



**INSTITUT PASTEUR  
DE MADAGASCAR**

---

# **RAPPORT D'ACTIVITES 2007**

**Institut Pasteur de Madagascar**  
**BP 1274 - 101 Antananarivo**  
**Tel (261 20) 22 412 72/74**  
**Fax (261 20) 22 415 34**  
**E-mail [ipm@pasteur.mg](mailto:ipm@pasteur.mg)**  
**Site Web [www.pasteur.mg](http://www.pasteur.mg)**

*Réseau International des Instituts Pasteur*

# SOMMAIRE

<i>Préambule</i>	
<i>Organigramme</i>	
<i>Adresses électroniques</i>	
<i>Liste du personnel</i>	

## ACTIVITES DE RECHERCHE

- Paludisme .....	13
- Entomologie.....	21
- Peste .....	24
- Tuberculose et mycobactéries.....	32
- Maladies virales .....	41
- Bactériologie .....	46

## ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE

### Activités des différents centres collaborateurs et laboratoires de référence

- Centre Collaborateur OMS pour la Peste .....	54
- Laboratoire National de Référence OMS pour la Poliomyélite .....	57
- Laboratoire National de Référence OMS pour la Rougeole.....	58
- Laboratoire National de Référence OMS pour la Grippe.....	59
- Laboratoire National de Référence des Mycobactéries .....	62
- Laboratoire National de Référence pour la Rage.....	65
- Laboratoire Central de la Bilharziose .....	66

### Autres activités de santé publique

- Activités de Santé Publique du Groupe de Recherche sur le Paludisme.....	68
- Laboratoire pour les Arbovirus et les virus responsables des Fièvres Hémorragiques .....	74
- Appui au Ministère de la Santé pour la surveillance des maladies à potentiel épidémique.....	77
- Entomologie .....	78
- Laboratoire d'Epidémiologie-Surveillance des pathologies de la crevette (LES) .....	81

## ACTIVITES DE SERVICE

- <b>Centre de Biologie Clinique</b>	
• Laboratoire d'analyses médicales .....	86
• Laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques .....	88
- <b>Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement</b> .....	88
- <b>Centre International de Vaccination</b> .....	91
- <b>Centre de Traitement Antirabique</b> .....	91

## ACTIVITES DE FORMATION

- <b>Formations</b> .....	96
- <b>Enseignements</b> .....	99
- <b>Centre de Documentation Scientifique</b> .....	102

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

<i>Publications</i> .....	107
<i>Communications</i> .....	110
<i>Thèses, mémoires</i> .....	113
<i>Missions scientifiques</i> .....	114
<i>Visiteurs</i> .....	115

# Préambule

*L'Institut Pasteur de Madagascar est un établissement de l'Institut Pasteur placé sous tutelle du Ministère de la Santé et du Planning Familial et reconnu d'utilité publique par le Gouvernement de la République Malagasy.*

*Ce statut lui confère quatre missions principales : des activités de recherche directement appliquées aux priorités de santé nationales; des activités de santé publique par ses Centres de Référence OMS ou Nationaux, autorisant des missions d'expertises ou des interventions à la demande du Ministère de la Santé, des activités de formation et d'enseignement essentielles dans le contexte malgache, et des activités de service (Centre de Biologie Clinique, Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement, Centre International de Vaccination).*

*L'année 2007 s'est poursuivie sur le même rythme que l'année 2006 avec :*

*- sur le plan infrastructures, l'inauguration du Laboratoire d'Epidémiologie-Surveillance de la filière crevette financé par l'Agence Française de Développement et de la nouvelle cantine ; et le démarrage du nouveau Laboratoire des Mycobactéries afin de le rapprocher du futur laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 3 financé par la Banque Africaine de Développement;*

*- sur le plan scientifique, une croissance importante en terme de valorisation et le démarrage des projets de recherche internes;*

*- en ce qui concerne la santé publique, un partenariat accru avec le Ministère de la Santé et du Planning Familial, qui a permis l'aboutissement d'un projet de surveillance des syndromes fébriles et des arboviroses en particulier, et d'augmenter le nombre de centres de vaccination antirabique dans le pays. Ces 2 programmes ont reçus le soutien financier de la Banque Mondiale;*

*- sur le plan social, la signature du nouvel accord d'établissement en début d'année et une revalorisation salariale substantielle en fin d'année.*

## **Au niveau des activités de recherche et de santé publique :**

*Dans le domaine du paludisme qui reste la première cause de morbidité et de mortalité à Madagascar, les activités de recherche à l'IPM restent très orientées vers une application directe aux programmes de santé publique. La cartographie de la résistance de Plasmodium falciparum aux antimalariques, financée par le Global Fund et dont les résultats étaient très attendus par les différents acteurs de santé publique à Madagascar, s'est achevée en 2007.*

*Dans le domaine de la peste, Madagascar reste un des pays au monde déclarant le plus de cas. La surveillance de la peste humaine et animale est un axe majeur du programme national de lutte contre cette endémie. L'IPM est Centre Collaborateur OMS pour la peste, seul laboratoire de référence pour la confirmation biologique dans le pays, dont l'agrément a été reconduit par l'OMS en 2004 pour une période de quatre ans. En 2007, le nombre de déclarations de cas de peste à Madagascar a augmenté par rapport à 2006 en raison de quelques épidémies en fin d'année. Le programme de recherche ANR sur le réservoir en collaboration avec l'IRD a démarré en 2007.*

*Les projets de recherche de l'Unité des Mycobactéries se sont orientés depuis 2003 vers le renforcement de ses capacités pour la réalisation d'études cliniques, que ce soit dans le domaine des essais thérapeutiques ou des essais vaccinaux. Ceci implique d'une part, l'évaluation de nouveaux outils pour le diagnostic rapide de la tuberculose et pour le suivi de l'efficacité d'un traitement, et d'autre part, la*

*recherche de marqueurs de l'immunité anti-tuberculeuse, utilisables dans l'évaluation de nouveaux vaccins, au sein des programmes VACSIS et EDCTP.*

*L'Unité de Virologie poursuit avec succès ses programmes d'étude des virus polio recombinants, et les compétences mises en place permettront de poursuivre ces activités dans le domaine encore peu exploré des entérovirus non poliomyélitiques. L'épidémie d'arboviroses (Dengue et Chikungunya) de Toamasina début 2006 a rendu plus aigüe la nécessité de relancer l'activité sur les arbovirus. Grâce au financement de la Banque Mondiale, cette activité a redémarré avec des résultats très intéressants.*

**Au niveau des activités de service**, le Centre de Biologie Clinique a connu en 2007 un maintien de son activité. Il s'investit de plus en plus, grâce notamment au recrutement de deux médecins biologistes malagasy, dans plusieurs programmes orientés vers la santé publique, au premier rang desquels l'étude de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Installé dans ses nouveaux locaux depuis le mois de décembre 2003, le Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement (LHAE) a connu en 2007 un beau succès puisqu'il a été accrédité par le COFRAC pour le programme 59 en juillet 2007.

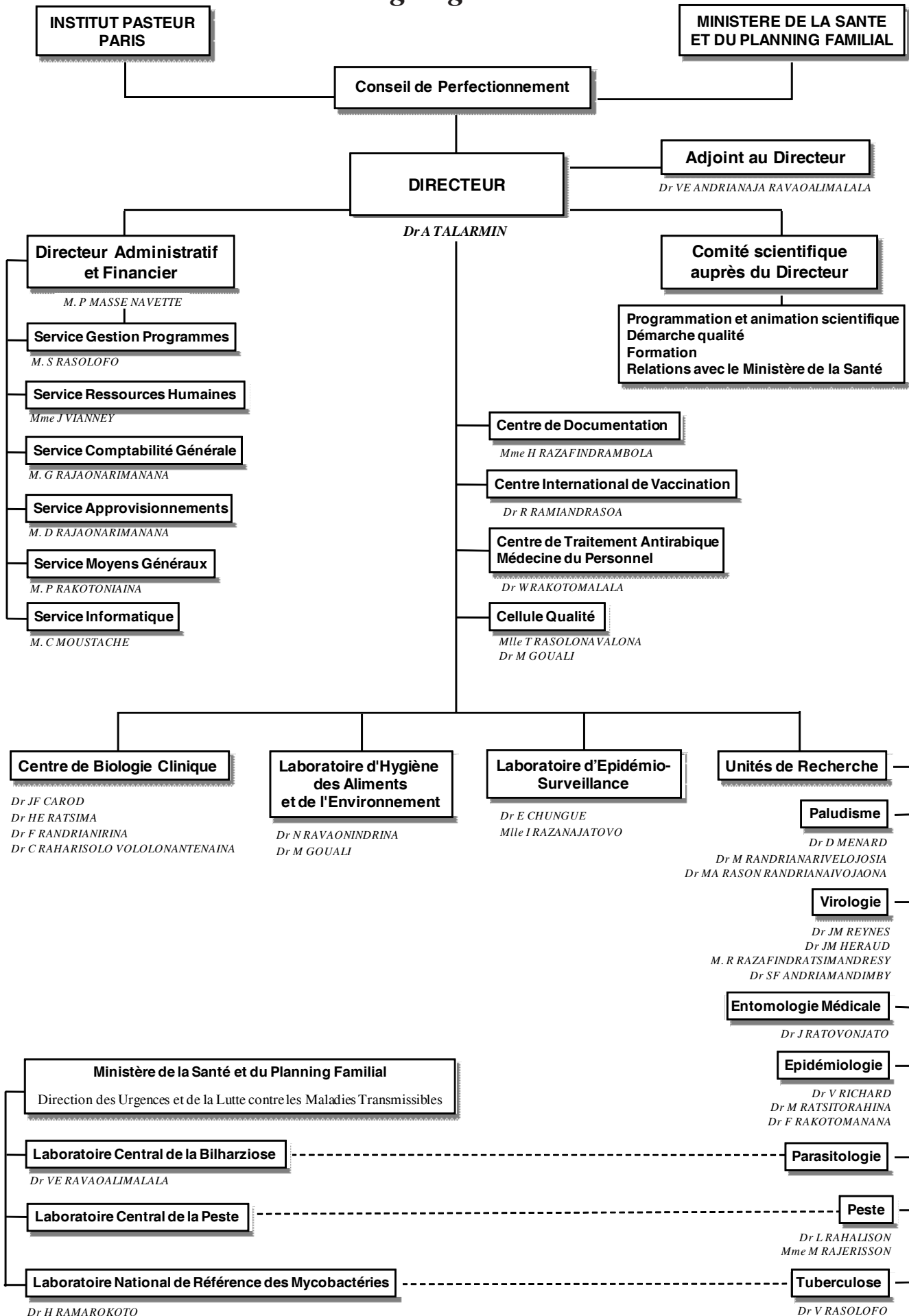
Le reste de l'IPM essaie de suivre l'exemple du LHAE grâce notamment au retour de la responsable qualité après l'obtention du DESS qualité de Tours.

