladie et de cartographier les nouvelles tendances et donc de tirer pleinement profit des programmes de prévention et de lutte. L'amélioration de la surveillance permettra aussi de mettre en œuvre plus efficacement les programmes internationaux.

L'initiative T3: Test. Treat. Track (Tester. Traiter. Tracer) vise donc à encourager les pays d'endémie et leurs partenaires à s'appuyer sur les succès remportés dans la prévention du paludisme au cours de la dernière décennie», comme le disait Dr Robert Newman, Directeur du Programme de lutte antipaludique de l'OMS. «Ces dernières années, on a beaucoup progressé dans la mise au point de nouveaux outils de diagnostic et de médicaments antipaludiques très efficaces. Le plus difficile est maintenant de faire en sorte que ces outils

soient utilisés et que les pays mesurent exactement leur impact sur la santé publique», avait-t-il ajouté.

En somme, il est important que les tests de diagnostic aient une sensibilité et une spécificité réelles et irréprochables pour que tous les cas de paludisme diagnostiqués et pris en charge. Pour s'assurer de leur sensibilité et spécificité de ces tests, il est important d'en faire l'évaluation dès leur fabrication et régulièrement au cours de leur utilisation. Cette évaluation, en plus d'être faite à l'échelle globale, doit être conduite dans des situations locales, à l'échelle des régions, des pays ou des départements, afin de savoir quel test est adapté aux conditions réelles d'un site.

C'est dans ce contexte mondial qui exige l'utilisation des outils de diagnostic fiables, simples et pratiques que, le Laboratoire National de Santé Publique (LNSP), en collaboration avec l'Université Marien NGOUABI (U.M.NG) de Brazzaville, ont résolu d'évaluer le Test de Diagnostic Rapide de Standard Diagnostique à trois bandes (CONTROLE/HRP2/PLDH), en République du Congo.

2. Contexte et justification

Le paludisme est jusqu'ici la maladie parasitaire la plus redoutable et de loin la plus mortelle des pays tropicaux. Il est établi que sa prise en charge pour se conformer aux recommandations de l'OMS nécessite un diagnostic rapide et fiable pour espérer un traitement précoce et une guérison certaine.

De même, les nombreux TDR disponibles dans le commerce sont répartis en deux catégories. Il est à noter qu'un groupe de TDR détecte seulement l'antigène HRP2 tandis que le second prévoit la détection de l'antigène HRP2 et de l'enzyme pLDH sur la même bandelette. Il a été démontré, de manière générale, que l'antigène HRP2 de *P. falciparum* demeure dans la circulation sanguine pendant une longue période après la clearance parasitaire, ce qui entraîne des faux positifs et limite la spécificité. À l'inverse, l'enzyme pLDH disparaît rapidement de la circulation sanguine, devenant indétectable quasiment au même moment où les frottis sanguins deviennent négatifs après un traitement contre le paludisme. Par conséquent, lorsqu'il s'agit d'évaluer la réussite d'un traitement efficace contre le paludisme, notamment en présence de fièvre, il a été rapporté que les tests reposant sur la pLDH s'avèrent mieux adaptés car ils deviennent négatifs peu après que le parasite ait été éliminé du sang. L'enzyme

pLDH présente également d'autres avantages : elle n'est affectée ni par l'effet de prozone ni par les délétions de gènes pfhrp2. Au Congo Brazzaville, l'utilisation des Tests de Diagnostic Rapide (TDR) devrait faire partie des stratégies à mettre en œuvre pour être conforme à l'une des prescriptions essentielles de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) portant sur «le diagnostic précoce» de l'infection palustre pour sa prise en charge thérapeutique rapide, ciblée et efficace. Or, le diagnostic au microscope optique n'est pas possible sur l'ensemble du pays en raison des difficultés d'ordre matériel (manque de microscope dans certains centres de Santé Intégrés ou CSI), d'ordre humain (les techniciens de laboratoire parfois absents ou en nombre insuffisant dans les CSI (Centre de Santé Intégrés) et parfois le manque de formation en matière de diagnostic au microscope du paludisme là où il y'a de rares techniciens de laboratoire. Les TDR sont réputés d'usage facile après une formation qui n'exige pas des pré-requis spécifiques. C'est pour cela que le Congo qui met en place les politiques de gratuité de la prise en charge du paludisme préconise l'utilisation des TDR pour favoriser le diagnostic précoce de cette infection. Comme la commercialisation de ces tests de diagnostic est proposée aux pays par plusieurs fabricants, identifier ceux qui sont vendus bon marché et qui soient fiables (sensibles et spécifiques) devient très nécessaire. C'est de cette manière qu'il sera donné les chances de réussite à ces stratégies de diagnostic du paludisme conduites par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP).

Dans le contexte du Congo, la réalisation d'une étude de validation de ce TDR, susceptible d'aider à diagnostiquer des infections palustres récentes est, pour le Laboratoire National de Santé Publique (LNSP), l'Université Marien NGOUABI et pour Standard Diagnostic, une contribution importante pour la réussite des initiatives de lutte antipaludique. Ce travail se réalise dans le contexte où les prévalences de l'infection palustre en population et la morbidité de cette maladie en milieux hospitaliers sont devenues très faibles au République du Congo.

3. Objectifs

3.1. Objectif Général

Evaluer et valider la sensibilité et la spécificité du test SD Bioline Malaria Ag *P.f* HRP2/pLDH (3 BANDES), test ayant une bande pLDH *P. falciparum* spécifique plus une bande HRP2 spécifique et pouvant détecter simultanément l'antigène HRP2 et l'enzyme pLDH spécifique du *P. falciparum* afin de choisir pour le pays un TDR de bonne qualité (sensible et spécifique) et adapté.

3.2. Objectifs spécifiques

- Comparer tous les résultats des échantillons de sang positifs et négatifs au test rapide Malaria Ag *P.f* HRP2/pLDH (3 BANDES) aux résultats issus de la lecture des Gouttes Epaissees (GE) au microscope optique ;
- Estimer la spécificité du test rapide (Malaria Ag *P.f* HRP2/pLDH (3 BANDE) en comparant les résultats positifs (dont les espèces plasmodiales auront été identifiées au microscope) ou négatifs à ce test à ceux issus de la lecture des Gouttes Epaissees (GE) au microscope optique ;
- apprécier la sensibilité du test rapide (Malaria Ag *P.f* HRP2/pLDH (3 BANDE) en comparant les résultats positifs ou négatifs de ce test à ceux issus de la lecture des Gouttes Epaissees (GE) au microscope optique ;
- Evaluer la valeur potentielle du test SD Malaria Ag *P.f* (HRP2/pLDH) dans le cadre de la surveillance de l'efficacité d'un traitement médicamenteux à base d'ACT;
- Apprécier la différence du seuil de détection de l'infection palustre selon que le diagnostic vise la mise en évidence de la parasitémie due aux espèces plasmodiales (observation microscopique) ou les anticorps et ou d'autres antigènes (test SD Malaria Ag *P.f* (HRP2/pLDH)).

4. Période et sites d'étude

Pour réaliser ce travail, entre 2012 et 2013, nous avons estimé nécessaire de lui consacrer deux phases :

- ☞ La réalisation d'une enquête préliminaire de prévalence en population à travers un passage transversal dans six (06) sites au Centre et au Nord de la République du Congo où la saison des pluies était en cours. Cette pré-enquête, associée à l'étude de la transmission par capture et identification des anophèles, visait à faire le choix des sites où les prévalences sont élevées et susceptibles d'avoir une morbidité importante pouvant favoriser l'évaluation des TDR ;
- ☞ La conduite d'une étude de morbidité dans les seuls sites ayant des prévalences en population de l'infection palustre qui soient élevées. C'est ainsi que l'on pouvait contourner le manque des sujets malades.

C'est dans ces conditions que nous avons réalisé l'enquête de prévalence en population en 2012 et l'étude de la morbidité en milieu hospitalier en 2013.

4.1. Lieux d'étude

Carte1: Carte de la république du Congo montrant les sites où les différentes études ont été réalisées



Tableau1: Codes et Numéros des sites d'étude indiquant leur emplacement sur la carte1

Localité site d'étude	Code	Département	situation sur la carte1	Distance estimée du site par rapport à Brazzaville
Gamboma	Gam	Plateaux	1	375 Km
Ollombo	Oll	Plateaux	2	440 Km
Oyo	Oyo	Cuvette centrale	3	445 Km
Owando	Owa	Cuvette centrale	4	550 Km
Nzalangoye (Ouessou)	Nza	Sangha	5	900 Km
Tanry (Ipendja)	Tan	Likouala	6	1400 Km

4.1.1. Sites urbains

4.1.1.1. Ouesso

Ouessou est le chef lieu du département de la Sangha. Ouesso est à la fois une mairie de communauté urbaine et capitale d'une préfecture regroupant la ville de Ouesso et le département de la Sangha rurale. Selon les estimations démographiques de l'année 2012, cette ville compte 31 062 habitants. Par le relevé de sa position géo-spatiale, à partir du point de la ville appelé «Place rouge», Ouesso est situé à 1° 36' 42.38" de Latitude Nord et 16° 3' 7.02" de Longitude Est. C'est la plus grande ville du Congo située dans l'hémisphère nord, au-delà de la ville de Makoua qui est située à l'équateur. Ouesso est situé au bord de la rivière Sangha et entouré d'une immense forêt boréale (Photo 4). A l'intérieur de la ville, on note la présence des ruisseaux permanents comme celui qui traverse le quartier Nzalangoye.

Les régimes hydrologiques sont étroitement liés aux régimes pluviométriques dont ils suivent les variations. De ce point de vue, les unités hydrologiques se superposent aux unités climatiques en ce qui concerne les caractères généraux. C'est ainsi que Ouesso et la préfecture de la Sangha que cette ville coiffe sont placés sous l'influence du régime hydrogéologique

équatorial de transition boréale. Ce régime équatorial de transition boréale est caractérisé par deux périodes de basses eaux, de janvier à avril et de juillet à août, séparées par une petite période de hautes eaux de mai à juin et une grande période de hautes eaux de septembre à décembre. Ce régime est celui des rivières Sangha qui borde Ouesso et Oubangui ainsi que de leurs affluents qui drainent les deux tiers de la forêt inondée du Nord-Congo. Dans cette zone, les débits spécifiques sont de l'ordre de $101\text{m}^3/\text{s}/\text{km}^2$. Les crues exceptionnelles sont de faible importance (Graphique1).

Dans le cadre de la l'exécution de nos protocoles d'études, il a été institué à Ouesso un site (01) site d'étude au quartier Nzalangoye en 2012 et deux (02) sites d'étude en 2013 sites d'étude en 2013 (pour l'étude de la morbidité):

au quartier Nzalangoye pour réaliser les enquêtes de prévalences en population et les enquêtes entomologiques en 2012 ;

au CSI de Nzalangoye et à l'hôpital de base de Ouesso qui ont servi de cadres d'étude de la morbidité en milieux hospitaliers lors de l'étude 2013.

En résumé, nos différentes études ont été réalisées dans deux (02) arrondissements de Ouesso, à savoir :

- Nzalangoye (site du CSI de Nzalangoye) ;
- Centre ville (Site de l'hôpital de base de Ouesso).

Dans les deux structures de santé de ouesso, nous avons réalisé les observations cliniques lors de l'inclusion des sujets dans le service du triage de l'hôpital de base et au CSI de Nzalangoye pour suspicion d'accès palustre et afin d'apprécier la morbidité attribuable au paludisme. Dans le quartier Nzalangoye, nous avons réalisé une étude transversale de prévalence en population auprès des sujets asymptomatiques.

4.1.1.1.1. Site pour les études de prévalence en population et d'entomologie

Le quartier Nzalangoye est celui qui abrite le CSI. C'est ce quartier qui a servi de cadre pour des études transversales de prévalence en population en 2012 ainsi que des études d'entomologie en 2012. Ce site et le CSI sont dans la même aire géo-spatiale. Ce choix a été aidé fait pour les mêmes les mêmes raisons que partout évoquées ailleurs, c'est-à-dire la

proximité permet d'apprécier les résultats de l'étude de la morbidité en les superposant géo spatialement aux résultats aux prévalences en population et d'observations entomologiques en préservant ces interprétations des ambiguïtés que pourrait induire la discontinuité spatiale. En effet, ce site est dans un quartier périphérique et populaire de forte densité démographique dans la ville de Ouesso. Les habitations sont en général couvertes de toits en tôles ondulées ou en tuiles sauvages et des murs tantôt en briques tantôt en planches ou en terre battue. Le quartier est très insalubre et traversé de part en part par un ruisseau permanent. En saison des pluies, les mares d'eau stagnantes sont fréquentes. Ses sols sont latéritiques argileux colorés de rouge à jaune.

Graphique1 : Régime hydrologique équatorial de transition boréale de la Sangha à Ouesso (période 1948-1993) (source: Editions du jaguar : Atlas Congo)

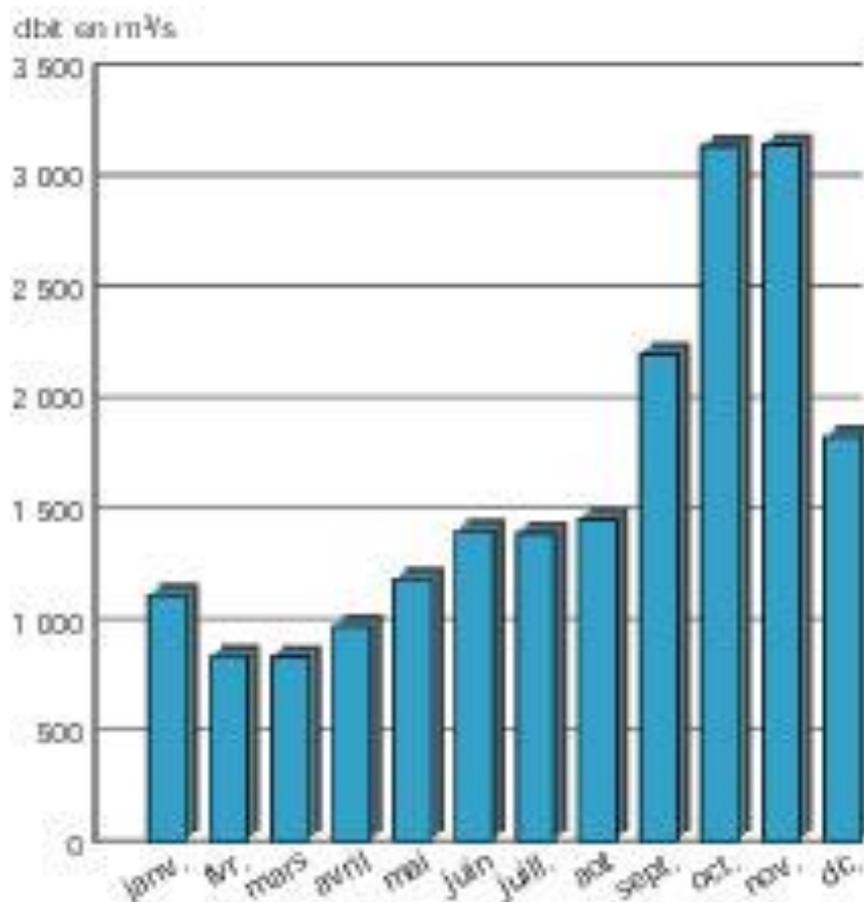




Photo3 : Carte de Ouesso vue au satellite et montrant la limite de la ville au Nord-Est avec la rivière Sangha et la forêt boréale à l'Est ainsi que quelques quartiers centre et périphérique

4.1.1.2. Owando

Owando est une ville à 545 Km, au nord de Brazzaville. Sa position géo-spatiale prélevée à un point central de l'agglomération indique **0° 28' 59.98" de Latitude Sud** et **15° 54' 0.35" de Longitude Est**. Chef lieu du département de la cuvette centrale, Owando comptait, en 2012, 26 635 habitants. Situé à 75 Km de l'équateur qui passe par la ville voisine de Makoua, Owando est dans un département marquée par les vasières très étendues. De ce point de vue, la ville est sous le régime hydrologique équatorial pur (Carte 2, ❶ régime équatorial) qui se caractérise par deux périodes de basses eaux équivalentes (de janvier à mars et de juillet à septembre) et de deux périodes de hautes eaux sensiblement de même importance (d'avril à juin et d'octobre à décembre). La deuxième période de hautes eaux est légèrement plus importante que la première. Ce régime intéresse la partie sud de la forêt inondée du Nord-Congo (rivières Likouala-Mossaka et Ngoko). Les débits spécifiques varient de 16 à

201/s/km² du nord au sud. Les étiages sont de l'ordre de 5 à 71/s/km², tandis que les crues peuvent atteindre 35 à 50 1/s/ km² (Graphique 6). Cette tendance a été également observée plus récemment par Moukolo et Gaye à la station de Makoua (Graphique 3, Graphique4)

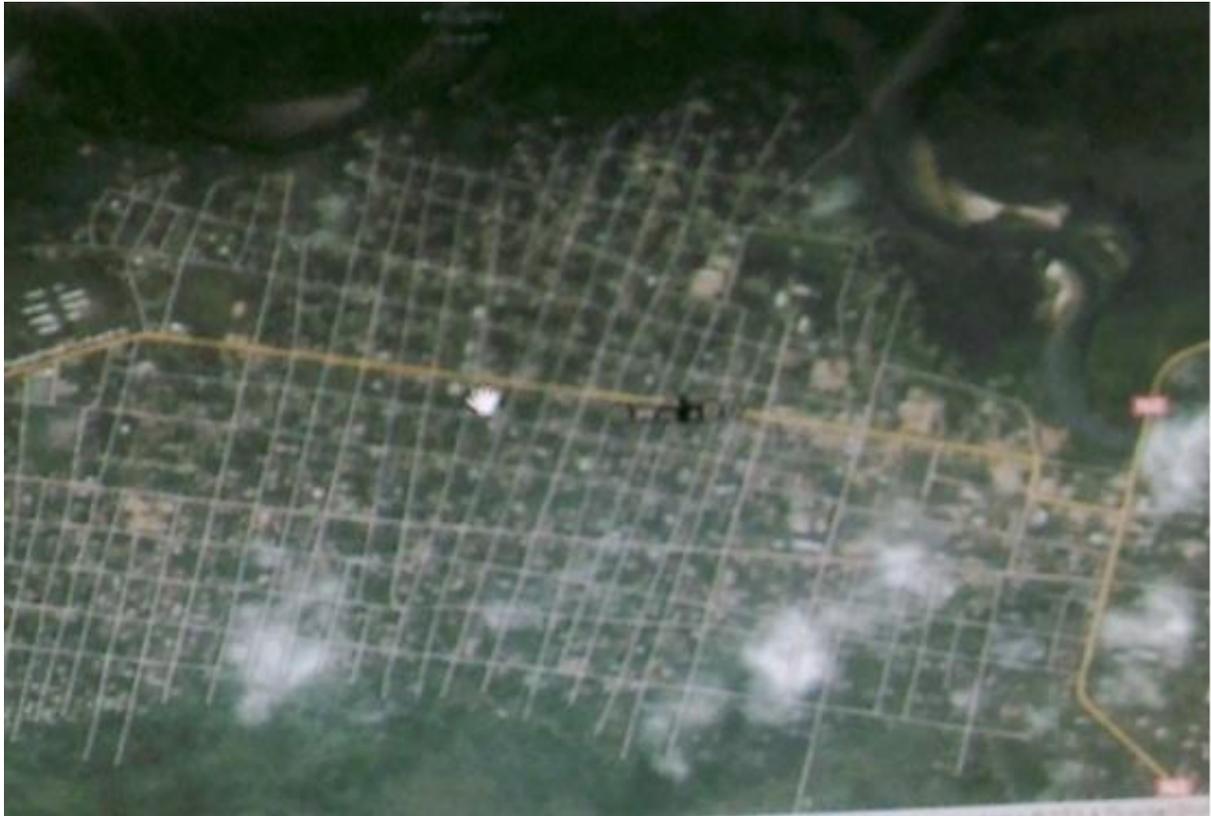
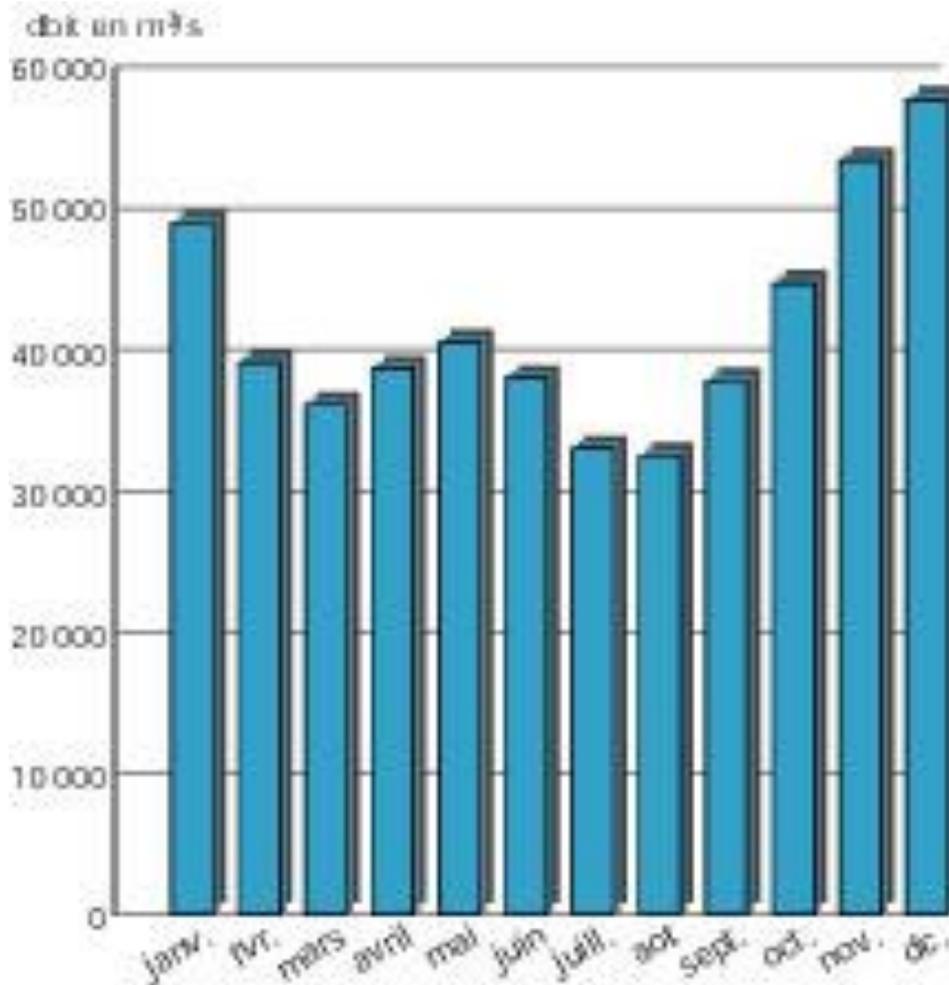
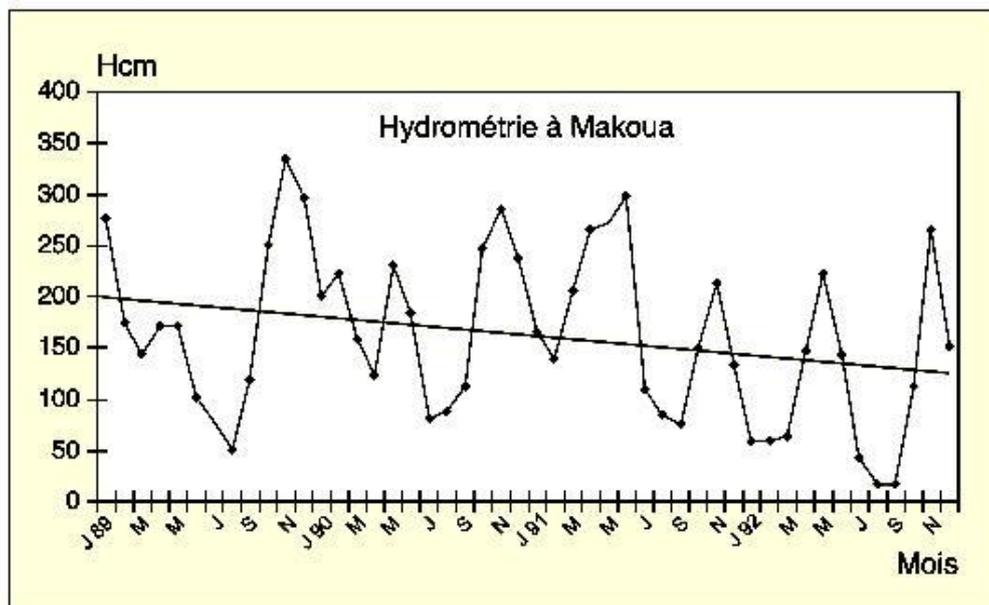