**Les activités de formation et d'enseignement** se sont poursuivies, parmi lesquelles il faut noter la pérennisation de l'Atelier International sur le Paludisme et la poursuite des Rencontres Clinico-Biologiques en partenariat avec les " Confrères de Mada ". D'autre part dans le cadre du renouvellement des cadres scientifiques malgaches de l'IPM un accent particulier est mis sur le soutien des thèses de sciences à l'IPM en privilégiant les thèses en cotutelle par l'octroi de bourses pour les meilleurs étudiants. La formation continue du personnel est également un objectif essentiel bénéficiant d'une ligne budgétaire importante.

**En conclusion**, l'IPM, partenaire scientifique compétent auprès du Ministère de la Santé et du Planning Familial, poursuit sa route pour devenir une institution moderne tant sur le plan des infrastructures que du matériel en essayant de favoriser l'éclosion de jeunes chercheurs malgaches de talent. Ce dernier objectif est la condition pour envisager des activités scientifiques plus fondamentales et innovantes.

**Docteur Antoine TALARMIN**  
Directeur de l'Institut Pasteur de Madagascar

# Organigramme



# Adresses électroniques

<b>Institut Pasteur de Madagascar</b>	ipm@pasteur.mg
<b>Direction</b> TALARMIN Antoine ANDRIANAHA RAVAOALIMALALA Vololomboahangy MASSE-NAVETTE Pascal	atarmin@pasteur.mg andriv@pasteur.mg pmasse@pasteur.mg
<b>Secrétariat de Direction</b> RAJAONERA Lalao	lalao@pasteur.mg
<b>Service Gestion Programme</b> RASOLOFO Serge	strasolo@pasteur.mg
<b>Service Ressources Humaines</b> VIANNEY Jeannine	vianney@pasteur.mg
<b>Service Informatique</b> MOUSTACHE Christian RABENAIVO Celse RAKOTONDRAINY Sandy	moustach@pasteur.mg celse@pasteur.mg sandy@pasteur.mg
<b>Centre de Documentation Scientifique</b> RAZAFINDRAMBOLA Hary RAZAFINTSOA Nivo Mahery RAJERISON Fara	hary@pasteur.mg nivo@pasteur.mg rfara@pasteur.mg
<b>Centre International de Vaccination</b> RAMIANDRASOA Ravo	vaccins@pasteur.mg
<b>Dispensaire antirabique, médecine du personnel</b> RAKOTOMALALA William	malala@pasteur.mg
<b>Centre de Biologie Clinique</b> CAROD Jean François RATSIMA Hariniaina Elisoa RANDRIANIRINA Frédérique RAHARISOLO VOLOLONANTENAINA Clairette BOURDIER Alice	jfcarod@pasteur.mg elisoa@pasteur.mg frederique@pasteur.mg claire@pasteur.mg abourdier@pasteur.mg
<b>Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement</b> GOUALI Malika RAVAONINDRINA Noro RAMIANDRASOA Vero	lhae@pasteur.mg malikagouali@pasteur.mg nravaoni@pasteur.mg vero@pasteur.mg
<b>Laboratoire d'Epidémiologie-Surveillance</b> CHUNGUE Eliane RAZANAJATOVO Iony Manitra	echungue@pasteur.mg ionyr@pasteur.mg
<b>Unité du Paludisme</b> MENARD Didier RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona RASON-RANAIVOJAONA Marie Ange	palu@pasteur.mg dmenard@pasteur.mg milijaon@pasteur.mg mieange@pasteur.mg
<b>Unité de Virologie</b> REYNES Jean Marc HERAUD Jean Michel ANDRIAMANDIMBY Soa Fy RAZAFINDRATSIMANDRESY Richter	jmreynes@pasteur.mg jmheraud@pasteur.mg soafy@pasteur.mg richter@pasteur.mg
<b>Unité d'Entomologie Médicale</b> RATOVONJATO Jocelyn	ratov@pasteur.mg
<b>Unité d'Epidémiologie</b> RICHARD Vincent RATSITORAHINA Maherisoa RAMAROKOTO Charles RAKOTOMANANA Fanjasoa RANDREMANANA Rindra Vatosoa	vrichard@pasteur.mg mahery@pasteur.mg charlesr@pasteur.mg fanja@pasteur.mg rrandrem@pasteur.mg
<b>Unité Peste/ Laboratoire Central de la Peste</b> RAHALISON Lila RAJERISON Minoarisoa	lrahalison@pasteur.mg mino@pasteur.mg
<b>Unité Tuberculose / Laboratoire National de Référence des Mycobactéries</b> RASOLOFO Voahangy RAMAROKOTO Herimanana	vrasolof@pasteur.mg herimana@pasteur.mg
<b>Laboratoire Central de la Bilharziose</b> ANDRIANAHA RAVAOALIMALALA Vololomboahangy RAVONIARIMBININA Pascaline	andriv@pasteur.mg pascalin@pasteur.mg

# Personnel

## Directeur

M. Antoine Talarmin, médecin biologiste des Hôpitaux

## Adjointe au Directeur

Mme Vololomboahangy Ravaoalimalala, médecin

## Directeur Administratif et Financier

M. Pascal Masse Navette

## Secrétaire de direction

Mme Lalao Rajaonera

## Cellule qualité

### Responsable

Mlle Tiana Rasolonavalona

## Centre International de Vaccination

### Responsable

Mme Ramiandrasoa Ravoniaina, médecin

## Centre de Documentation Scientifique

### Secrétaires

Mme Hary Cynthia Colombe Razafindrampola

Mme Nivo Mahery Razafintsoa

Mme Fara Haingotiana Rajerison

## Centre de traitement antirabique

### Médecine du personnel

### Responsable

M. Tharcisius William Rakotomalala, médecin

### Infirmier

M. Rakotonirina Maurice Ratavilahy

## EQUIPE SCIENTIFIQUE

### Centre de Biologie Clinique (CBC)

#### Chef de service

M. Jean François Carod, pharmacien biologiste

#### Adjoints

#### Cellule Anato-mo-pathologie

Mme Clairette Raharisolo Vololonantenaina, médecin anatomopathologiste

Mme Narindra Rakotonanahary, médecin chargé des prélèvements génitaux

#### Cellule Biologie

Mme Elisoa Ratsima, médecin biologiste

Mme Frédérique Randrianirina, médecin biologiste

Mlles Elise Corradi, Alice Bourdier, VIE

#### Surveillants

Mme Henriette Ramalahanoharana, technicienne supérieure

M. Randrianaivo Arsène, technicien qualifié

#### Techniciens

Mme Marie Lidwine Rasoamalala

Mme Fanja Brigitte Razanadrasoa

Mme Eugénie Rambolatiana Rahasana

Mme Bénédicte Razanamialisoa

Mme Lantsoa Miarana Ravololomboahangy

Mme Marie Adeline Raveloarilalao

Mme Odette Voahanginirina

Mme Mialimalala Razanaharinivo

Mme Hanitra Alice Raharison

Mme Bakoly Ramiadantsoa

Mme Marie Goretti Rasoamalala

M. Georges Ranaivo

M. Manantena Eddie Ramanantsoa

M. Hajalalaina Ramaherison

M. Mahenintsoa Rakotondrazaka

M. Nirina Ratrimosalama

M. Epaphras Raseta

M. Velonambinina Fidizara

#### Aide-technicien

M. Nônô Randrianasolo

#### Personnels de laboratoire

M. Jean Pierre Ramangalahy

M. Joachim Rakotomalala

M. David Christie Andrianotohaina

M. Mamy Hugues Ranaivosoa

#### Personnels d'accueil et de secrétariat

Mme Nathalie Rabesahala

Mme Sahondra Randrianja

Mlle Fanja Eliane Randriaharilantsoa

Mme Hanitra Randriantafika

Mme Mamy Voahirana Ramanitriniony

Mme Hantarivelo Rakotomalala

### Unité Bilharziose

#### Chef d'Unité

Mme Vololomboahangy Ravaoalimalala, médecin, chargé de recherches

#### Adjoint

Mme Pascaline Ravoniarimbinina, médecin, détaché du MinSanPFPS

#### Personnels détachés du MinSanPF

Mme Sahondra Rasoanaivo, secrétaire

Mme Céline Lantoharisoa, technicienne de laboratoire

M. Clovis Norbertio Rasamilaza, technicien de laboratoire

M. Lalao Augustin Razanajatovo, garçon de laboratoire

### Unité d'Entomologie

#### Chef d'Unité

M. Jocelyn Ratovonjato, médecin

#### Surveillant

M. Lala Andrianaivolambo, technicien supérieur

#### Personnel de laboratoire

M. Haja Johnson Velonirina

#### Techniciens

M. Etienne Tata

M. Jean Claude Rakotoniaina

M. Rivo Razanampamonjy

## Unité d'Epidemiologie

### Chef d'Unité

M. Vincent Richard, médecin

### Adjoints

M. Maherisoa Ratsitorahina, médecin, coordonnateur  
Mme Fanjasoa Rakotomanana, médecin, responsable cellule de Système d'Information Géographique

### Médecins assistants

M. Charles Emile Ramarokoto  
Mme Rindra Vatosoa Randremanana  
Mme Marie Laurence Randrianasolo  
M. Arthur Dieudonné Randriamanantena  
M. Arsène Ratsimbasoa  
Mme Vaomalala Raharimanga

## Laboratoire d'Epidemio-Surveillance

### Chef de laboratoire

Mme Eliane Chungue, scientifique, HDR

### Adjoint

Mlle Iony Razanajatovo, scientifique

### Techniciens

M. Jeremy Botorafa  
Mme Haingonambinina Harisoa Solomampionona

## Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement

### Chef de laboratoire par intérim

Mlle Malika Gouali, pharmacienne

### Adjoint

Mme Ravaonindrina Noro, médecin, responsable technique

### Conseiller qualité en entreprise

Mme Vero Ramiandrasoa

### Surveillante

Mme Fanjasoa Razafindralambo, technicienne qualifiée

### Secrétaires

Mme Doris Raveloniaina  
Mme Irène Claudia Laharivony

### Techniciens

M. Luc Arsène Andrianantara  
M. Rivoson Rasolomandimby  
M. Chrysostome Rahajason

M. Hiofa Brizon Laifolo  
M. Bien Aimé Emilson Rafanomezantsoa  
M Jean Emile Ravelomandranto  
Mme Eliane Rajaomiarisoa  
Mme Sehen Razanatsiorimalala  
Mme Lantosoa Zoé Raharinivo

### Agents de laboratoire

Mme Odile Raveloniaina  
M. Edmond Randrianasolo  
M. Frédérique Andriamamenosoa  
M. Andry Ravojarahison