Photo4 : Carte d'Owando vue au satellite et montrant la limite de la ville au Nord avec la rivière Kouyou et les forêts galleries ainsi que quelques quartiers centre et périphérique

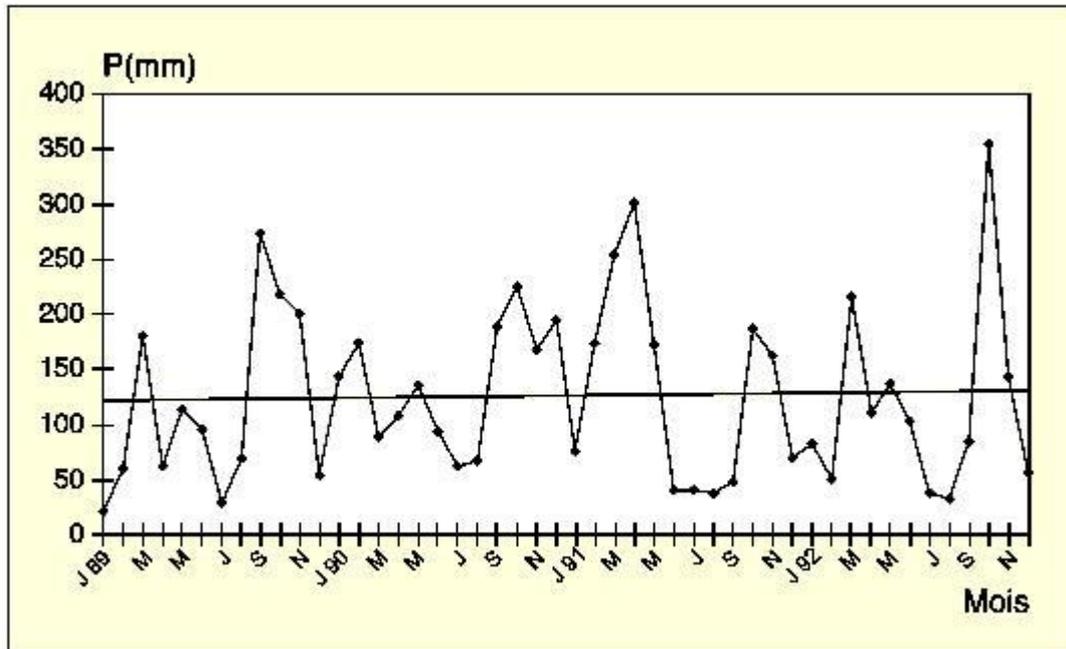
Graphique 2 : Régime hydrologique équatorial pur de la Likouala Mossaka à Makoua (période 1952-1994) (source: Editions du jaguar : Atlas Congo)



Graphique 3 : Variation des hauteurs d'eau à la station de Makoua [Figure3 (Moukolo et Gaye, 2003)]



Graphique 4 : Courbe de variation de la pluviométrie à la station de Makoua.
 [Figure2 (Moukolo et Gaye,2003)]



4.1.2. Sites ruraux

4.1.2.1. Gamboma

Gamboma est une agglomération qui comptait 11 207 habitants en 1984, 16 000 habitants en 1996. Sa population en 2005 était estimée 20 877 habitants environ.

Située dans le département des plateaux, au centre du pays, Gamboma a été un site du milieu rural, mais pouvant être considéré comme sémi-urbain, du fait de sa grande démographie. La localité est bordée par la rivière Nkéni et fortement influencée par le domaine de la savane herbeuse et arborescente, mais marquée par la présence des forêts galerie (**Photo 5**). Le prélèvement de sa position géo-spatiale réalisé sur un point central du site montre que cette agglomération est situé à **1° 52' 12.53" de Latitude Sud** et **15° 52' 55.13" de Longitude Est**. Son élévation par rapport au niveau moyen de la mer est égale à 366 mètres d'altitude. Gamboma est sous l'influence du régime hydrologique subéquatorial (**Graphique 5**). Il prévaut au centre du pays, dans les plateaux Batéké (**Carte 3**). Il présente les traits suivants : précipitations relativement importantes (1 600 à 2 500 mm), un rythme pluviométrique marqué par deux saisons sèches (janvier ou février et juin à août) et deux saisons des pluies avec des pointes en mars ou avril et en novembre, une irrégularité des pluies interannuelles modérée (15 à 25 %), une fréquence des précipitations élevée (plus de 100 jours de pluies

partout), des températures comprises entre 22 et 25 °C avec des amplitudes annuelles et diurnes assez faibles et enfin une humidité relative forte toujours supérieure à 80 % (Samaba Kimbata, 1992 ; Moukolo et Gaye, 2003).

En effet, les relevés pluviométriques qui ont été effectués trois fois par jour ont permis, après un traitement statistique des données, d'apprécier la variabilité des paramètres. On remarque que pendant la saison des pluies, de septembre à avril, les variations sont importantes ($0,31 < CV < 0,86$) comparées aux mois secs de juin, juillet et août ($0,19 < CV < 0,41$). L'absence quasi totale de précipitations pendant ces trois mois de l'année explique ces faibles coefficients de variation. Par ailleurs, la courbe de variation (**Graphique4**) montre une tendance quasi nulle. Celle-ci confirme le retour à la normale observé après la grande période déficitaire des années 1974-1982 (Sircoulon et Olivry, 1996 ; Moukolo et Gaye, 2003).



Photo5a

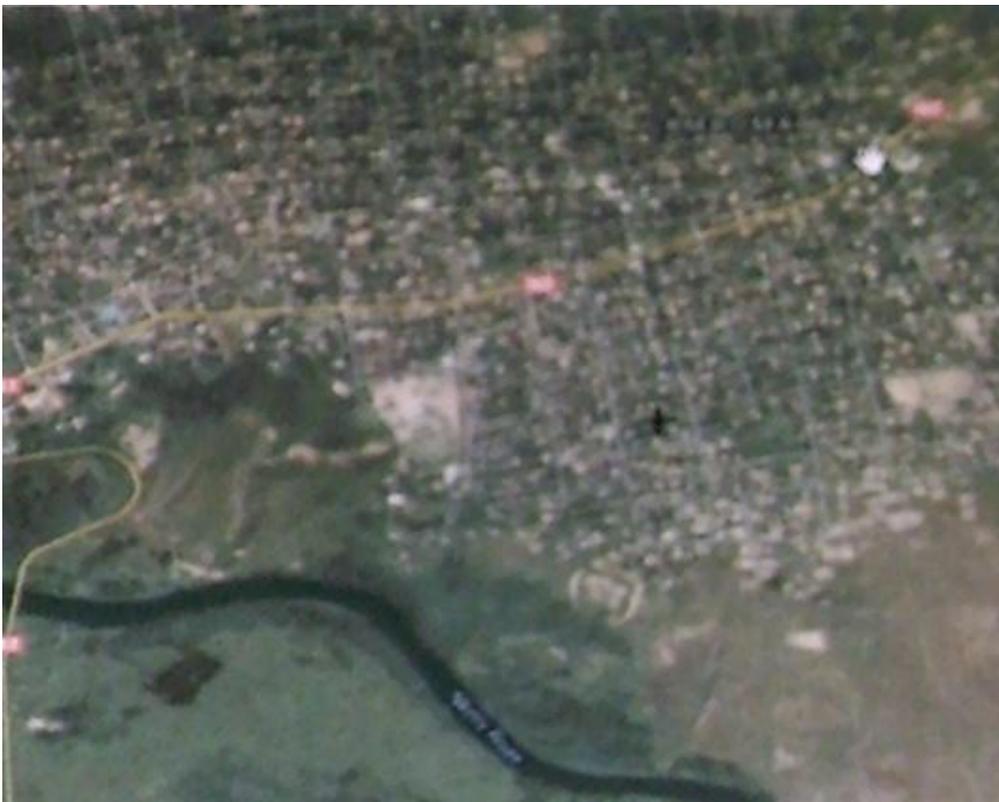


Photo5b

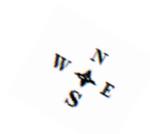
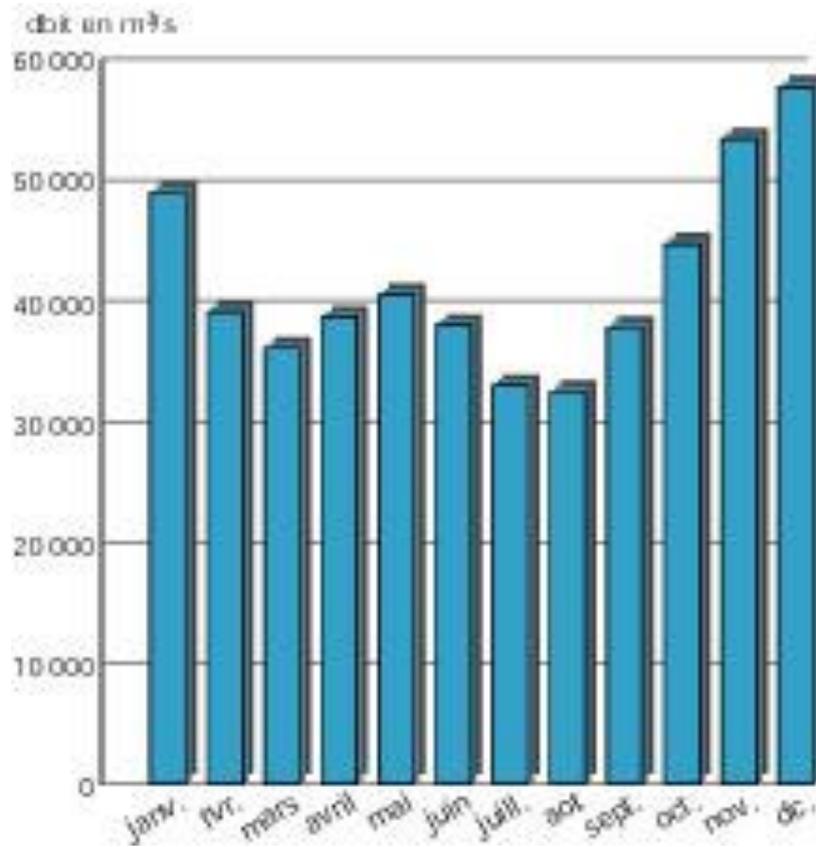
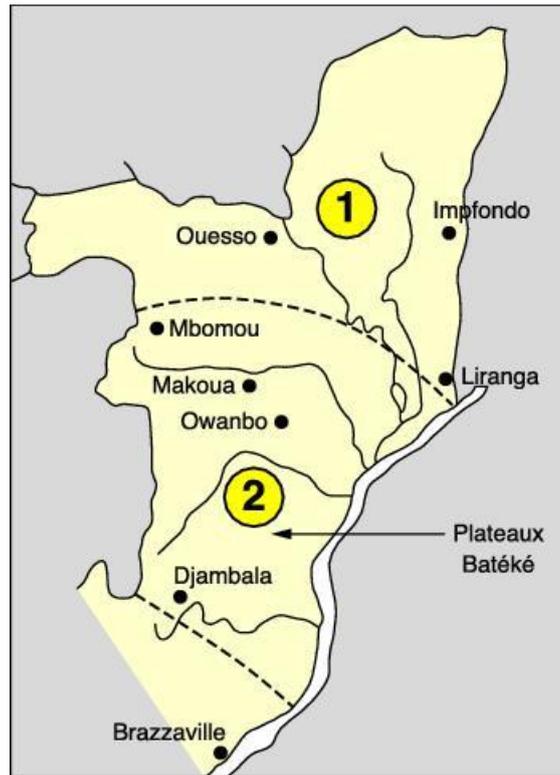


Photo5 : Carte de Gamboma vue au satellite et montrant la limite de la ville au Sud avec la rivière Nkéni (**Photo5b**) et les savanes alentours ainsi l'extension de ses quartiers périphériques (**Photo5a**)

Graphique 5: Régime hydrologique équatorial de transition australe - Le Congo à Brazzaville (période 1902-1996)





Carte 3: Nuances climatiques (❶ Régime équatorial et ❷ Régime subéquatorial)
(Samba Kimbata, 1992)

Dans le cadre de nos différentes études, deux sites y ont été retenus:

l'Hôpital de Référence (HR) de Gamboma où les observations cliniques en vue de l'étude de la morbidité étaient réalisées ;

le quartier Komo, proche de l'HR, où nous avons conduit les enquêtes de prévalences en population et les études entomologiques pour pouvoir évaluer la transmission du paludisme.

4.1.2.2. Ollombo

Ollombo est l'un des onze (11) districts du département des Plateaux, une commune urbaine qui comptait environ 5 420 habitants en 2012.

Ollombo a été un site du milieu rural situé à 5 Km de la rivière Alima qui le sépare de la ville d'Oyo dans la cuvette. C'est aussi le point de démarcation entre les départements des Plateaux et de la cuvette centrale. Ollombo est influencée par le domaine de la savane herbeuse et marécageuse ainsi que des galeries forestières qui entour la localité plantée sur un sable blanc (**Photo 7**), Le prélèvement de sa position géo-spatiale réalisé sur un point central du site montre que cette agglomération est situé à **1°16'0.11" de Latitude Sud** et **15°53'58.62" de Longitude Est**. Ollombo est sous l'influence du régime hydrologique subéquatorial (**Graphique 5**), comme les sites voisin de Gamboma et Djambala. Ce régime prévaut au centre

du pays, dans les plateaux Batéké (**Carte 3**). Il présente les traits suivants : précipitations relativement importantes (1 600 à 2 500 mm), un rythme pluviométrique marqué par deux saisons sèches (janvier ou février et juin à août) et deux saisons des pluies avec des pointes en mars ou avril et en novembre, une irrégularité des pluies interannuelles modérée (15 à 25 %), une fréquence des précipitations élevée (plus de 100 jours de pluies partout), des températures comprises entre 22 et 25 °C avec des amplitudes annuelles et diurnes assez faibles et enfin une humidité relative forte toujours supérieure à 80 % (Samaba Kimbata, 1992 ; Moukolo et Gaye, 2003).

Les relevés pluviométriques qui ont été effectués trois fois par jour ont permis de remarquer que pendant la saison des pluies, de septembre à avril, les variations sont importantes ($0,31 < CV < 0,86$) comparées aux mois secs de juin, juillet et août ($0,19 < CV < 0,41$). L'absence quasi totale de précipitations pendant ces trois mois de l'année explique ces faibles coefficients de variation. Par ailleurs, la courbe de variation (**Graphique4**) montre une tendance quasi nulle.



Photo 7 : Carte d'Ollombo vue au satellite et montrant le centre de la commune ainsi que l'extension de ses quartiers périphériques

Dans le cadre de nos différentes études à Ollombo, un site y a été retenu:

le quartier Marien NGOUABI, au Sud-Est, de part et d'autre de la localité, où nous avons conduit les enquêtes de prévalences en population et une étude entomologique pour pouvoir évaluer la transmission du paludisme.

4.1.2.3. Oyo

Oyo est l'un des neuf (9) districts du département de la cuvette centrale. En qualité de commune urbaine, la ville d'Oyo comptait environ 14 295 habitants en 2012.

Oyo a été un site du milieu rural à sémi-urbain, limité au Sud-Ouest par la rivière Alima dont la localité occupe la rive droite (**Photo 8b**). C'est aussi le point d'entrée dans le département de la cuvette centrale, au départ de Brazzaville. Oyo est influencée par le domaine de la savane herbeuse et marécageuse ainsi que des galeries forestières qui entourent la localité plantée sur un sable blanc (**Photo 8a**). Le prélèvement de sa position géo-spatiale réalisé à l'Hôpital de Référence d'Oyo (**Photo 8a**) montre que cette agglomération est située à **1°9'4.06" de Latitude Sud** et **15°58'20.96" de Longitude Est**. Oyo est sous l'influence du régime hydrologique subéquatorial (**Graphique 5**). Ce régime prévaut au centre du pays, jusque dans les plateaux Batéké (**Carte 3**). Il présente les traits suivants : précipitations relativement importantes (1 600 à 2 500 mm), un rythme pluviométrique marqué par deux saisons sèches (janvier ou février et juin à août) et deux saisons des pluies avec des pointes en mars ou avril et en novembre, une irrégularité des pluies interannuelles modérée (15 à 25 %), une fréquence des précipitations élevée (plus de 100 jours de pluies partout), des températures comprises entre 22 et 25 °C avec des amplitudes annuelles et diurnes assez faibles et enfin une humidité relative forte toujours supérieure à 80 % (Samaba Kimbata, 1992 ; Moukolo et Gaye, 2003).

Les relevés pluviométriques qui ont été effectués trois fois par jour ont permis de remarquer que pendant la saison des pluies, de septembre à avril, les variations sont importantes ($0,31 < CV < 0,86$) comparées aux mois secs de juin, juillet et août ($0,19 < CV < 0,41$). L'absence quasi totale de précipitations pendant ces trois mois de l'année explique ces faibles coefficients de variation. Par ailleurs, la courbe de variation (**Graphique 4**) montre une tendance quasi nulle.



Photo8a



Photo8b

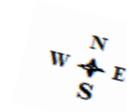


Photo 8 : Carte d'Oyo vue au satellite et montrant le centre de la commune, sa limite avec l'Alima ainsi que l'extension de ses quartiers périphériques

Dans le cadre de nos différentes études, deux sites y ont été retenus:

l'Hôpital de Référence (HR) d'Oyo où les observations cliniques en vue de l'étude de la morbidité étaient réalisées ;

le quartier Oya au Sud-Ouest de la localité, proche de l'HR, où nous avons conduit les enquêtes de prévalences en population et une étude entomologique pour pouvoir évaluer la transmission du paludisme.

4.1.2.4. Tanry ou Ipendja

C'est avant tout l'extension du village Macao dans le district de Dongou au Sud-Ouest du département de la Likouala. Ipendja est aussi le siège d'une société d'exploitation forestière (**Photo 9b**). Sa position géospatiale à relevée à Maca (**Photo 9a**) est **2°44'42.0" de Latitude Sud** et **16° 57' 57.9996" de Longitude Est**. Le district de Dongou, y compris ses circonscriptions rurales, comptait 19 365 habitants en 2012. La population de Macao élargie à Ipendja est estimée à 2 000 habitants. Notre site d'étude est bien drainé par les rivières Moutaba (**Photo 10a**) et son affluent Sombo (**Photo 10b**) qui sépare Ipendja populaire et Ipendja administratif. Ses sols rouges latéritiques retiennent les eaux de ruissellement et forment à volonté les gîtes larvaires (**Photo 11**).



Photo 9a



Photo 9b

Photo9: Village de Tanry à l'entrée (**Photo 9a**) et vu au niveau du quartier administratif (**Photo 9b**)



Photo 10a



Photo 10b

Photo 10 : Les rivières bordant le village de Macao (**Photo 10a**) et traversant le village de Tanry (**Photo 10b**)



Photo 11: Mare d'eau temporaire infectée par des larves de moustiques et vue au premier quartier d'Ipendja avant la traversée de la rivière Sombo

Ipendja est situé dans le domaine de la forêt inondée et dominé par le régime hydrologique équatorial pur (**Carte 3 ❶**).

Dans le cadre de nos différentes études, deux sites y ont été retenus:

Le Centre Médico-social (CMS) de la société des bois et placages de Tanry où les observations cliniques en vue de l'étude de la morbidité étaient réalisées ;

le quartier administratif des douanes et des eaux-forêts, proche du CMS, où nous avons conduit les enquêtes de prévalences en population et une étude entomologique pour pouvoir évaluer la transmission du paludisme.

5. Synthèse Méthodologique

5.1. Approche parasitologique

Nous avons apprécié l'endémicité du paludisme en mesurant la prévalence de l'infection auprès des sujets asymptomatiques (paludisme-infection), lors des passages transversaux et la morbidité palustre à partir des sujets reçus à la consultation dans trois (03) structures de santé pour suspicion d'accès palustre (paludisme-maladie) au cours de la période de suivi. La mesure de la prévalence en population est, d'ailleurs, la méthode d'évaluation des stratégies visant la réduction de cette prévalence. Ce paramètre est lié à l'intensité de la transmission mais non la charge du paludisme en santé publique.



Photo 12: Un enfant participant à l'étude se fait prélever du sang veineux au Centre de Santé Intégré (CSI) de Nzalangoye de Ouesso (à 900 Km de Brazzaville et dans le Nord forestier)

5.1.1. Prévalence et densité parasitaire

L'évaluation des niveaux d'endémicité du paludisme dans les populations est basée sur des observations parasitologiques faites chez les enfants âgés de moins de 9 ans. Mais, dans nos différentes études, nous avons travaillé sur les enfants de 1 à 15 ans. Nous avons fait la mise en évidence des plasmodies par la lecture, au microscope, d'une goutte épaisse d'un échantillon représentatif de la population étudiée.

Donc, lors d'un passage transversal, chaque enfant de moins de 15 ans, volontaire dont le consentement des parents et/ou des tuteurs a été recueilli, au préalable, faisait l'objet d'un prélèvement veineux à partir duquel une goutte a servi à la confection de la goutte épaisse et le reste du sang a servi à la recherche des isolats nécessaires au séquençage du matériel génétique des populations de plasmodium ; l'objectif étant d'étudier l'impact de la biodiversité plasmodiale dans l'épidémiologie globale du paludisme.

Les gouttes épaisses confectionnées sur lames porte-objet et séchées ont été colorées, après déshémoglobination, au GIEMSA rapide de concentration 10% dilué 3/50^{ème} avec l'eau distillée. Au terme de 15 minutes de coloration, les gouttes épaisses ont été rincées à l'eau du robinet, séchées et stockées dans les boîtes de rangement.

Au moment de la lecture, les gouttes ont été examinées sur 200 champs microscopiques (1/5 µl de sang) pour mettre en évidence les plasmodies, déterminer leur espèce (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*), recenser les différents stades en présence (trophozoïtes, schizontes et gamétocytes) et quantifier les trophozoïtes en établissant pour chaque lame la classe de densité parasitaire, selon les espèces. Le résultat de la lecture d'une lame est exprimé en pourcentage issu du rapport du nombre total de parasites observés sur l'ensemble des champs examinés par le nombre total de leucocytes correspondant. Ainsi, pour *P. falciparum*, les cinq classes sont F1, F2, F3, F4 et F5 ; pour *P. ovale*, les cinq classes de densité parasitaire sont OV1, OV2, OV3, OV4 et OV5 et pour *P. malariae*, les cinq classes sont M1, M2, M3, M4 et M5.