### Préparateurs

M. Jean Charles Ramanantsoa  
M. Robinson Ramaroson

## Unité des Mycobactéries

### Chef d'Unité

Mme Voahangy Razanamparany, scientifique

### Adjoint

M. Herimanana Ramarokoto, médecin, bi-appartenant (MinSanPF / IPM)

### Surveillante

Mme Pascaline Ravololonandriana, technicienne de labo

### Techniciens

Mme Elie Jeanne Vololonirina  
M. Andry Toky Rakotoarivo  
M. Basile Louis Razanajatovo

### Personnels de laboratoire

M. René Harifetra Razanatsimba  
M. Frédéric Guy Ranaivondramanga

## Unité Paludisme

### Chef d'Unité

M. Didier Ménard, pharmacien biologiste

### Adjoints

M. Milijaona Randrianariveolosia, scientifique, chargé de recherches  
Mme Marie-Ange Rason, médecin, chargée des programmes de recherches

### Surveillante

Mme Emma Rakotomalala, technicienne supérieure

### Personnel de laboratoire

M. Tianasoa Andriamiandranoro

### Secrétaires

Mme Anjara Mihamina Ramanakoarivo  
Mlle Sylvia Noroarisoa Rakotomalala

### Techniciens

M. Hasinirina Rogelin Raherinjafy  
M. Martial Jahevitra  
M. Stéphane M. Rabearimanana  
M. Tantely Mahefa Randriantsoa

## Unité Peste

### Chef d'Unité

Mme Lila Rahalison, scientifique

### Responsable de la production des bandelettes

Mme Minoarisoa Esther Rajerison, scientifique

### Surveillante

Mlle Claudine Raharimanana, technicienne de laboratoire

### Techniciens (IPM)

Mlle Voahangy Michel Andrianaivoarimanana  
M. Michel Ranjalay  
M. Désiré Andrianimanana

### Personnel de laboratoire IPM

M. Abel Patrick Andriambolamaro



**Techniciens Laboratoire Central de la Peste (MinSan PF)**

M. Mamy Ratsimba  
 Mme Lalao Angeltine Ralafiarisoa  
 Mme Noromihaja Randriananja

**Personnels de laboratoire**

Mme Mariette Rasoasolotsara  
 Mme Delphine Razaiairisoa

**Unité de Virologie****Chef d'Unité**

M. Jean Marc Reynes, docteur vétérinaire

**Adjoints**

M. Mala Rakoto Andrianarivelo, médecin, chargé de recherches

M. Richter Mamy Razafindratsimandresy, scientifique

Mme Soa Fy Andriamandimby, médecin

**Techniciens**

Mme Sendraharimanana Rabemanantsoa

Mme Josette Elysée Razainirina

Mme Ravaoarisoa Rakoto Rakotomalala

M. Nelson Seta Andriamamonjy

M. Girard Marcellin Razafitrimo

M. Herivelo Randriamanantena

M. Tsanta Rakotojoelinandrasana

M. Jean Pierre Ravalohery

**Secrétaires**

Mlle Sarindranirina Andrianimanana

Mlle Aline Ratovohasina

**Personnels de laboratoire**

M. Désiré Rakotondramanana

M. Jules Ravalohery

M. Dodoly Alain Heriniaina

M. Gabriel Ravelojaona

**ADMINISTRATION ET SERVICE TECHNIQUE****Directeur Administratif et Financier**

M. Henri Landart (jusqu'en août)

M. Pascal Masse Navette (depuis août)

**Adjoints**

M. Serge Rasolofo, responsable gestion de programmes

Mme Jeannine R Vianney, chargée des Ressources Humaines

**Assistante au RH**

Mme Annie Josiane Raholiarimalala

**Secrétaire**

Mme Harinivo Razafindravao

**Central téléphonique**

Mme Odile Robsona

M. Jeannot Razafindrabe

M. José Christian Razafimamonjy

**Service de la comptabilité**

M. Germain Rajaonarimanana, chef comptable

M. Félicien Razafimbelo, caissier en chef

Mlle Brigitte Raharimalala, cellule recettes

Mlle Rasoanirina Justine, cellule recettes

Mme Razanamalala Verohanitra Yvonne, cellule dépenses

M. Rakotondrasoa Faly, cellule dépenses

M. Razafimanantsoa Dofaherinjaka, cellule dépenses

**Service Informatique**

M. Christian Moustache, chef de service

M. Sandy Rakotondrainy, contrôleur de gestion

M. Celse Rabenaivo, contrôleur de gestion

**Service des approvisionnements**

M. Rajaonarimanana Dieudonné, responsable du service

M. Razafimandimby Amédée, agent de transit

M. Solofotiana Raharison, agent de transit

M. Daniel Solofo Harrison, magasinier

M. Solo Andrianantenaina, agent d'achat

M. Nirina Rakotonanahary, chargé des suivis de commandes

M. Christian Rasamoelina Rarija, gestion des matériels

**Service des moyens généraux**

M. Prosper Rakotoniaina, chef du service

M. Barinjaka Rabemalala, adjoint au chef de service

**Chauffeurs**

M. Rodolphe Razafindrabe

M. Joseph Randrianasy

M. Désiré Rakotonivelo

M. Gilbert Rakotoniaina

M. Richard Rajerison

M. Jean Alfred Rakotoarinelina

M. Olivier Randriambololona

**Femmes de ménage**

Mme Anne Marie Ravelonoro

Mme Perline Rahantamalala

Mlle Hantanirina Solo Rakotovao

Mme Eméline Rasamoelisoa

**Cantine**

M. Jean Michel Solo Rabefaniraka

M. Zakamanana Randrianjafy

M. Gaétan Emile Razafimarosoa

**Agents de sécurité**

M. Manitra Rasaña Rakotomandimby

M. Joël Yvon Razafilalaintsoa

M. Alphonse Rakotonimaro

M. Paul Randrianarison

M. Gilbert Rakotoarivony

M. Emilson Rakotonirina

M. Edmond Bienvenu Samiveloarilala

M. Hary Lanto Andriamihaja

M. Michel Robert Randrianarisoa

M. Patrick Rakotondrabe

M. Joël Mamitiana

M. Joseph Robin Rabefaratiana

M. Emile Randriamanantena

M. Isidore Ramanantsoa

M. Luc Anderson Rakotondrazaka

M. Bernard Rafanilonirina

M. Michaël Prosper Rakotoniaina

M. Rijaniaina Hasinarivola  
M. Bernard Ratovoarisoa  
M. Narcisse Razafimahaleo

#### **Agents d'entretiens**

M. Lemampandry Ramanandraivonona, incinérateur  
M. Josoia Rabemanantsoa, électricien en chef  
M. Germain Rakotomalala, plombier/électricien  
M. Patrick Razafindrabe, plombier/électricien  
M. Richard Rakotondrainibe, chef de travaux  
M. Jean Fête Rakotonirina, menuisier  
M. Tiana Rakotoniariovo, menuisier  
M. Rolland Augustin, soudeur  
M. Eugène Rakotoasimbola, maçon  
M. Nanytsoa Randrianantenaina, maçon

M. Josoia Rakotomandimby, maçon  
M. Jean Paul Rakotoarisoa, maçon

#### **Jardiniers**

M. Gaby Rasolofonirina  
M. Philibert Ratsimbazafy  
M. Joely Razafilalaintsoa  
M. Jacobson JM Andriamihaja  
M. Seth Rambelosen  
M. Elysé Randriamanantena  
M. Ignace de Loyola Randriamampianina  
M. Joseph José Rakotoniaina  
M. Florentin Randrianantenaina  
M. Pierre Dominique Ramahavalisoa  
M. Jonnah Bernard Rasolonirina

---

---

---

# **ACTIVITES DE RECHERCHE**

---

---

---

---

# ACTIVITES DE RECHERCHE

---

---

## **Considérations générales**

*Placé sous la tutelle du Ministère de la Santé et du Planning familial, l'Institut Pasteur de Madagascar met à la disposition des autorités sanitaires ses compétences dans le cadre de principaux axes de la Politique Nationale de Santé à Madagascar, tout en participant aux grandes interventions dans le domaine des maladies infectieuses.*

*Les recherches de l'Institut Pasteur de Madagascar sont des recherches appliquées aux priorités de santé publique locales. Dans chaque domaine, les résultats des activités menées par les différentes unités doivent permettre d'aboutir à des actions concrètes directement applicables sur le terrain et qui seront proposées aux autorités sanitaires.*

*Mais dans chaque domaine, ces résultats doivent aussi apporter, auprès de la communauté scientifique internationale, leur contribution pour une meilleure connaissance de la maladie, de son mode de transmission, et de ses conséquences en matière de morbidité et mortalité, de traitement et de prévention.*

*Pour mener à bien cette mission, les atouts de l'Institut Pasteur de Madagascar sont certains : compétence scientifique et technologies modernes certes, mais surtout implantation très ancienne et reconnaissance mutuelle auprès des autorités sanitaires, connaissance du terrain et confiance des populations, pérennité de cette présence au-delà d'épisodes épidémiques.*

*Ces atouts lui permettent de développer et d'entretenir des collaborations scientifiques fructueuses, basées sur un échange équilibré et un respect mutuel.*

*Si des domaines de recherche y sont principalement développés, paludisme, peste, tuberculose et maladies virales, d'autres thèmes peuvent être définis en fonction des circonstances épidémiologiques et des échanges d'idées entre scientifiques.*

***Ainsi activités de recherche et de santé publique se complètent et se renforcent mutuellement, au bénéfice de la santé des populations.***

---

---

# PALUDISME

---

---

## RESPONSABLES SCIENTIFIQUES

- **D Ménard**, pharmacien biologiste, chef de l'Unité
- **M Randrianarivelojosia**, scientifique, adjoint au chef de l'Unité

## SCIENTIFIQUES ASSOCIÉS

- **O Domarle** (jusqu'en septembre), scientifique, chef de l'Unité d'Immunologie
- **A Ratsimbasoa, L Randrianasolo, A Randriamanantena**, médecins, Unité d'Epidémiologie
- **F Rakotomanana**, médecin, responsable de la Cellule de Système d'Information Géographique
- **RV Randremanana**, médecin, Cellule de Système d'Information Géographique
- **J Ratovonjato**, médecin, Unité d'Entomologie médicale

## COLLABORATIONS

### Locales

- **M Mosa**, directeur DULMT, Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale
- **A Raveloson**, Chef de Service de Lutte Contre le Paludisme, MinSan PFPS
- **L Tuseo**, Roll Back Malaria, MiniSan PFPS/OMS océan Indien
- **H Rabarison**, Conservation Internationale, Université d'Antananarivo
- **M Ratsimbason**, CNARP, Antananarivo
- **R Rakotomolala, J Razanakolona**, Projet UGP/CRESAN/Global Fund
- **AE Randrianarivo-Solofoniaina, JR Ranjalahy**, Institut National de la Santé Publique et Communautaire
- **L Ralamboranto**, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo
- **J Ravelonarivo, V Raharijaona**, Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo

### Extérieures

- **B Ahmed**, Ministère de la Santé de l'Union des Comores
- **O Mercereau Puijalon, T Fandeur, MT Ekala**, Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites, IP Paris
- **C Bouchier**, Génopôle, IP Paris
- **E Legrand**, IP Cayenne
- **F Arieu**, Institut Pasteur de Cambodge
- **R Jambou**, IP Dakar, Sénégal
- **JB Duchemin**, CERMES, Niger
- **L Penali**, IP Côte d'Ivoire
- **R Laganier**, IP Bangui
- **R Paul**, Unité d'Ecologie des Systèmes Vectoriels, IP Paris
- **R Durand, J Le Bras**, CNRCP, Service de Parasitologie, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris
- **S Picot, F Peyron**, Laboratoire de Parasitologie Mycologie Médicale, Faculté de Médecine, Lyon
- **F Prugnolle**, Génétique et Evolution des maladies infectieuses, UMR CNRS-IRD, Montpellier
- **C Rogier, B Pradines, H Bogreau, T Fussai**, IMTSSA, Le Pharo, Marseille
- **PMillet, D Malvy**, Université Victor Segalen Bordeaux II, France
- **D Mullholand**, Kwazulu Natal University, Durban, Afrique du Sud
- **CH Sibley**, Department of Genomne Sciences, University of Whashington, Seattle
- **D Bell, R Peeling, J Joly**, Malaria diagnostics Malaria, other Vector-borne and Parasitic Diseases, WHO Regional Office for the Western Pacific
- **S Meshnick, J Juliano**, University of North Carolina, USA
- **P Houzé**, Hôpital Saint Louis, Paris, France
- **S Razafimandimbison**, Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm, Suède

## SOUTIENS FINANCIERS

- Ministère Français des Affaires Etrangères (FSP Résistance aux Anti Infectieux)
- Fonds Mondial (GFATM 3<sup>ème</sup> round) Community action to Roll Back Malaria
- Institut Pasteur/Direction des Affaires Internationales
- Fondation Mérieux

- Natixis
  - Impact Malaria - Sanofi Aventis
  - Exxon Mobil Madagascar
  - OMS/Roll Back Malaria Bureau Océan Indien
  - Société KOZONE Madagascar
  - Hôpital Saint-Louis, Paris, France
  - UNICEF/WORLD BANK/WHO Special Programme Research and Training in Tropical Diseases
  - UNICEF (projet pilot "Traitement préventif intermittent du paludisme chez l'enfant, TPLe")
- 

*L'objectif principal de l'URP est d'être reconnue comme un pôle d'excellence au niveau national, régional et international en matière :*

- *d'INFORMATION par la production de données scientifiques sur le paludisme*
- *de FORMATION par la formation de scientifiques nationaux et internationaux.*

*Au cours de ces prochaines années, l'URP se doit donc :*

- *de renforcer sa position de "leader" en matière d'expertise sur le paludisme à Madagascar,*
  - *de développer de nouveaux axes de recherche et de rééquilibrer les activités "Santé Publique" et "Recherche",*
  - *de renforcer les compétences du personnel impliqué dans les projets de recherche,*
  - *de renforcer la visibilité des activités du Groupe de Recherche sur le Paludisme (GRP).*
- 

## **DECOMPOSITION DU PROGRAMME**

### **ACTIVITES DE RECHERCHE**

- 1- Détection des variants minoritaires de *pfprt* mutés chez des isolats de *Plasmodium falciparum***
- 2- Dosage de chloroquine et de monodéséthyl-chloroquine dans le sang**
- 3- Le paludisme à *Plasmodium malariae* à Madagascar : prévalence des infections et évaluation de l'efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement du paludisme à *Plasmodium malariae***
- 4- Etude du polymorphisme des protéines de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax* impliquées dans les tests de diagnostic rapide du paludisme utilisés à Madagascar**
- 5- Paludisme urbain : caractéristiques épidémiologiques du paludisme à Antananarivo**
- 6- Sélection médicamenteuse et immunitaire imposée à *Plasmodium falciparum* en Afrique**
- 7- Etude des remèdes traditionnels à base de «*Katrafay*»**

### **ACTIVITE DE SANTE PUBLIQUE (voir page 68)**

- **Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques à Madagascar et surveillance de la résistance des souches de *Plasmodium falciparum***
  - **Suivi sur 12 mois de l'évolution des marqueurs de résistance de *Plasmodium falciparum* associés à la résistance à la SP au cours du projet "traitement préventif intermittent chez les enfants TPIe" dans 4 pays africains (Bénin, Mali, Sénégal, Madagascar)**
  - **Mise en place d'un contrôle de qualité international des tests de diagnostic rapide du paludisme : projet "malaria specimen bank collection sites"**
  - ***Plasmodium falciparum* isolés des placentas**
  - **Connaissances et pratiques des femmes enceintes face au paludisme dans la capitale**
-

# ACTIVITES DE RECHERCHE

## 1- DÉTECTION DES VARIANTS MINORITAIRES DE *PF CRT* MUTÉ CHEZ DES ISOLATS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

M Randrianariveolosia, S Meshnick, JJ Juliano

### Présentation du projet et des objectifs

L'objectif de cette étude est de détecter avec une technique plus résolutive et plus sensible la présence de populations minoritaires de *Plasmodium falciparum* au *pf crt* muté – le gène qui code pour la résistance à la chloroquine.

A Madagascar, la faible prévalence de *P. falciparum* au *pf crt* muté et la faible fréquence d'échecs cliniques précoces au traitement par la chloroquine au cours des 25 dernières années sont une situation singulière malgré les 60 ans d'utilisation de cette molécule dans l'île. C'est une leçon de l'histoire naturelle du paludisme qui mérite d'être approfondie. L'hypothèse de départ est la suivante : "la circulation à bas bruit de variants minoritaires de *P. falciparum* au *pf crt* muté précède la présence à des taux élevés de souches fortement résistantes à la chloroquine". Une technique plus sensible est ainsi nécessaire pour améliorer la détection de parasites minoritaires porteurs de *pf crt* mutés (< 5% de la population totale présente chez les patients au moment de l'établissement du diagnostic de paludisme).

### Résultats préliminaires

Pour avoir les premiers résultats, permettant de fixer les idées, des ADN d'isolats de *P. falciparum* de Madagascar, collectés en 2002 et en 2004 ont été envoyés aux USA. Sur les 33 isolats de *P. falciparum* de J0 (avant le traitement par chloroquine), 1 (3%) contenait des parasites minoritaires au *pf crt* mutés (24,5% de la population parasitaire totale chez les patients). Mais, ces mutants n'ont pas été retrouvés dans l'isolat de J14 malgré l'échec du traitement. Sur les 30 isolats de *P. falciparum* recrudescents, 4 (13,3%) contenaient des parasites au *pf crt* muté dont 3 (10%) avec des mutants minoritaires (< 5% de la population parasitaire totale chez les patients).

Ces résultats confirment la rareté de souches de *P. falciparum* au *pf crt* muté à Madagascar. Ce qui est en contraste avec le reste de l'Afrique de l'Est et les Comores.

## 2- DOSAGE DE CHLOROQUINE ET DE MONODÉSETHYL CHLOROQUINE DANS LE SANG

M Randrianariveolosia, P Houzé

### Présentation du projet et des objectifs

L'objectif est d'estimer le risque relatif d'intoxication chez les enfants après administration de la chloroquine préemballée préconisée par la politique nationale de lutte contre le paludisme dans la prise en charge à domicile des cas de fièvre chez les enfants de moins de 5 ans.

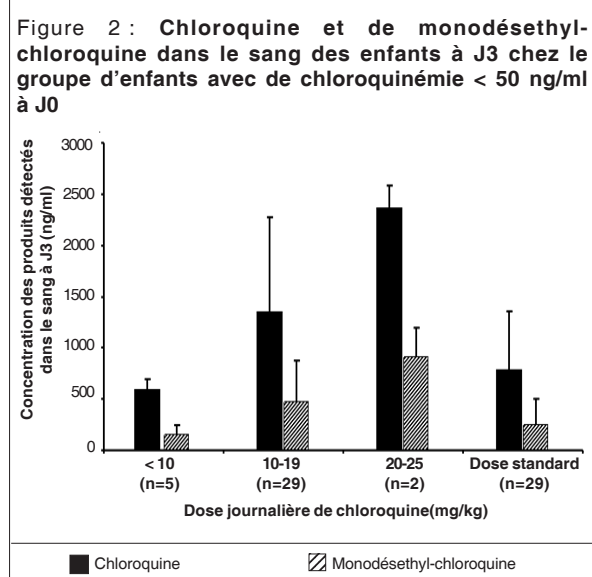
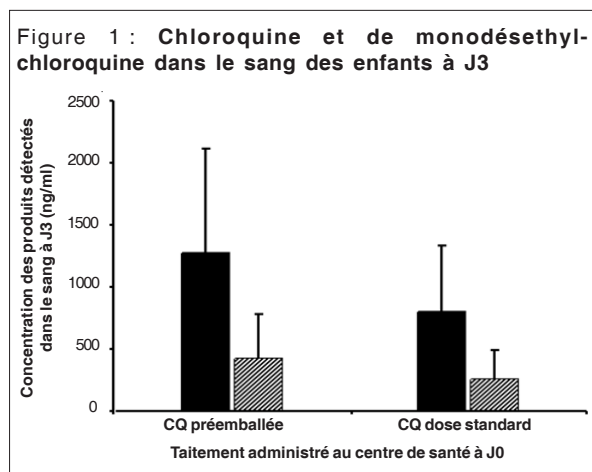
La prise en charge à domicile par la chloroquine des cas de fièvre chez les enfants de moins de 5 ans fait partie de la stratégie de lutte contre le paludisme à Madagascar depuis 2004. La chloroquine préemballée est utilisée dans cette prise en charge, avec un comprimé de chloroquine à 75 mg/jour sur trois jours pour les enfants de 6 à 23 mois ; et un comprimé de chloroquine à 150 mg/jour sur trois jours pour les enfants de 1 à 5 ans. Les premiers lots de chloroquine préemballée ont été mis à disposition de la partie Est de Madagascar où la transmission des parasites du paludisme serait plus élevée que dans le reste du pays. Lors d'une étude du paludisme en période post-cyclonique à Sainte Marie (côte orientale) en 2004, des échantillons de sang (~200 µl) ont été collectés à J0 et J3 (24 heures après la dernière prise de médicament) chez des enfants hyperthermiques (avec ou sans paludisme confirmé) qui ont reçu de la chloroquine préemballée. La médication a été assurée par le personnel de santé local. Parallèlement, un autre lot d'échantillons a été collecté chez des enfants en accès palustre confirmé et traités par la dose standard de chloroquine de 25 mg/kg (10 mg/kg à J0 et J1, et 5 mg/kg à J2). Les échantillons congelés ont été acheminés au laboratoire de biochimie de l'Hôpital Saint-Louis, Paris, France pour le dosage de la chloroquine et du monodéséthyl-chloroquine par une méthode avérée de HPLC.