Quelque soit l'espèce en présence, la classe1 correspondant à un pourcentage de parasite inférieur ou égal à 1%, la classe2 de 2% à 7%, la classe3 de 8% à 65%, la classe4 de 66% à 625% et la classe5 supérieur à 625%. Comme un sujet normal a un nombre moyen de globules blancs ou leucocytes de 8 000/mm³, il suffit de multiplier chaque résultat en pourcentage par 8000 pour avoir la densité parasitaire approximative en nombre de parasites par µl de sang. Bien entendu, chez les sujets dont les parasites étaient rares, la densité parasitaire a été également estimée, au cours de l'examen des gouttes épaisses, à partir de l'analyse systématique de 200 champs microscopiques et le comptage des globules blancs. La densité parasitaire a été donnée directement en sachant que

200 champs microscopiques correspondent approximativement à 0,5 μ l de sang et, en ramenant un tel résultat à 1 μ l de sang, nous avons donc exprimé la parasitémie en nombre de parasites par μ l de sang ; ce qui équivaut au nombre de parasites/mm³.

Les observations parasitologiques permettent de déterminer dans une population examinée, l'indice plasmodique (IP) et l'indice gamétocytaire (IG) représentant les pourcentages de sujets dont les gouttes épaisses révèlent des formes asexuées (trophozoïtes) ou sexuées (gamétocytes), quelle que soit l'espèce plasmodiale. On établit la prévalence relative de chaque espèce par rapport au total des infections mises en évidence.

Il est aussi judicieux de noter que la technique de la goutte épaisse que nous avons utilisée a un seuil de détection des parasites compris entre 50 et 100 parasites par μ l (mm³) de sang ; les faux résultats sont inévitables et il est important d'évaluer cette marge d'erreur par le contrôle de la qualité des lames lues.

Quelques informations liées au consentement éclairé des participants ou de leur parent et/ou le consentement de leurs tuteurs, le code individuel qui est unique, ainsi que les paramètres sociodémographiques comme l'âge, le sexe, l'adresse, étaient contenus dans un questionnaire standard d'enquête de prévalence en population.

5.1.2. Morbidité palustre

Les études de la morbidité palustre (paludisme-maladie) ont été réalisées dans les structures de santé. Comme on peut le noter, dans le contexte africain où les systèmes de santé sont fragiles, où cliniciens et techniciens de laboratoires ont une surcharge de travail, indescriptible par le nombre élevé de patients à prendre en charge ; de la consultation au suivi du traitement en passant par l'interrogatoire prélude à l'inclusion dans l'étude, les prélèvements biologiques, les analyses de laboratoire, beaucoup d'écueils se dressent sur la conduite d'un tel travail en milieu hospitalier.

Cependant, dans le contexte d'une étude sur la morbidité du paludisme, le diagnostic de présomption basé sur les signes évocateurs du paludisme-maladie: fièvre continue ou intermittente, troubles digestifs, céphalées, arthralgies voire coma est souvent légué au second plan, à la faveur du dispositif de diagnostic biologique qu'apporte une telle étude.

Le questionnaire standard d'enquête en milieu hospitalier administré à tous les participants à l'étude recueillait et notifiailt quelques paramètres cliniques comme la fièvre, la

splénomégalie, l'hépatomégalie, le nombre annuel des épisodes de paludisme, la pratique de la chimioprophylaxie,...

5.1.3. Diagnostic du paludisme à base des Tests de Diagnostic Rapide

Le protocole relatif à l'évaluation et la validation du Test de Diagnostic Rapide (TDR) SD BIOLINE Malaria Ag Pf (HRP2/pLDH) nécessaire à la recherche de l'infection palustre récente dans le contexte de la République du Congo a été appliqué selon quelques étapes. Quelque soit le statut clinique des individus, après interrogatoire, chacun d'eux s'est vu:

- 1) demander l'accord ou le consentement des parents ou tuteurs ;
- 2) interroger s'il n'a pas eu un traitement antipaludique préalable depuis une semaine ;
- 3) attribuer un Numéro à 3 chiffres ou code individuel (pour Nzalangoye, ce code a été NZA 001, NZA002,..., pour l'hôpital de base de Ouesso, il a été HBO 001, HBO 002,...) ;
- 4) réaliser dans un tube à EDTA qui porte le même numéro que celui de la fiche individuelle, un prélèvement de 5ml de sang veineux au pli du coude ;
- 5) se faire réaliser, profitant de ce sang veineux, une goutte sans qu'elle passe par le tube EDTA pour faire deux Gouttes Epiasses (GE) ;
- 6) offrir quelques µl de sang pris au moyen de l'anse de prélèvement pour réaliser le TDR à J0 (premier jour de l'entrée de l'enfant dans l'étude), à partir d'une bandelette qui portait le même numéro individuel, la date et le jour (J0 puis à J3, J7, J14,...) ;
- 7) Pour le DTR positif, il a été écrit sur un coin de la fiche individuelle: positif pour HRP2 ou pour PLDH ou pour les deux à la fois ;
- 8) Pour l'enfant qui a le TDR positif, un traitement a été administré le premier jour du traitement qui est J0 ; le deuxième est J1, le troisième est J2.
- 9) un jour après le fin du traitement, donc le quatrième jour ou J3, l'enfant a de nouveau fait l'objet d'un TDR et d'une Goutte Epaisse de contrôle ; il en a été autant à J7, J14, J21, J28 et J35.

10) Le sang en tube EDTA du premier jour (J0) a été décanté et séparé en plasma et sang rouge ou culot dans les cryotubes marqués des numéros de l'enfant, placés dans les cryoboîtes qui ont été gardées au froid dans un congélateur.



Photo 13: Deux gouttes épaisses et un TDR confectionnés au Centre de Santé Intégré (CSI) de Nzalangoye de Ouesso (à 900 Km de Brazzaville et dans le Nord forestier)

5.1.4. Réalisation de TDR

La bandelette du TDR présente 3 fenêtres: la première fenêtre qui reçoit le diluant, la deuxième fenêtre qui reçoit l'échantillon sanguin et la troisième fenêtre où apparaîtront les traits T1 (HRP2), T2 (pLDH) et C (contrôle) (Photo14).

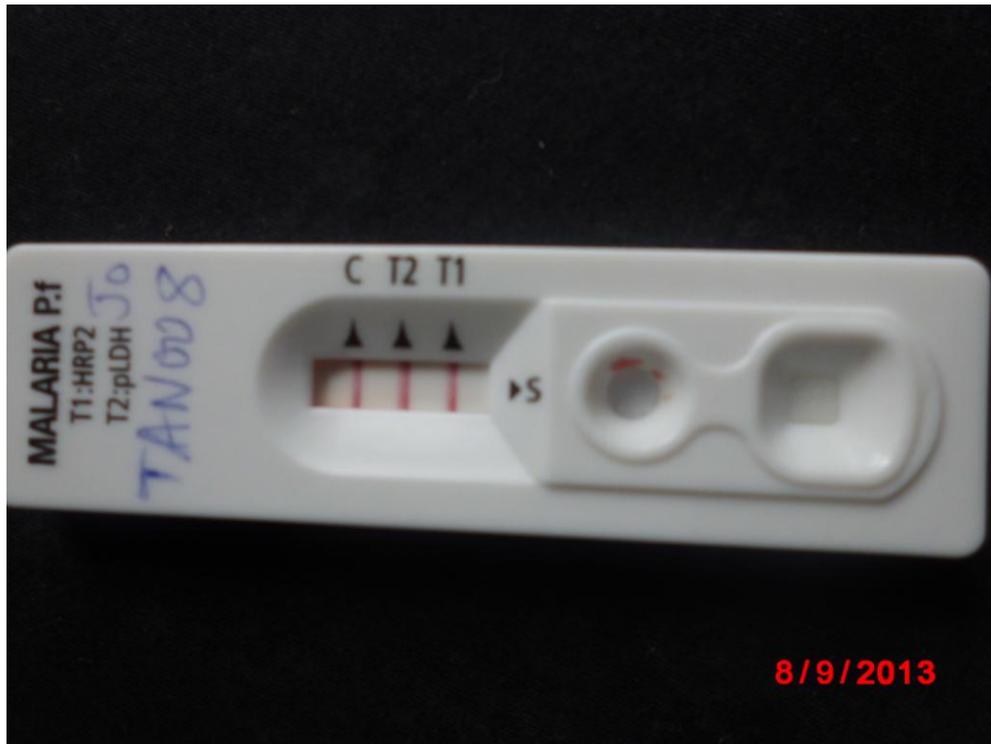


Photo 14: Pratique du TDR au Centre Médico-Social (CMS) de Tanry-Ipendja (à 1400 Km de Brazzaville et dans le Nord forestier-Département de la Likouala)

5.1.5. Contrôle qualité de la lecture des gouttes épaisses

Les gouttes épaisses de contrôle examinées en deuxième intention par le laboratoire du centre IRD n'ont montré aucune discordance majeure ; seules quelques différences au niveau des classes parasitaires ont été notées.

5.2. Entomologie

5.2.1. Méthodes d'échantillonnage

Nous avons utilisé les captures sur appâts humains, effectuées par des agents de santé ou les membres de la communauté du site d'étude (sous chimioprophylaxie antipaludique démarrée un jour avant la nuit des captures) servant à la fois de "captureurs" et d'appâts. Ils ont été au préalable formés à la capture grâce à un court exposé que nous faisons à leur intention, en nous appuyant sur le document de synthèse méthodologique validée et contenue dans le protocole d'étude acceptée par le comité d'éthique.

Le moment venu, chaque agent a été doté d'une lampe torche, d'un compteur de temps de 60 minutes (minuteurs), d'une provision de tubes secs en verre d'environ 10 à 20 ml, des sacs en drap blanc pour constituer les collectes en tranches horaires et en site ainsi que du coton. Habillé en culotte exposant les jambes à partir des genoux et les pieds, le captureur prélève,

avant la pique, les moustiques qui viennent se poser sur ses jambes nues. Les récoltes sont réunies par tranches horaires dans des sacs numérotés et marqués des tranches horaires, des noms de site, des localités et des dates. Les captures sont effectuées parfois simultanément à l'intérieur d'une maison et à l'extérieur (cour, véranda) de 20h du soir à 07h du matin, dans les localités où les équipes se sont préparées et installées à temps et de 21h à 07h dans les autres localités où pour des raisons logistiques, les équipes se sont apprêtées en retard.

Dans chaque site de capture, deux équipes de "captureurs" ont travaillé l'une après l'autre au cours de la nuit ; la première équipe travaillant jusqu'à 01h et la seconde de 01h à 07h. Le nombre de sites de capture par localité et le nombre de séances de capture (homme/nuit) effectuées ont varié selon les moyens humains et matériel disponibles. A chaque enquête, une rotation des équipes et des "captureurs" est faite pour réduire l'impact individuel des "captureurs" sur les récoltes (sommolence, attractivité, habileté à la capture).

Les captures de la journée sont faites dans les habitations pour échantillonner la fraction des populations anophélienne qui se repose à l'intérieur des maisons. La collecte de la faune résiduelle est effectuée dans une case habitée par point de capture, le matin, de entre 07h à 08h.

Nous avons réalisé, en de rares occasions les collectes de la faune résiduelle du matin, à partir de 7h du matin, mais elles étaient souvent infructueuses et les rares moustiques collectés ne permettaient pas d'avoir une information fiable. Les moustiques sont récoltés après pulvérisation à partir de pyréthriinoïdes en aérosol atomiseurs vendus sur le marché. Avant la pulvérisation, les issues sont soigneusement bouchées et les draps blancs ont été étalés sur le plancher, les lits et la table de manière à récolter les moustiques tués ou immobilisés (effet "*knock-down* ") par l'insecticide.



Photo 15: Deux hommes-nuit en pleine séance de capture d'anophèles au domicile du chef de quartier komo à Gamboma (à 375Km de Brazzaville-zone de savane dans le centre du pays)



Photo 16: Un moustique sur le pied d'un homme-nuit en pleine capture d'anophèle au site du quartier Oya d'Oyo (à 400 Km de Brazzaville au nord pays)



Photo 17: Un homme-nuit en pleine capture d'anophèle à l'intérieur d'une habitation avec les sacs de stockage de spécimens au site du quartier Oya d'Oyo (à 400 Km de Brazzaville)

Les moustiques récoltés par les différentes méthodes d'échantillonnage sont, après chaque séance, dénombrés, identifiés sous loupe binoculaire et gardés au frais (4°C) dans les tubes ependorf, avec un ou deux cristaux de silicate gel en ce qui concerne les femelles d'anophèles vecteurs. Les culicidés ont, par précaution, été gardés dans les tubes communs et par tranches horaires, en vue de la confirmation des identifications par les équipes d'un autre laboratoire. Dans le cas de nos présentes études, ce sont les laboratoires d'entomologie du centre IRD-Dakar et de l'institut Pasteur de Dakar qui nous ont aidés à revoir ces collections de culicidés pour s'assurer qu'il n'y aurait pas eu d'anophélidés non identifiés et restés ensemble avec les culicidés.