### Résultats

Pour les paramètres pris en compte, les différences de profil entre les enfants dans les deux bras ne sont pas statistiquement significatives. A J0, avant l'administration de chloroquine prescrite par le personnel de santé, 21,1% des enfants (IC95% : 17,3 –

36,6%) ont eu de la chloroquine à une concentration > 50 ng/ml dans le sang (127 à 2581 ng/ml). Les valeurs de la chloroquinémie à J3 ont été hétérogènes dans chaque bras, avec une moyenne de  $797,6 \pm 255,7$  ng/ml chez les enfants qui ont reçu la chloroquine à la dose standard.

Globalement, la chloroquinémie à J3 était 1,6 fois plus élevée chez les enfants sous traitement par la chloroquine préemballée que celle des enfants ayant reçu la chloroquine à dose standard (figure 1). Dans les deux bras thérapeutiques, à J3, le rapport Chloroquine/Monodéséthyl-chloroquine est près de 3. Dans le bras chloroquine préemballée, la chloroquinémie J3 augmente avec la dose administrée (figure 2). Chez les enfants qui ont reçu moins de 10 mg/kg par jour, la chloroquinémie à J3 est inférieure à celle de ceux qui ont reçu la dose standard de chloroquine.



Ces premiers résultats permettent d'émettre différentes observations générales qui sont à prendre en compte pour les activités futures de recherche en pharmacologie et en pharmacogénétique.

i) La prise de chloroquine avant la consultation n'était pas négligeable à Ste Marie (et *a priori* dans tout Madagascar). Le dosage de chloroquine (ou d'antipaludique en général) dans le sang à J0 permet d'évaluer la pression médicamenteuse globale dans les populations générales.

ii) L'administration de la chloroquine chez un enfant qui en a déjà pris peut entraîner une intoxication. Elle peut au moins intensifier les effets indésirables de la chloroquine. Un échantillon complémentaire de sang est nécessaire pour savoir l'effet de la prise antérieure de chloroquine sur la chloroquinémie à J1.

iii) Une question de réflexion revient à l'esprit : doit-on utiliser la même molécule en première intention pour traiter le paludisme (préssumé ou confirmé) à domicile et dans les centres de santé ?

iv) Les valeurs de chloroquinémie à J3 chez les enfants ayant pris de la chloroquine préemballée ont été hétérogènes. Ces valeurs ne diffèrent pas trop de celles des enfants sous chloroquine à dose standard.

La chloroquine est encore utilisée à Madagascar. Différentes formes et marques sont disponibles (en pharmacie, dans les épiceries, dans les centres de santé). Cette étude sur Ste Marie doit être reproduite dans d'autres régions. Maintenant que la politique tendrait vers la mise à disposition de la combinaison amodiaquine + artésunate au niveau communautaire à Madagascar, la détection des aminoquinoléines sont à faire pour détecter à la fois la chloroquine, l'amodiaquine et la quinine dans le sang des malades.

### 3- LE PALUDISME À *P. MALARIAE* À MADAGASCAR : PRÉVALENCE DES INFECTIONS ET ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE DE LA CHLOROQUINE DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME À *P. MALARIAE*

C Barnadas, C Bouchier, M Tichit, M Jahevitra, S Picot, D Ménard

#### Présentation du projet et des objectifs

Aujourd'hui, l'apparition et la propagation de souches plasmodiales résistantes aux antipaludiques dans de nombreuses régions du globe aggravent le fléau et menacent les efforts de lutte déployés. Alors que la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (CQ) est en expansion dans toute l'Asie du sud-est, l'Afrique et les Amériques, elle s'est plus récemment manifestée chez *P. vivax* et *P. malariae*. Cette résistance est également décrite pour d'autres antipaludiques comme la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), la méfloquine, l'atovaquone-proguanil.

Entre 1966 et 2002, 435 études visant à déterminer l'efficacité thérapeutique *in vivo* ont été publiées, 87%



d'entre elles concernant *P. falciparum*. Dans la même période, moins d'une dizaine concernaient *P. malariae*. Même si la morbidité due à ce parasite reste faible comparée à celle liée aux infections par *P. falciparum*, *P. malariae* ne doit pas être oublié. En effet, les premiers cas de résistance aux antipaludiques de ce parasite ont été décrits et l'on a appris par le passé que cette résistance peut rapidement diffuser. De plus, dans un contexte de changement des politiques nationales de traitement dans les pays où le paludisme est endémique, on mesure mal les conséquences que peut avoir la diminution de la prévalence de *P. falciparum* sur les autres espèces plasmodiales infectant l'homme. On a ainsi vu réapparaître *P. vivax* en Corée plusieurs années après son éradication. Qu'en sera-t-il pour *P. malariae* ?

Cette étude a permis de déterminer que :

- la fréquence des infections palustres à *P. malariae* est de 1,1% sur le territoire malgache ce qui place *P. malariae* en troisième position ,
- la sensibilité de ce parasite aux antipaludiques, notamment à la chloroquine est très bonne.

#### 4- ETUDE DU POLYMORPHISME DES PROTÉINES DE *P. FALCIPARUM* ET DE *P. VIVAX* IMPLIQUÉES DANS LES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE DU PALUDISME UTILISÉS À MADAGASCAR

N Mariette, C Barnadas, C Bouchier, M Tichit, D Ménard

#### Présentation du projet et des objectifs

A Madagascar, les tests de diagnostic rapide permettent l'amélioration du diagnostic du paludisme dans les régions éloignées qui ne peuvent bénéficier des techniques de référence. Plusieurs tests sont actuellement commercialisés et reposent sur des méthodes immunochromatographiques qui détectent les antigènes spécifiques produits par les parasites. Les principaux antigènes détectés sont PfHRP2, pLDH et aldolase. Il y a peu d'uniformité dans les résultats obtenus pour différents produits ou pour le même produit examiné dans différents endroits. De nombreux facteurs peuvent affecter la détection, notamment les facteurs expérimentaux et les facteurs liés au parasite. Parmi ces facteurs liés au parasite, un facteur en grande partie encore inconnu est la variabilité dans l'antigène détecté par le test de diagnostic rapide (TDR). En partant de l'hypothèse, déjà formulée par Baker *et al.*, JID 2005, que la variabilité dans les résultats des TDR est liée à la variabilité de l'antigène cible, nous nous proposons d'étudier le polymorphisme des protéines de *P. falciparum* et de *P. vivax* impliquées dans les tests de diagnostic rapide du paludisme (PfHRP2, pLDH et

aldolase) ainsi que PfHRP3 dans près de 300 isolats provenant de 15 sites représentatifs des différents faciès épidémiologiques présents à Madagascar.

#### Résultats

Les séquences sont en cours d'analyse.

#### 5- PALUDISME URBAIN : CARACTÉRISTIQUES ÉPIDÉMIOLOGIQUES DU PALUDISME À ANTANANARIVO

F Rakotomanana, R Randremanana, L Randrianasolo, J Ratovonjato, L Andrianaivolambo, R Raherinjafy, D Ménard

#### Présentation du projet et des objectifs

Afin de comprendre et d'étudier les caractéristiques épidémiologiques du paludisme urbain à Antananarivo (Madagascar), nous avons réalisé une étude basée sur le modèle d'étude RUMA (Rapid Urban Malaria Appraisal). Cette méthode consiste à collecter le minimum de données sur les caractéristiques du paludisme urbain à Antananarivo et d'évaluer les risques palustres en fonction de la densité humaine, des facteurs socio-économiques et environnementaux.

L'étude a été menée parallèlement sur 10 sites représentatifs des différents contextes environnementaux d'Antananarivo et des niveaux de transmission (centre/faible, intermédiaire/moyenne et périphérique/élevée) : deux sites en Centre ville où la densité humaine est la plus forte et où l'environnement est *a priori* défavorable au développement des anophèles vecteurs. A partir du centre, dans les axes Nord/Sud et Est/Ouest, 4 sites ont été suivis dans les zones périurbaines à la transition avec les zones rurales (à 5 kilomètres du centre), et 4 autres sites en périphérie (10-15 kilomètres à partir du centre ville).

Cette étude comportait 6 volets :

- **Revue de littérature** : Une recherche sur les bases de données bibliographiques PUBMED a été réalisée en utilisant les mots "paludisme", "urbain" et "Afrique subsaharienne". La recherche a été limitée sur les publications parues en anglais et en français. Les résumés dans les bibliothèques universitaires et les hôpitaux nationaux ont également été recueillis.

- **Collecte de données statistiques émanant du système de santé** : Les données et statistiques mises à jour et validées sur le système de santé incluant les rapports sur la mortalité et morbidité palustre ont été collectées auprès du Ministère de la Santé et du Planning Familial (service de surveillance des maladies, département municipal de santé, responsable du programme national de lutte contre le paludisme. Les

données démographiques récentes ont été collectées auprès de l'Institut National des Statistiques.

**- Cartographie des zones à risque de paludisme :**

**Centres de santé :** les données environnementales et épidémiologiques ont été intégrées au sein d'un SIG, permettant de déterminer la corrélation spatiale entre les facteurs de risque potentiels et l'apparition du paludisme. Les coordonnées géographiques des centres de santé et des malades trouvés positifs ont été recueillies à l'aide d'un global positioning system (GPS).

**Collecte de larves :** quatre collectes de larves ont été effectuées durant l'étude en novembre 2006 (début de la saison de pluies), en janvier et avril 2007 (saison humide) et en juillet (saison sèche et froide). Les plans d'eaux dans chaque site ont été identifiés et cartographiés en utilisant un GPS.

**Capture d'anophèles :** en même temps que la collecte de larves, 21 maisons situées dans les 200 mètres à partir de la plus grande et la plus proche du gîte ont été sélectionnées au hasard. Sept maisons par matinée (entre 6 h et 10 h du matin) ont fait l'objet de la capture. L'espèce des vecteurs a été identifiée associée à un test Elisa des glandes salivaires des moustiques femelles pour la détection des sporozoïtes.

**- Diagnostic des cas suspects dans les dispensaires :** des données épidémiologiques ont été collectées à partir du mois d'octobre 2006 au décembre 2007 dans 10 sites dans le but d'étudier la saisonnalité et la part du paludisme sur les fièvres vus en consultation par mois. Des prélèvements sanguins au bout de doigt ont été effectués sur papier buvard pour le PCR.

**- Description du système de santé :** ceci concerne l'effort de lutte et de prévention existant dans la localité, aire de couverture du centre de santé, système de surveillance, prise en charge du paludisme et la résistance aux antipaludiques.

## Résultats

Toutes les données ont été recueillies et leurs analyses sont en cours.