D'autres investigations ont été aussi réalisées pour déterminer des paramètres entomologiques importants dans l'étude du paludisme. Il s'agit de l'identification spécifique des membres du complexe *gambiae* (PCR), de la détermination des taux d'infection des femelles (ELISA).

5.2.2. Identification des membres du complexe *Anopheles gambiae*

5.2.2.1. Approches morphologique et anatomique

Nous avons réalisé la détermination des anophèles en utilisant les caractères morpho-anatomiques et grâce aux observations faites à la loupe binoculaire. Pour cela, nous avons eu recours à la clé dichotomique de détermination des anophèles conçue par Diagne (Diagne *et al.*, 1994). Cette clé a l'avantage d'être simple et surtout d'avoir pris en compte les travaux de Hamon et collaborateurs (Hamon *et al.*, 1955 ; Hamon *et al.*, 1956a ; Hamon *et al.*, 1956b, Hamon *et al.*, 1966) ainsi que les études qui ont fait la révision exhaustive des espèces d'anophèles d'Afrique (Gilles et De Meillon, 1968) qui demeurent les travaux de référence sur la taxonomie des vecteurs du paludisme et des arboviroses. Cette clé est basée sur l'observation des segments du tagme abdominal, la couleur du segment 5 et du champ alaire, la pâleur des segments du tarse postérieur, le nombre des taches claires sur la coxa de l'aile, la taille de la tache claire sur l'articulation tibia-tarse, la présence et le nombre des taches claires sur la nervure 1, la présence ou non de la moucheture sur les pattes, la couleur des tarsi de 3 à 5 et l'aspect des palpes, la couleur de la tarse 3 postérieure, l'alternance des couleurs des différents anneaux de l'apex des palpes et des tarsi, le nombre et la présence de la tache claire ou la continuité de la troisième zone sombre de la nervure 1 ou encore de la nervure 5-1, la présence ou l'absence d'une interruption sur la troisième zone sombre de la nervure 1 associées à la présence ou l'absence des pattes tachetées, l'anneau blanc qui couvre ou non l'articulation des tarsi, la couleur (jaune ou noire) et l'étendue (la moitié) de la costa,

5.2.2.2. Approche moléculaire

Pour séparer les espèces d'eau douce (*A. gambiae s.s* et *A. arabiensis*), nous avons utilisé la. La technique de la PCR qui est l'une des plus sensibles et utilisée pour la première fois autour de la décennie 1990 pour séparer 5 espèces du complexe *gambiae* dans la taxonomie des anophèles (Paskewitz et Collins, 1990 ; Scott *et al.*, 1993). Son principe est basé sur la principale propriété de toutes les DNA polymérases qui est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce. Cette propriété est mise à profit dans la technique de la PCR pour amplifier par réplifications successives, la séquence désirée. Il suffit pour cela de choisir des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider à ses extrémités et de réaliser les réplifications qui assurent la multiplication de la séquence sélectionnée par les amorces. Il a été capital de connaître les bouts de la séquence que l'on souhaite amplifier. Pour cela, nous avons recouru au protocole MR⁴ de Wilkins et collaborateurs (Wilkins *et al.*, 2006) adopté par l' UMR 198-URMITE au centre IRD de Dakar.

Le nombre de copies de la séquence choisie double théoriquement à chaque réplification, son augmentation est notable. Après 30 cycles, on obtient en moyenne une amplification de 1()⁶. L'amplification par PCR ne nécessite que des variations rapides de trois températures différentes (95°C/30sec, 58°C/30sec, 72°C/30sec), une précision de 0,5°C à 1°C à chaque étape étant suffisante. La réalisation pratique est passée par des cycles comprenant chacun les trois étapes suivantes: dénaturation ou séparation des brins du DNA à amplifier, hybridation des amorces et élongation (polymérisation) par l'enzyme (*Taq polymérase*). Nous avons utilisé quatre amorces de 20 nucléotides distinguant les différences spécifiques dans les séquences d'espacement non traduites des gènes ribosomiaux (*Ribosomal DNA intergenic spacers*). Une amorce est commune aux trois espèces recherchées, les trois autres sont spécifiques. Les pattes et les ailes des moustiques à identifier, conservées dans des microtubes avec un dessiccateur sont broyées et l'ADN extrait a été remis en suspension dans 30ml d'eau stérile. Nous avons constitués les mixtes à partir des extraits d'ADN auxquels nous avons ajoutés les principaux réactifs, conformément aux quantités indiquées dans le tableau du protocole. Nous avons préparé la plaque de PCR de 96 puits à partir de mixtes dont la quantité des réactifs et des extraits d'ADN obéit aux valeurs indiquées par le tableau contenu dans le protocole. Au bout du compte, chaque tube d'amplification contenait: le tampon de réaction à pH 8,3 KCl, MgCl₂, et de la gélatine, du dNTP (solution à 25 mM pour chaque nucléotide), chaque amorce, l'eau stérile, 2 unités de Taq. Polymérase, la solution d'ADN extrait du

moustique. La Taq. Polymérase utilisée est thermostable et pouvait conserver son activité à 72°C, après passage à la température de dénaturation. L'amplification se fait selon les conditions suivantes: une étape de 5 minutes à 95° C suivie par 30 cycles (dénaturation pendant 30 secondes à 95°C, hybridation pendant 30 secondes à 58°C et élongation à 72°C pendant 30 secondes) enfin, une dernière étape de 5 minutes à 72°C. La plaque est laissée au repos pour quelques minutes à 4°C avant de passer à l'étape de la révélation.

Par la suite, les échantillons amplifiés ont subi une électrophorèse sur gel d'agarose avant la lecture pour révéler la nature et la taille des fragments d'ADN. Par exemple, nous avons utilisé les amorces au cours de l'amplification de l'ADN pour produire des fragments de 528 paires de bases pour *A. melas* (et pour *A. merus*), 463 de bases pour *A. gambiae s.s.*, 387 paires de bases pour *A. arabiensis*, 333 paires de bases pour *A. gambiae mopti*, 221 paires de bases pour *A. gambiae savana*.

5.2.2.3. Mise en évidence de l'infection palustre anophlienne

Les sporozoïtes ont été recherchés sur le terrain directement dans les glandes salivaires. Les antigènes circumsporozoïtiques (CSP) de *Plasmodium* ont été identifiés au laboratoire par la technique ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Après l'extraction des glandes salivaires sur une lame porte-objet dans une goutte de sérum physiologique recouverte d'une lamelle, la recherche des sporozoïtes est faite à l'état frais sans coloration, à l'aide d'un microscope optique à l'objectif 40 (Gx400).

La détection et l'identification des antigènes du *Plasmodium* a été faite par le test ELISA utilisant des anticorps monoclonaux selon la technique de WIRTZ (WIRTZ *et al.*, 1985). Le test commence par la sensibilisation des plaques par la fixation des anticorps monoclonaux anticircumsporozoïtes spécifiques sur la paroi des puits. Après le temps d'incubation d'une nuit, les plaques sont vidés sans lavage. Les broyats de moustiques sont introduits dans les puits des plaques pour permettre la réaction avec les anticorps monoclonaux fixés et la formation éventuelle d'un complexe antigène circumsporozoïte/anticorps monoclonal. Les plaques sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS-Tween avant d'ajouter dans les puits les anticorps monoclonaux spécifiques conjugués à une enzyme (peroxydase). Si un complexe antigène/anticorps s'est déjà formé lors du premier temps de réaction, l'anticorps marqué se fixera sur l'antigène circumsporozoïte. Le test se termine par l'addition du substrat correspondant à l'enzyme après avoir ôté et lavé 4

fois les plaques. La réaction du substrat avec l'enzyme, si le complexe anticorps/antigène/enzyme est en place, se traduit par un changement de coloration de la solution dans les cupules (puits) ; la lecture a été faite avec un lecteur ELISA à 450 nm pour mesurer la Densité Optique (D.O).

5.3. Critères d'inclusion des sujets

Les sujets inclus à l'étude ont été :

- les habitants permanents des sites d'étude choisis, âgés de 1 à 15 ans, asymptomatiques et examinés lors du passage transversal dans les quartiers retenus et/ou reçus dans les formations sanitaires sites d'étude pour suspicion d'accès palustre ;
- les personnes qui n'avaient pas reçu un traitement antipaludique préventif ou curatif pouvant rendre les parasites sanguins indétectables ;
- Les sujets qui ont accepté de fournir les informations socio-démographiques, cliniques et épidémiologiques les concernant pour être consignées dans un questionnaire standard ;
- Les volontaires, consentants ou engagés du fait du consentement de leurs parents ou tuteurs (pour les sujets mineurs) afin de participer à l'étude ;
- les sujets qui ont accepté de faire l'objet d'un prélèvement de 5ml du sang veineux pour l'ensemble des analyses.

5.4. Critères d'exclusion des sujets

Ont été exclus de l'étude:

- les sujets vivants dans le site d'étude depuis moins de six mois ou habitants temporaires et/ou âgés de moins d'un an ou de plus de 15 ans ;
- les sujets qui n'ont pas accepté de faire l'objet d'un prélèvement du sang veineux nécessaire à la recherche de l'infection palustre ;
- les personnes qui ont déclaré, à l'interrogatoire, avoir reçu un traitement antipaludique depuis moins d'une semaine, à titre préventif ou curatif.

5.5. Considérations éthiques

Tous les sujets vus positifs, donc porteurs d'une infection palustre ou une autre infection parasitaire sanguine et qui ne seraient pas sous traitement antipaludique dans le cadre de la gratuité du paludisme, ont été soignés au frais de l'étude.

Les sujets qui ne n'étaient pas volontaires de participer à l'étude ont été libres de se retirer à n'importe quelle étape (interrogatoire, prélèvement, traitement, suivi des traitements antipaludiques).

Cette étude d'évaluation et de validation des TDR a été un protocole additionnel qui s'est fait dans le cadre d'une étude sur l'endémicité du paludisme de l'enfant et l'adolescent congolais en cours depuis 2011, qui s'est poursuivie jusqu'en décembre 2013 et avait obtenu l'accord éthique du Comité d'Ethique de la Recherche en Sciences de la Santé (CERSSA) du 22 mars 2011.

5.6. Traitement des sujets positifs

Les sujets positifs de moins de moins de 15 ans ont bénéficié de la prise en charge des traitements à base de combinaisons d'artésunate-amodiaquine (**Photo 18**). Les sujets âgés de plus de 15 ans, n'avaient bénéficié que de la gratuité des examens (Goutte épaisse et TDR) et ils ont du faire face à l'achat de leurs traitements constitués de mêmes molécules en formulations adultes.