### 6- SÉLECTION MÉDICAMENTEUSE ET IMMUNITAIRE IMPOSÉE À *P. FALCIPARUM* EN AFRIQUE

*F Prugnolle, D Fontenille, E Leroy, D Ménard, I Mahamadou, J Akiana, JF Trape*

## Présentation du projet et des objectifs

La littérature nous montre que le polymorphisme de *P. falciparum* est important tant au niveau des gènes codant pour les antigènes de surface (déclenchant une réponse immunitaire chez l'homme) qu'au niveau des gènes impliqués dans la résistance aux drogues. C'est

un facteur majeur qui ralentit, par exemple, le développement d'une immunité protectrice contre le parasite. Connaître et analyser les mécanismes responsables du polymorphisme des gènes codant pour les antigènes ou responsables de la résistance aux médicaments et leurs diversités au sein et entre populations parasitaires constituent donc un point crucial pour le développement efficace de futures stratégies médicamenteuses et vaccinales.

Les objectifs de notre projet sont de caractériser pour la première fois, de manière comparative et exhaustive, à l'échelle panafricaine :

- les pressions de sélections imposées par le système immunitaire de l'homme sur les antigènes de surface, cibles des vaccins, exprimés à différents stades du parasite et dans différentes populations

- les pressions de sélections imposées par l'utilisation de médicaments telle la chloroquine sur les gènes impliqués dans la résistance et leurs conséquences sur le maintien de la diversité génétique à ces gènes

- l'effet conjoint de la démographie et de la sélection sur le maintien et la distribution de la variabilité génétique de ces gènes majeurs du développement infectieux.

## Résultats

Au total, 60 isolats (20 souches recueillies en 2007 provenant du Sud, 20 souches de l'Ouest et 20 souches de l'Est de Madagascar) de *P. falciparum* ont été envoyés au laboratoire de Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses à l'IRD de Montpellier. Les analyses sont en cours.

### 7- ETUDE DES REMÈDES TRADITIONNELS À BASE DE "KATRAFAY"

*M Randrianariveლოსია, H Rabarison, M Ratsimbason, S Razafimandimbison*

## Présentation du projet et des objectifs

L'intégration de la médecine traditionnelle dans le système de soin primaire s'inscrit dans la politique de santé à Madagascar; mais la médecine traditionnelle souffre du manque de preuve d'efficacité et/ou de toxicité des remèdes. Il est prévu depuis quelques années de fédérer des équipes compétentes nationales (chimistes, botanistes, écologistes et paludologues) dans des structures publiques et universitaires pour réaliser "autrement" des études en ethnopharmacologie orientée vers les plantes malgaches anti-tazo (dites antipaludiques). Adopter une approche ethno-taxonomique (compte tenue de la subtilité des dialectes

locaux) sert pour mieux comprendre les informations sur les maladies et les traitements dans le contexte de la médecine traditionnelle. “*Katrafay*” est le nom local de la plante réputée anti-tazo dans tout Madagascar. Les résultats de plusieurs enquêtes ont confirmé que l’utilisation du nom local “*katrafay*” induit une confusion d’identité de plante car les huit espèces de *Cedrelopsis* peuvent être appelées *katrafay* dans différentes régions.

Un projet avec des “partenaires” a été rédigé, répondant à l’appel d’offre du Ministère français des Affaires Etrangères (<http://tech.groups.yahoo.com/group/sudexpertplantes>).

Des échantillons d’écorce de tige des 8 espèces de “*katrafay*” seront remis à l’Institut Pasteur de Madagascar pour l’extraction (préparation de remèdes sous forme de tisane) et la réalisation du test anti-Plasmodium.

---

## ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE

(voir page 68)

# ENTOMOLOGIE MEDICALE

## 1- BIODIVERSITÉ, PHYLOGÉOGRAPHIE ET DYNAMIQUE ÉVOLUTIVE DES MOUSTIQUES VECTEURS DE DEUX ARBOVIROSES ÉMERGENTES (LA FIÈVRE CHIKUNGUNYA ET LA FIÈVRE DE LA VALLÉE DU RIFT), AU CAMEROUN ET À MADAGASCAR (PROJET ACIP)

IPM : L Andrianaivolambo, JC Rakotoniaina, E Tata, R Razanampanjato, J Ratovonjato, JM Reynes  
IPP : C Dauga, PF 4

### Objectifs

Ce projet a pour objectifs de :

- collecter et d'identifier les espèces de moustiques potentiellement vectrices des virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (VFVR) et de la fièvre Chikungunya (CHIKV),

- définir la composition génétique des populations des vecteurs collectés et de dresser l'arbre phylogénétique de ces vecteurs,

- définir l'influence de l'histoire dans la structure des populations des vecteurs.

En 2007, pendant la saison des pluies, des collectes de moustiques adultes à l'aide des pièges à double moustiquaire, des pièges lumineux type CDC simple et des pièges lumineux type CDC appâtés avec du CO<sub>2</sub> ainsi que des collectes de larves de moustiques dans les potentiels gîtes larvaires des vecteurs de virus de la FVR et du CHIKV dans 5 sites à bioclimats différents ont été réalisées (figure 1).

### Résultats

Au total, 1713 moustiques adultes ont pu être collectés dont 995 collectés à l'état adulte et 718 collectés à l'état larvaire.

#### *Vecteurs potentiels du VFVR*

Au total, 7 espèces de moustiques (appartenant à cinq genres) et qui sont potentiellement vectrices du VFVR ont été collectées dans les 5 sites prospectés. *Culex quinquefasciatus* est l'espèce la plus abondante; elle est suivie par deux autres espèces : *Culex antennatus* et *Mansonia uniformis*.

#### *Vecteurs potentiels du CHIKV (larves /adultes)*

Avec les méthodes utilisées, aucun *Aedes aegypti* adulte n'a été capturé. Les moustiques adultes de cette espèce et conservés à -70°C ont été obtenus à partir d'élevage des larves.

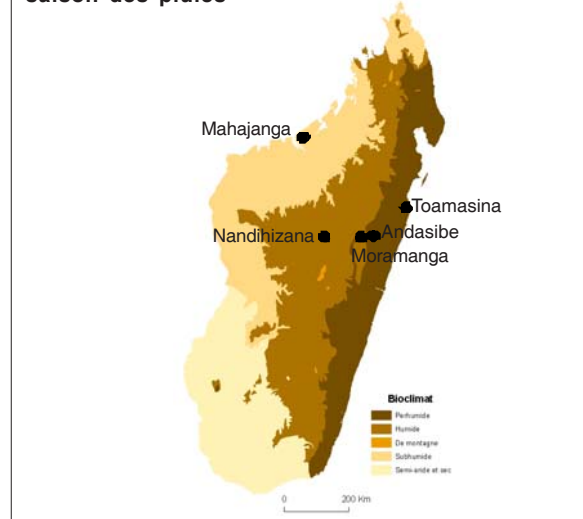
*Ae. albopictus* adulte n'a été capturé que dans deux sites (Moramanga et Toamasina) tandis que les larves

d'*Ae. albopictus* ont pu être collectées dans 5 sites prospectés.

### Diagnostic CHIKV

Au total, 36 pools de moustiques adultes obtenus à partir de l'élevage des larves dont 31 pools d'*Ae. albopictus* et 5 pools d'*Ae. aegypti* ont été testés par CHIKV RT-PCR. Parmi ces 36 pools testés, quatre pools, ont été confirmés "CHIKV RT-PCR positive". Par contre, aucun virus n'a pu être isolé de ces pools de moustiques RT-PCR positive.

Figure 1 : Sites de collectes de moustiques en saison des pluies



## 2- ETUDE MOLÉCULAIRE DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCES AUX INSECTICIDES D'*ANOPHELES FUNESTUS* ET DU COMPLEXE *ANOPHELES GAMBIAE S.L* COLLECTÉS DANS 5 VILLAGES DES HAUTES TERRES CENTRALES (HTC) DE MADAGASCAR

IPM : JC Rakotoniaina, L Andrianaivolambo, E Tata, R Razanampanjato, J Ratovonjato  
MinSan PFPS : service entomologie

### Objectif

Détecter la mutation de type Leucine-Phénylalanine au niveau du gène des Canaux Sodium Voltage Dépendants d'*Anopheles funestus* et du complexe *An. gambiae s.l.* collectés en 2005 et 2006 par le Service d'Entomologie du MinSan PFPS dans 5 villages des HTC de Madagascar.

### Moustiques

Au total, 834 moustiques ont été testés dont 244 trouvés résistants aux insecticides d'après les résultats

des tests de sensibilité aux insecticides réalisés, selon le standard OMS, par le Service d'Entomologie du MinSanPFPS (tableau I) et 590 *An. gambiae s.l.* sensibles (49 collectés à Andoharanofotsy, 211 à Ambohitromby, 47 à Antanetibe, 232 Fanjakana et 51 à Soavina). Ces moustiques sensibles sont les moustiques trouvés morts après les tests de sensibilité standard OMS.

### Méthode

Après l'identification systématique par PCR des moustiques appartenant au complexe *An. gambiae s.l.*, une amplification du gène de résistance par la méthode définie par Martinez - Torres et al., 1998 modifiée a été utilisée pour détecter la mutation leucine-phénylalanine du gène "canal sodium voltage dépendant" qui traduit une mutation *Kdr*.

### Résultats

- Tous les *An. gambiae s.l.* testés (829/829) ont été identifiés comme étant des *An. arabiensis*.

- Aucune mutation de type *knock - down resistance (Kdr)* n'a été détectée avec les tests réalisés sur les 834 moustiques.

### Conclusion

La mutation leucine-Phénylalanine ne semble pas être impliquée dans la résistance aux DDT, à la Permethrine et à la Deltaméthrine d'*An. funestus* et d'*An. arabiensis* collectés dans 5 villages des HTC de Madagascar en 2005 et 2006.

Tableau I : Nombre d'*Anopheles funestus* et d'*An. gambiae s.l.* testés par localité et par type de résistance

Localité	District	Date collecte	Espèce	Nb	Test standard OMS
Andoharanofotsy	Antananarivo	01/02/2006	1	30	DDT - R
		01/02/2006	1	27	DDT - R
Antanetibe	Anjozorobe	2005 - 2006	2	5	DDT - R
Ambohitromby	Ankazobe	19/06/2006	1	16	Permethrine - R
Fanjakana	Fianarantsoa II	20/11/2006	1	30	DDT - R
		21/11/2006	1	8	Deltaméthrine - R
		22/11/2006	1	37	Permethrine - R
Soavina	Ambatofinandrahana	09/04/2006	1	30	DDT - R
		09/04/2006	1	30	DDT - R
		09/04/2006	1	31	DDT - R
<b>Total</b>				<b>244</b>	

(1) = *Anopheles gambiae s.l.* ; (2) = *Anopheles funestus* , R = résistant

### 3- ETUDES DES CARACTÉRISTIQUES ÉPIDÉMIOLOGIQUES DU PALUDISME URBAIN À ANTANANARIVO (MADAGASCAR)

IPM : L Andrianaivolambo, JC Rakotoniaina, E Tata, R Ramanampanjato, J Ratovonjato, Unité Paludisme, Unité d'Epidémiologie

Université d'Antananarivo : A Z Suzanantsoa

Dans ce projet qui a été coordonné et mis en place

par les Unités Paludisme et Epidémiologie depuis novembre 2006 dans 6 sites appartenant à des différents contextes environnementaux d'Antananarivo : deux sites au centre, deux dans la zone intermédiaire et deux en périphérie, l'Unité d'Entomologie médicale avait pour rôle de collecter et d'identifier les moustiques (issus de l'élevage des larves collectés dans les sites d'études et tous les moustiques collectés au stade adultes), d'évaluer l'infectivité des espèces vectrices. Seuls les résultats des activités de l'Unité d'Entomologie médicale en 2007 sont présentés dans ce rapport. Un rapport intermédiaire du projet a été déjà envoyé au bailleur (Caractéristiques épidémiologiques du paludisme dans la ville d'Antananarivo (Madagascar) - rapport intermédiaire mars 2007.

### Les gîtes larvaires et les larves de moustiques trouvées

Au total, 10 types de gîtes larvaires potentiels à Anophèles ont été recensés (n=398). Par ordre décroissant, les gîtes larvaires potentiels les plus fréquemment rencontrés étaient : rizières (35,2%), trous d'eau d'arrosage (15,8%), étangs (12,8%), marais (11,3%), eaux stagnantes (8,0%), canaux d'irrigation (6,3%), cressonnières (4,5%), canaux d'évacuation (3,3%), trous à briques (2,0%) et trous d'eau de lessive (0,8%). L'identification des moustiques adultes issus de l'élevage des larves collectées dans l'ensemble des sites d'étude a montré :

- en janvier 2007 (saison des pluies) : 34,1% des gîtes étaient positifs. L'espèce dominante était *An. arabiensis* (n=233, 42,4%) et le nombre d'espèces retrouvées était plus élevé : les principaux gîtes à *An. arabiensis* étaient les rizières (56%), les trous à briques (21%) et les étangs (8%). Pendant la même période, *An. arabiensis* représentait 38,3 % (n=36) des espèces de moustiques adultes capturées au repos à l'intérieur des maisons;

- en mars 2007 (fin de la saison de pluies) : 13,8% des gîtes étaient positifs. *An. arabiensis* représentait 12,5% des moustiques collectés (n=20). Les principaux gîtes à *An. arabiensis* étaient les trous à briques (60%) et les rizières (40%).

Concernant les moustiques adultes capturés au repos à l'intérieur des maisons *An. arabiensis* représente les 11,7% (n=11).

### Infectivité des vecteurs

La technique ELISA/CSP a été utilisée pour détecter l'infectivité des vecteurs capturés au repos à l'intérieur des maisons, aucun moustique n'a été trouvé porteur de *Plasmodium*.



#### 4- MISE AU POINT DE LA PCR POUR DÉTECTER LA PRÉSENCE DE *YERSINIA PESTIS* CHEZ LA PUCHE *X.CHEOPIS*

IPM : JC Rakotoniaina, J Ratovonjato, Unité Peste  
Laboratoire Central de la Peste

##### Contexte

La piqûre des puces vectrices reste le mécanisme majeur de la transmission de la peste dans les zones d'endémie. A Madagascar, la bactériologie et les bandellettes réactives sont actuellement les deux méthodes utilisées pour détecter *Yersinia pestis* chez les Hôtes et/ou les vecteurs qui sont *Xenopsylla cheopis* et *Synopsyllus fonquerniei*; la méthode bactériologique reste le gold standard.

En 2007, une étude ayant pour objectif de mettre au point la PCR et d'évaluer l'efficacité de cet outil pour détecter la présence de *Y. pestis* chez *X. cheopis* d'élevage avait été menée au sein de l'Unité d'Entomologie médicale.

##### Matériel et méthodes

Au total, 151 *X. cheopis* d'élevage, infectées artificiellement sur du sang de souris hépariné contenant approximativement  $10^8$  de *Y. pestis* par millilitre de sang selon la méthode proposée par *Hinnebusch et al.*, 1993 avait été utilisée.

Après gorgement sur du sang infecté, les puces étaient séparées en 4 lots dont le premier lot était broyé puis testé en PCR à J0. Les 3 lots restants étaient élevés dans une pièce à température 21°C et à une humidité relative 75% jusqu'à J2 pour le 2<sup>ème</sup> lot, J7 pour le 3<sup>ème</sup> lot et J14 pour le 4<sup>ème</sup>. Les puces gorgées sur du sang infecté ont été broyées individuellement dans 100 µl de brain-heart infusion (BHI) puis testées individuellement par PCR simplex pour détecter le gène codant pour l'activateur du plasminogène (pla) de *Y. pestis* (478pb) selon la méthode décrite par *Hinnebusch et al.*, 1996.

Un lot témoin constitué de 77 *X. cheopis* était gorgé avec du sang non infecté et traité de la même façon que les puces testées.

La souche de *Y. pestis* utilisée est la souche 91/07 S du Laboratoire Central de la Peste.

##### Résultats

La figure 1 présente la photo de gel après électrophorèse des amplifiats de puces infectées tandis que le tableau I montre l'évolution du pourcentage des puces "PCR positive" de J0 à J14.

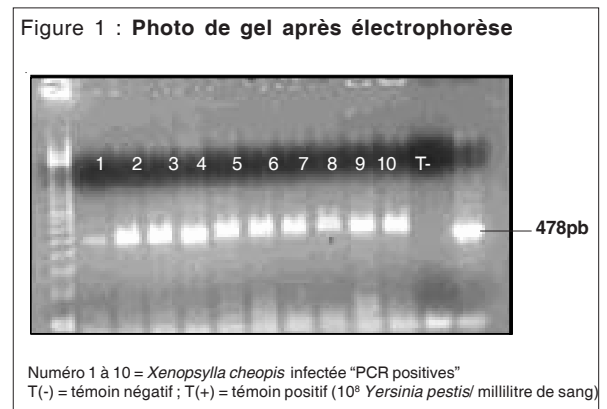


Tableau I : Proportions des puces "PCR positives" par jour de suivi

Jour de suivi	Nb puces testées (% positif en PCR)
J0	20 (95,0)
J2	51 (60,8)
J7	33 (75,8)
J14	20 (35,0)

Le pourcentage des puces témoins "PCR positives" de J0 à J14 = 0% (0/70)

##### Perspectives

- Evaluation de l'efficacité de l'outil PCR sur puces sauvages Surtout pendant la saison de transmission
- comparaison de la PCR aux autres méthodes de diagnostic disponibles.

## ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE

(voir page 78)

---

---

# PESTE

---

---

## RESPONSABLES SCIENTIFIQUES

- **L Rahalison**, Ph.D, chef de l'Unité Peste
- **L Ralimanantsoa**, MD, chef du Laboratoire Central Peste (CNR) jusqu'en février
- **M Rajerison**, Ph.D, adjointe production de bandelettes de diagnostic

## SCIENTIFIQUES ASSOCIES

- **V Richard**, médecin, chef de l'Unité d'Epidémiologie
- **J Ratovonjato**, médecin, chef de l'Unité d'Entomologie
- **O Domarle**, chef de l'Unité d'Immunologie

## COLLABORATIONS

### Locales

- **J Randriambeloso**, **H Ramiakajato** : Programme National de Lutte contre la Peste, Direction des Urgences et de la Lutte contre les Maladies Transmissibles / Service de Lutte contre les Maladies Endémiques / Division Peste - DULMT/SLME, Ministère de la Santé et du Planning Familial
- **SSPFD** d'Antananarivo Avaradrano, Arivonimamo, de Miarinarivo, de Tsiroanomandidy, d'Antsirabe II, de Betafo, de Moramanga, d'Andilamena
- **Direction Régionale de Santé DRSPF** des Régions Analamanga, Itasy, Vakinankaratra, Haute Matsiatra et Alaotra Mangoro
- **Département de Biologie Animale**, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo
- **Département de Géographie**, Faculté des Lettres, Université d'Antananarivo
- **Organisation Mondiale de la Santé**, Représentation Antananarivo

### Extérieures

- **H Tomaso**, **W Spletstoesser**, Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Allemagne
- **JM Duplantier**, **C Brouat**, **C Tollenaere**, CBGP IRD Montpellier
- **R Bianucci**, Département de Biologie Animale et de l'homme, Université de Turin, Italie
- **G Del Prete**, Dept. Internal Medicine, University of Florence, Italie
- **I Bitam**, **L Belhabri**, Institut Pasteur d'Algérie
- **D Thi Ngoc Tuyet**, Institut Pasteur de Nha-Trang, Viet-Nam
- **E Carniel**, **C Demeure**, Centre de Référence National Yersinia et Centre Collaborateur OMS Peste, IP à Paris
- **F Nato**, **S Dartevelle**, Laboratoire Ingénierie des Anticorps, IP à Paris
- **Y Germani**, Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, IP à Paris
- **JC Shako**, Laboratoire de Référence du Nord-Est de l'Ituri à Bunia, République Démocratique de Congo
- **D Rakotoarison**, **A Kinzelbach**, Malteser International
- **L Arntzen**, National Health Laboratory Service (NHLS), Johannesburg, South Africa
- **E Bertherat**, OMS/HQ/HSE/EPR, Genève
- **D Laffly**, Université de Pau et des Pays de l'Adour (UPPA)
- **P Handschumacher**, Université de Strasbourg

## SOUTIENS FINANCIERS

- Gouvernement Malagasy - Projet CRESAN 2 d'Appui à la lutte contre la Peste (Banque Mondiale), jusqu'en avril 2007
- Organisation Mondiale de la Santé (APW)
- IP Paris, Actions Concertées Inter-Pasteuriennes (ACIP), Programmes Transversaux de Recherches (PTR)
- Institut Pasteur de Madagascar
- Agence Nationale de la Recherche (ANR) - Santé Environnement Santé Travail (SEST)
- Malteser International

*En terme de santé publique, l'année 2007 a été marquée par une augmentation d'environ 41.5 % du nombre de notification de cas de peste, alors que 2005 et 2006 avaient vu une baisse par rapport aux années précédentes. Le taux de confirmation biologique continue toujours de s'améliorer, la létalité chez les cas notifiés n'est pas descendue au dessous du seuil des 10%, objectif du Programme National (12,1% en 2007).*

*Malgré l'absence de financement du Laboratoire Central de la Peste, des efforts de gestion ont été entrepris pour pouvoir assurer au minimum le diagnostic de routine et le ravitaillement en tests rapides des Centres de Santé de Base (CSB). Néanmoins, d'autres activités ont du être réduites voire supprimées : la surveillance de peste murine à Antananarivo et Mahajanga s'est arrêtée (surveillance rongeurs et surveillance puces), une seule mission d'investigation d'épidémie a été menée, aucune supervision formative de l'utilisation des tests rapides n'a pu être effectuée.*