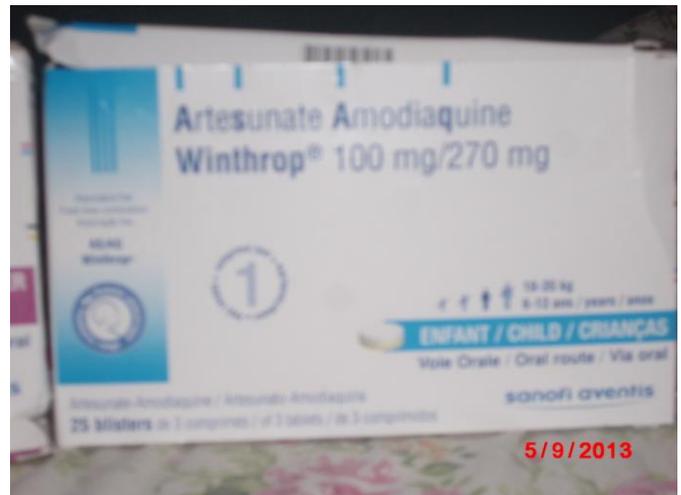
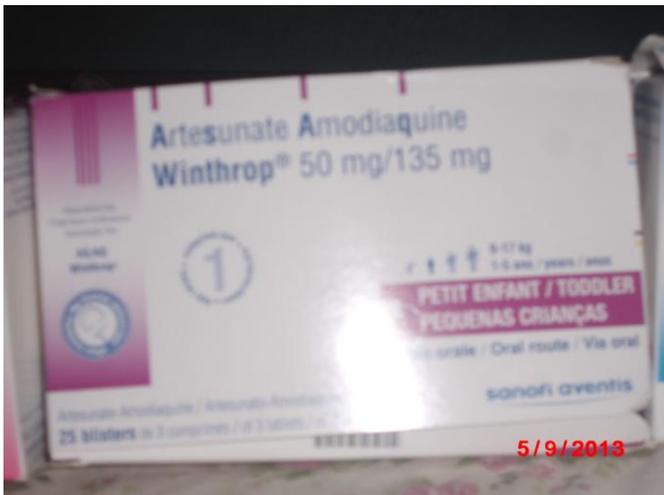


Photo 18: Antipaludiques utilisés pour assurer le traitement des enfants qui ont participé à l'étude

6. Résultats

6.1. Phase 1: enquête préliminaire

Cette étude a consisté à réaliser un prélèvement veineux et une goutte épaisse à chaque participant, volontaire, âgé de 1 à 15 ans. Chaque site a fait aussi l'objet d'une étude entomologique en vue d'y apprécier le niveau de transmission du paludisme.

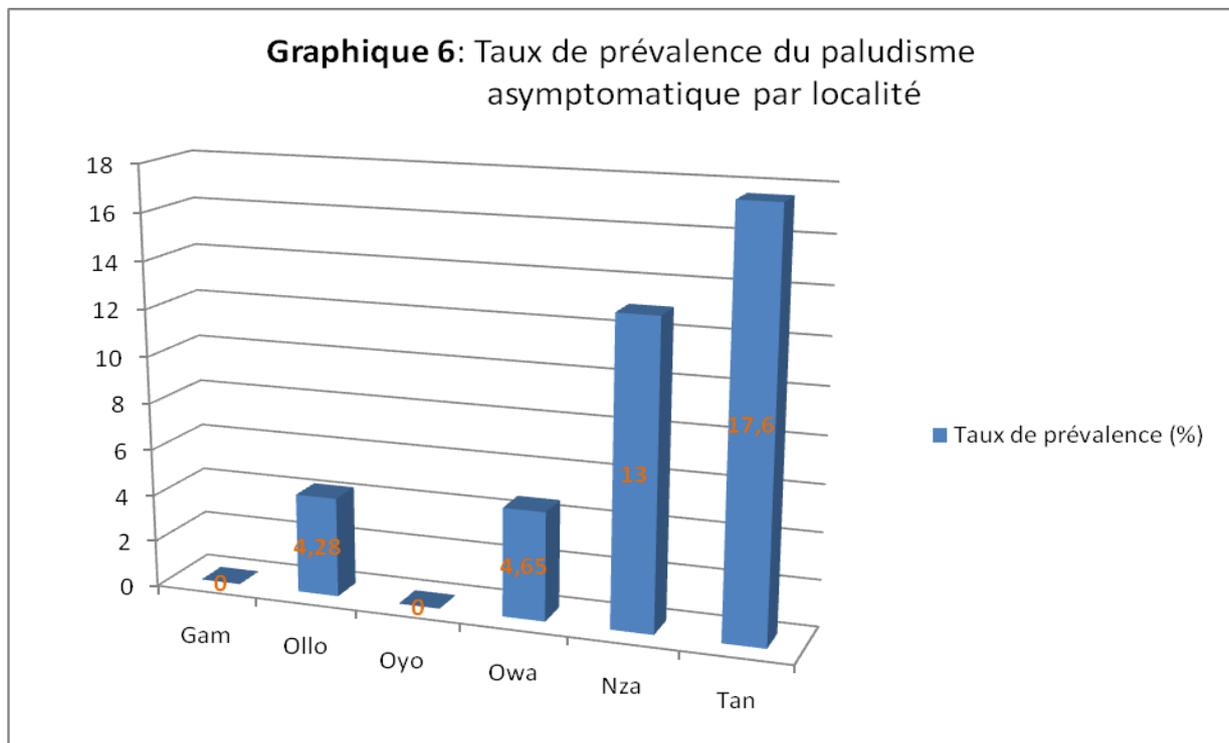
6.1.1. Prévalence Générale de l'infection palustre

Le taux de prévalence générale dans la population de tous les sites d'étude a été de 7,85% (39/497) (**Tableau2**). Globalement, cette prévalence est faible et ne permet pas d'apprécier la prévalence du paludisme asymptomatique par site d'étude.

Tableau2: Effectifs généraux, prévalence générale et prévalence par site

Sites	Effectifs	Positifs	Négatifs	Taux de Prévalence
Gamboma	50	0	50	0%
Ollombo	70	3	67	04,30%
Oyo	83	0	83	00,00%
Owando	86	4	82	04,65%
Ouessou	100	13	87	13,00%
Tanry	108	19	89	17,60%
Total	497	39	458	07,85%

6.1.2. Prévalence de l'infection palustre chez les sujets asymptomatiques par site



Le taux de prévalence de l'infection palustre asymptomatique a été globalement faible dans chacune des localités sites d'étude. Mais, il a été de 17,60% à Tanry et de 13,00% à

Nzalangoye (Ouesso). Donc ces deux localités sont encore en situation d'entretenir l'infection palustre.

6.2. Abondance de la population anophélienne et taux d'infection palustre chez l'anophèle

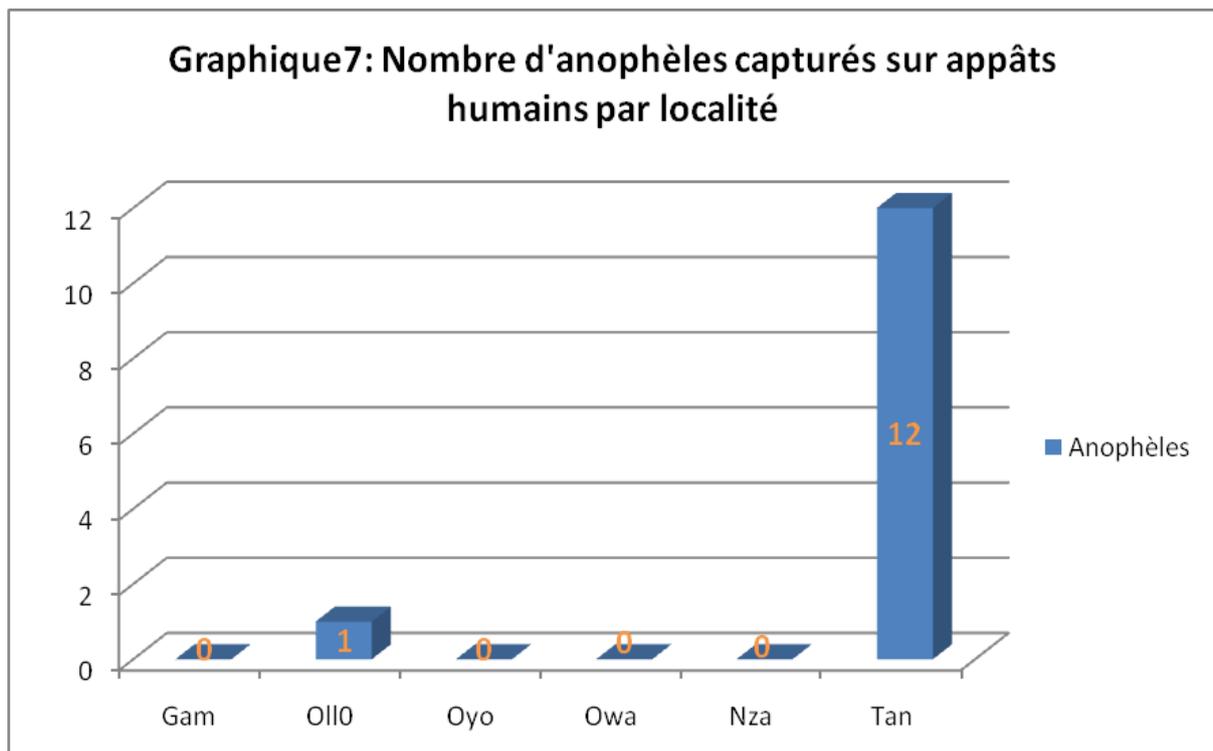


Tableau3 : Nombre et répartition des anophèles collectés par localités sites d'étude

Localités	<i>Anopheles ziemani</i>	<i>Anopheles gambiae s.s.</i>	Autres espèces	Total
Gamboma	0	0	0	0
Ollombo	0	1	0	1
Oyo	0	0	0	0
Owando	0	0	0	0
Nzalangoye (Ouessou)	0	0	0	0
Tanry ou Ipendja	12	0	0	12
Total	12	1	0	13

La population anophélienne est très faible, car sur les six sites, il n'y a que 13 anophèles qui ont été collectés sur appâts humain (**Graphique7**). De plus, ils n'ont été observés que sur deux sites : 12 sur le site de Tanry et 1 sur le site d'Ollombo.

Toutes les captures effectuées par 24 hommes nuit (HN) n'ont donné lieu qu'à 13 anophèles dont 1 *Anopheles gambiae s.s.* (confirmé après PCR d'identification) à Ollombo et 12 *Anopheles ziemani* (identifiés lors des études morpho-taxonomiques) à Tanry (Ipendja) (**Tableau3**).

Le taux d'infection palustre auprès des anophèles a été nul dans toutes les localités d'étude, à l'issue de la réalisation du test ELISA sur les 13 anophèles capturés. On a noté néanmoins la présence de 12 anophèles à Tanry, même si le rôle vectoriel d'*Anopheles ziemani* sur ce site reste à prouver. Il est probable que *Anopheles ziemani* coexiste avec d'autres espèces (*Anopheles gambiae*, *Anophels gambiae*, *Anopheles funestus*,...) dont le rôle vectoriel n'aurait fait aucun doute.

Au terme de cette enquête sur la prévalence de l'infection palustre asymptomatique et sur la transmission du paludisme et l'abondance des populations anophéliennes au niveau des six

(06) sites d'étude, il est ressorti que seuls les sites de Ouessou dans la Sangha et de Tanry dans la Likouala seraient intéressants pour conduire la deuxième partie de l'étude sur l'évaluation des TDR. En effet, avec les taux de prévalence en population, respectifs de 13,00% pour Ouessou et 17,60% pour Tanry, les plasmodies circulent encore et peuvent induire une morbidité non négligeable chez les enfants de moins de 15 ans.

7. Phase2 : enquête de morbidité et évaluation des TDR

7.1. Résultat par les TDR

Les TDR ont montré un taux d'infection palustre de 74,66% (327/438) sur l'ensemble des sites d'étude.

Tableau4 : Signification du résultat du test quand les traits sont regroupés deux à deux

	Combinaisons des traits du test et signification des résultats			
	T1+ et T2+	T1+ et T2-	T1- et T2+	T1- et T2-
Correspondances et signification du résultat du test	Présence d'anticorps HRP2 et de l'enzyme pLDH (Test positif)	Présence d'anticorps HRP2 et absence de l'enzyme pLDH (Test positif)	Présence de l'enzyme pLDH et absence d'anticorps HRP2 (Test positif)	Absence d'anticorps d'HRP2 et absence de l'enzyme pLDH (Test Négatif)

Dans la pratique, le regroupement des traits T1 et T2 du test ne correspond à un résultat négatif ou positif acceptable que lorsque le trait de contrôle (C) apparaît et s'associe à l'une des combinaisons des traits.

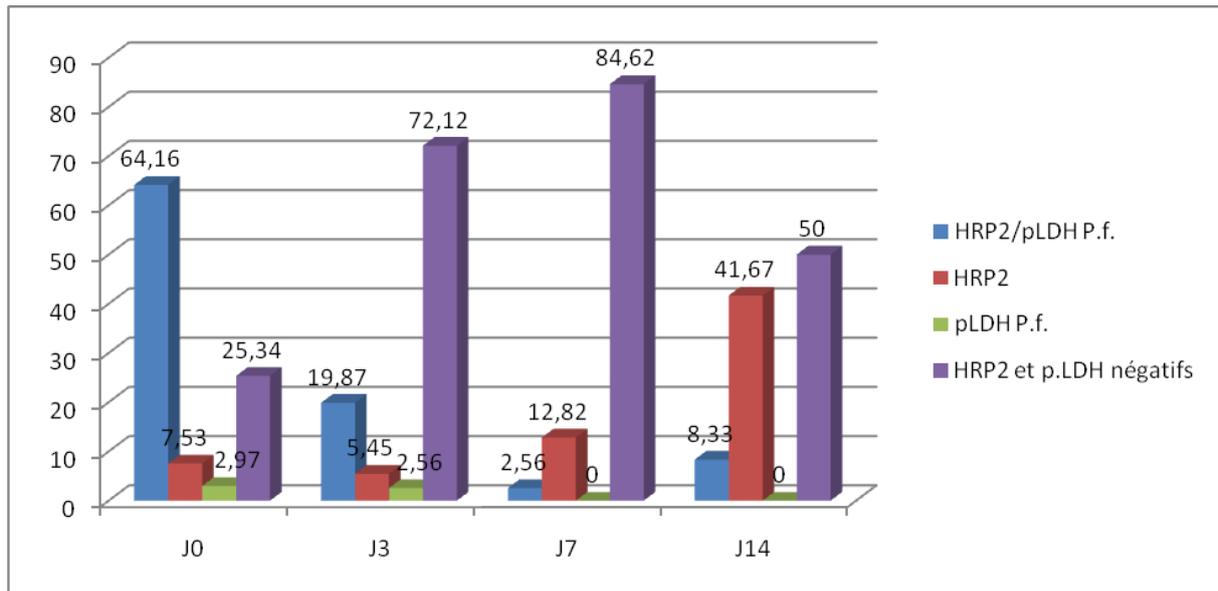
Tableau5a : Variation de la prévalence du paludisme selon les bandes du TDR par sites

Localités sites d'études	Jours d'inclusion et de suivi							
	J0 (Avec 438 reçus pour 327 positifs et 111 négatifs)				J3 (87 positifs et 225 négatifs sur 312 reçus /327 de J0 attendus/15 perdus de vue)			
	T1+ et T2+	T1+ et T2-	T1- et T2+	T1- et T2-	T1+ et T2+	T1+ et T2-	T1- et T2+	T1- et T2-
Tanry	219	32	13	104	51	12	7	185
Hôpital de base de Ouesso	51	0	0	5	9	4	1	33
CSI Nzalangoye de Ouesso	11	1	0	2	2	1	0	7
Total	281	33	13	111	62	17	8	225
Fréquences	64,16%	07,53%	02,97%	25,34%	19,87%	05,45%	02,56%	72,12%

Tableau5b: Variation de la prévalence du paludisme selon les bandes du TDR par sites

Localités sites d'études	Jours d'inclusion et de suivi							
	J7 (12 positifs et 66 négatifs sur 78 reçus /87 de J3 attendus/9 perdus de vue)				J14 (6 positifs et 6 négatifs sur 12 reçus /12 de J7 attendus/aucun perdu de vue)			
	T1+ et T2+	T1+ et T2-	T1- et T2+	T1- et T2-	T1+ et T2+	T1+ et T2-	T1- et T2+	T1- et T2-
Tanry	1	5	0	57	1	2	0	3
Hôpital de base de Ouesso	1	3	0	8	0	2	0	2
CSI Nzalangoye de Ouesso	0	2	0	1	0	1	0	1
Total	2	10	0	66	1	5	0	6
Fréquences	02,56%	12,82%	00,00%	84,62%	08,33%	41,67%	00,00%	50,00%

Graphique7: variation de l'infection palustre dans le temps observée grâce aux traits du TDR



6.3. Résultats par lecture microscopique de la Goutte épaisse

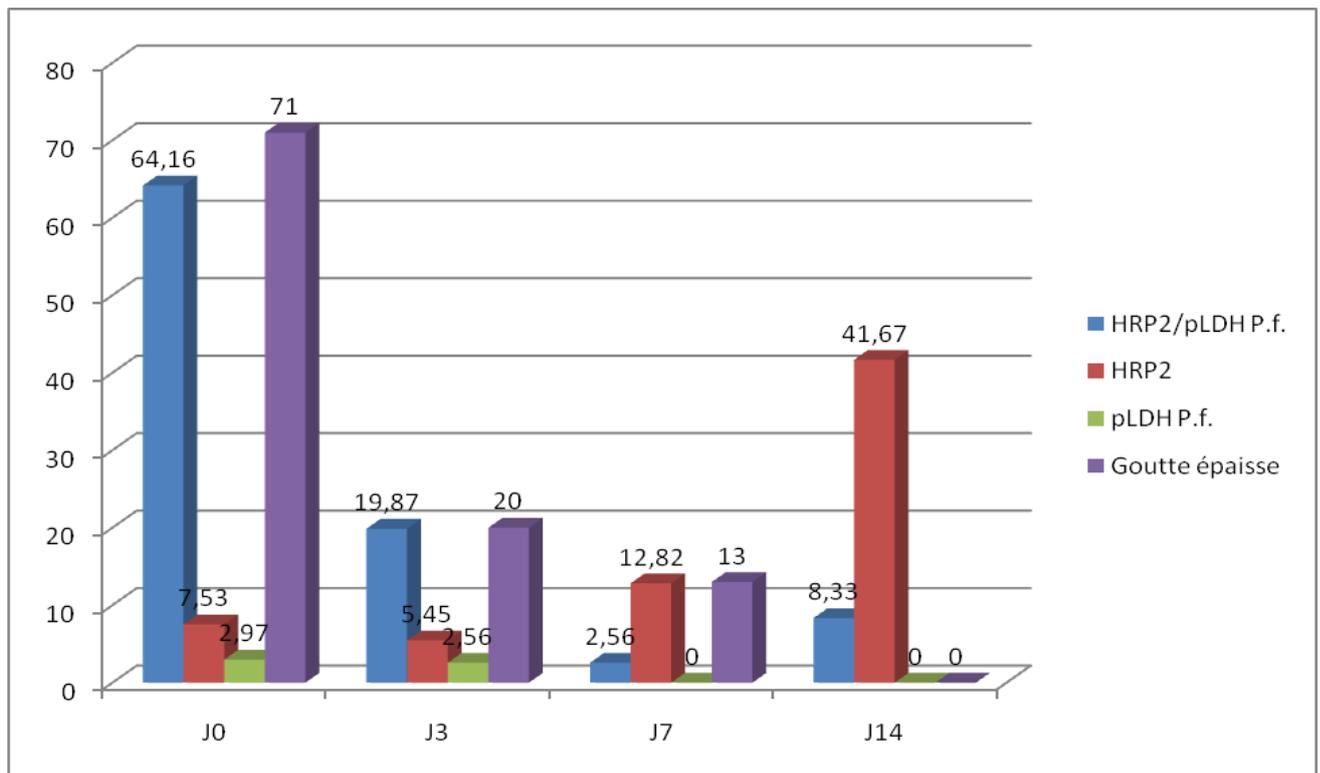
Au moyen de la Goutte épaisse, le taux de l'infection palustre ou l'indice plasmodique a été de 73,30 (321/438) ; 2,30% de l'indice plasmodique du à *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae* n'a pas été observé dans notre population d'étude. En considérant essentiellement *Plasmodium falciparum*, l'indice plasmodique a été de 71% (311/438).

La densité parasitaire observée avait une moyenne de 480 parasites/ μ l de sang, un minimum de 80 parasites/ μ l de sang et un maximum de 292000 parasites/ μ l de sang à J0. Cette densité parasitaire a baissé rapidement à J3, devient très faible à J7 et s'annule à J14. Cette baisse progressive de la densité parasitaire est corrélée avec celle de l'indice plasmodique (Tableau6).

Tableau6: Indice plasmodique du à *Plasmodium falciparum* observé par goutte épaisse sur l'ensemble des sites

Jours de prélèvement				
	J0	J3	J7	J14
Indice Plasmodique	71%	20%	13%	0%
Rapport	311/438	60/300	7/53	0/4

Graphique8: variation des taux de l'infection palustre dans le temps observée par TDR et par goutte épaisse



On note une forte corrélation de la variation dans le temps entre la parasitémie à la goutte épaisse et le résultat du TDR observé à partir du trait de la protéine pLDH. L'HRP2 baisse plus lentement dans le temps que la parasitémie à la goutte épaisse et la présence de la protéine pLDH (Graphique8).

La positivité des échantillons sanguins par le trait HRP2 a tendance à n'être observée que lorsque les densités parasitaires sont supérieures ou égale à 180 parasites/ μ l de sang ; elle est densité-dépendante. Pour les densités parasitaires inférieures à ce seuil, le trait HRP2 a tendance à ne pas apparaître. Mais chaque fois que les sujets ont été positifs par le trait pLDH, la densité parasitaire n'a pas influencé ce résultat, c'est-à-dire même pour les faibles densités parasitaires au microscope, le trait pLDH est apparu, bien que, parfois, de façon moins nette ou peu colorée.

6.4. Sensibilité et spécificité par rapport à la goutte épaisse

De manière générale, le test Malaria P.f. Ag HRP2/pLDH a présenté, dans le diagnostic de l'infection palustre à *Plasmodium falciparum* et par rapport à la goutte épaisse une sensibilité de 97,76%, soit 98,02% par HRP2 et 97,50% par pLDH.

Le TDR a une spécificité de 100% aussi bien en combinant l'HRP2 et la pLDH qu'en prenant séparément l'HRP2 et la pLDH.

7. Conclusion

L'étude préliminaire a permis, dans le contexte d'un pays où les données épidémiologiques dataient de plus de 20 ans, de circonscrire le faciès épidémiologique du paludisme de chaque site d'étude. Par la même occasion, elle a permis d'identifier les sites où le recrutement des malades pouvait se faire assez rapidement, étant donné la baisse drastique des indices plasmodiques en milieux hospitaliers et des prévalences de l'infection palustre en population sept ans auparavant dans le sud et le centre du pays (Pointe-Noire, Kouilou, Brazzaville, Gamboma, Oyo). En effet, il fallait s'assurer que là où l'étude sera conduite, il est possible de recevoir les sujets infectés, malades ou asymptomatiques. Les résultats de cette étude montrent que tous les sites sont devenus hypoendémiques sauf Ouesso et Tanry qui semblaient présenter les faciès holoendémiques.

C'est donc, grâce à cette étude préliminaire, que les sites de Ouesso et de Tanry ou Ipendja ont été en définitive sélectionnés pour abriter l'étude relative à l'évaluation du TDR.

Le TDR malaria *P. f.* Ag HRP2/pLDH, évalué et comparé à la goutte épaisse lue au microscope comme technique de référence, présente une grande sensibilité et une spécificité parfaite dans le diagnostic de l'infection palustre à *Plasmodium falciparum*. Si, par le trait T1 ou HRP2, ce TDR reste une technique très sensible, par le T2 ou pLDH il est une technique très spécifique. De ce point de vue, on peut suivre l'évolution d'un traitement antipaludique dans les zones où la lecture de la goutte épaisse n'est pas disponible.

La protéine pLDH fait que ce TDR peut permettre de suivre l'efficacité des antipaludiques lors du traitement de paludisme, surtout en milieu rural où le diagnostic microscopique n'est pas souvent disponible. Cela est d'autant intéressant que l'utilisation des TDR est facile et ne nécessite pas souvent une formation spécifique ; il suffit d'une démonstration rapide par un utilisateur préalablement formé.