*En terme de recherche, l'année 2007 a été marquée par le démarrage de nouveaux projets de recherches en Santé et Environnement, notamment des travaux sur les réservoirs. Le même programme de recherche, pour le volet vecteurs, s'est vu être renforcé dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Liverpool.*

---

## **DECOMPOSITION DU PROGRAMME**

### **CENTRE COLLABORATEUR OMS POUR LA PESTE**

#### **ACTIVITES DE RECHERCHE**

- 1- Développement et évaluation d'outils de diagnostic et de surveillance de la peste : évaluation d'une PCR en temps réel**
- 2- Etudes de la réponse immunitaire au cours et au décours de l'infection pesteuse**
- 3- Etudes sur la diffusion de la peste à Madagascar : importance des déplacements des hommes et des rats de l'échelle de l'habitat à celle du paysage; détermination des facteurs de risque**
- 4- Génétique et évolution de la résistance à la peste chez le rat noir *Rattus rattus***

#### **ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE (voir page 54)**

- 1- Surveillance de la peste humaine**
  - 2- Investigation d'épidémie**
  - 3- Activités du Centre Collaborateur OMS Peste**
-



# ACTIVITES DE RECHERCHE

## 1- DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION D'OUTILS DE DIAGNOSTIC ET DE SURVEILLANCE DE LA PESTE : ÉVALUATION D'UNE PCR EN TEMPS RÉEL

IPM : *L Razanakoto, M Ratsimba, L Rahalison*  
Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale  
Bundeswehr Institute of Microbiology : *H Tomaso, W Spletstoeser*

### Introduction

Une des priorités de recherche opérationnelle dans le domaine de la peste est l'amélioration des outils de diagnostic biologique. La culture, pour l'instant "Gold Standard", est une technique avantageuse du fait de l'obtention des souches de *Yersinia pestis* pour la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques mais aussi pour des études de typage moléculaire ultérieures. Elle présente néanmoins l'inconvénient d'être peu sensible, influencée par la mise en place de traitement antibiotique, influencée par la présence de contaminants et par les délais d'acheminement des prélèvements. Les 10 dernières années, le taux de confirmation par cet outil s'est sensiblement amélioré (de 20 à 40%). Une des grandes avancées en terme de diagnostic biologique de la peste a été le développement d'un test immunochromatographique de détection d'antigène F1 spécifique de *Y. pestis*. Les avantages prouvés de cet outil ont permis de gagner sa reconnaissance au niveau international comme méthode de confirmation dans un contexte d'endémie pesteuse (réunion OMS, 2006). Dans le cas de Madagascar, l'apport de cette méthode a en effet permis d'améliorer le taux de confirmation (jusqu'à 72% en 2007). Les efforts d'amélioration d'outils de diagnostic doivent être poursuivis, notamment ceux permettant de détecter d'autres cibles chez *Y. pestis*.

Ce projet a été initié en mars 2006. Des systèmes de PCR en temps réel pour la détection spécifique de *Y. pestis* ont été développés (Tomaso *et al.*, 2003). Les auteurs ont mis au point des PCR simples et multiplex extrêmement sensibles permettant d'amplifier spécifiquement l'ADN chromosomique ou plasmidique de *Y. pestis*. Les cibles étaient des gènes codant pour : l'ARNr 16S, l'activateur du plasminogène, la toxine murine et l'antigène F1.

### Objectif

Évaluer sur des échantillons cliniques la valeur de la PCR en temps réel en tant qu'outil de diagnostic. Cette évaluation consiste à déterminer la sensibilité et la spécificité de l'outil par rapport au Gold Standard.

### Démarche méthodologique

- Sélection et préparation des échantillons à tester dans le cadre de ce projet.
- Evaluation de méthodes d'extraction d'ADN de *Y. pestis* à partir d'échantillons cliniques.
- PCR en temps réel, optimisation : elle est réalisée selon le protocole de Tomaso *et al.*, 2003 (sondes, amorces et protocoles d'amplification) sur l'appareil disponible à l'IPM de type Rotorgene 3000 Corbett Research.
- Evaluation : validation du protocole d'amplification sur de l'ADN provenant de culture pure et provenant de prélèvements positifs :
  - détermination du seuil de positivité de la PCR
  - analyse d'échantillons cliniques et comparaison des résultats avec ceux de la culture et bandelette
  - détermination, sensibilité et spécificité de la PCR.

### Résultats

- La quantité, la pureté, des extraits d'ADN; le coût, la durée de l'extraction d'ADN et les résultats RT-PCR (efficacité) sont les critères de choix de la meilleure méthode d'extraction. Sur les 5 méthodes d'extraction testées et compte-tenu de tous ces critères nous avons choisi une méthode d'extraction maison. La méthode consiste à détruire la paroi et la membrane bactérienne par la chaleur et par réaction enzymatique, de débarrasser l'ADN des protéines par réaction enzymatique en présence de sels et enfin de purifier les ADN par des précipitations à l'alcool.
- L'amplification selon la méthode de Tomaso *et al.*, a été adaptée et optimisée. Leur programme appliqué à notre étude n'a pas donné de résultats satisfaisants, aussi, nous avons procédé à une optimisation de ce programme :
  - la durée de l'hybridation a été augmentée à 20 s au lieu de 10 s
  - durant le Melt, la durée de la première étape à 95° C a été augmentée à 5 s au lieu de 0 s et celle de la dernière étape à 5 s aussi au lieu de 0 s
  - la vitesse d'augmentation de température durant le Melt, de 45 °C à 95 °C a été augmentée à 1 °C/s au lieu de 0,2 °C/s.
- La sensibilité de détection a montré une amplification jusqu'à 0.01pg/μl d'ADN obtenu à partir d'une culture pure. Le seuil d'amplification lui a été établi à 1 UFC/mL.
- Notre objectif étant de mettre au point et d'évaluer la PCR en temps réel sur les prélèvements cliniques dans le cadre de diagnostic biologique de la peste, 88 ponctions de bubons étaient testées. Elles provenaient de cas suspects de peste à Madagascar entre janvier et mai 2007.

Le diagnostic biologique de la peste par la bactériologie et la bandelette de ces prélèvements ont été réalisés à leur arrivée au LCP. Les restes de ponctions de bubons étaient gardés à -20°C pour les PCR qui ont été effectuées ultérieurement.

- La PCR comparée à la culture a montré une sensibilité de 89,3% et une spécificité de 75%. Le taux de concordance était de 79,5% (tableau I).

Tableau I : Comparaison résultats RT-PCR et bactériologie

Bactériologie	RT-PCR (%)		Total
	Positif	Négatif	
Positif	25 (28,4)	3 (3,4) <sup>a</sup>	28 (31,8)
Négatif	15 (17,1) <sup>b</sup>	45 (51,1)	60 (68,2)
Total	40 (45,5)	48 (54,4)	88 (100)

a : Positifs par bandelette F1 (faux négatifs PCR);

b : 12 positifs par bandelette (vrais positifs PCR),  
3 négatifs par la bandelette F1 (faux positifs PCR)

- La PCR comparée avec la bandelette F1 a montré une sensibilité de 63,8% et une spécificité de 90%. Le taux de concordance était de 72,7% (tableau II).

Tableau II : Comparaison résultats RT-PCR et Bandelette F1

Bandelette F1	RT-PCR (%)		Total
	Positif	Négatif	
Positif	37 (42,0)	21 (23,9) <sup>a</sup>	58 (65,9)
Négatif	3 (3,4) <sup>b</sup>	27 (30,7)	30 (34,1)
Total	40 (45,4)	48 (54,6)	88 (100)

a : 3 positifs bactériologie; b Tous négatifs bactériologie

## Conclusion

Nos travaux ont montré que la PCR en temps réel est un outil qui permet de détecter des quantités infimes d'ADN de *Y. pestis*, de l'ordre du picogramme. La technique a permis d'obtenir beaucoup plus d'échantillons positifs que la culture et moins que le test rapide immunochromatographique. Toutefois sa sensibilité était moindre par rapport aux 2 méthodes de référence.

## 2- ETUDES DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE AU COURS ET AU DÉCOURS DE L'INFECTION PESTEUSE

IPM : V Andrianaivoarimanana, C Raharimanana,  
L Ralafiarisoa, M Ratsimba, N Randriananja, M Rajerison  
L Rahalison, O Domarle (Unité d'Immunologie)  
Ministère Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale:  
Les médecins inspecteurs des SSD foyers de peste  
IPP : C Demeure, E Carniel  
Université de Florence : G Del Prete

Ce projet a été initié en mars 2004 dans le cadre du développement de nouveau vaccin. Une partie des travaux a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec une équipe italienne.

## Introduction

La peste est considérée de nos jours comme une maladie ré-émergente. Elle est endémique à Madagascar et reste encore un problème de santé publique préoccupant. La plupart des cas sont déclarés en zone rurale dans des régions très souvent reculées, difficiles d'accès. Le traitement de première ligne contre la peste à Madagascar est l'administration de la streptomycine. Ce traitement est très efficace, néanmoins, la mortalité résiduelle de la maladie parmi les cas suspectés cliniquement se situe toujours autour des 10%. Les autres pays d'endémie pesteuse qui sont essentiellement en Afrique ne sont pas en reste. Leur contexte par rapport au problème de la peste est assez semblable à celui de Madagascar. Une des alternatives pour améliorer la protection des populations exposées et réduire la mortalité serait de vacciner. Le développement d'un nouveau vaccin requiert des connaissances sur le mécanisme de défense de l'hôte à l'infection, ou sur le mécanisme d'échappement du pathogène au système immunitaire de l'hôte. Très peu d'études ont été menées dans ce domaine pour la peste, encore moins lors d'une infection naturelle.

## Objectif

Ce projet, en collaboration avec l'IPP et l'Université de Florence, vise à caractériser *in vitro* les réponses immunitaires (humorales, cellulaires) et inflammatoire lors d'une infection pesteuse. Un avis favorable a été obtenu du Comité National d'Ethique en décembre 2004.

Les études à mener dans le cadre de ce projet consistent en la caractérisation de la réponse immunitaire, innée et adaptative, dirigée contre *Y. pestis* chez des sujets atteints de peste. En 2007, les fonctions des lymphocytes T au décours de l'infection pesteuse seront analysées par culture *in vitro* (tests de prolifération pour mise en évidence d'une immunité mémoire).

## Matériel et méthodes

- Sérologie de détection d'IgG anti-F1 par ELISA (Rasoamanana *et al.*, 1997).
- Tests de prolifération des lymphocytes T après stimulation par antigène F1 (prélèvements sanguins au décours de l'infection): à partir de PBMC de cas confirmés de peste, culture de 6 jours, stimulation par 0,2 - 2 - 10 et 20 mg/ml d'antigène F1, puis incorporation de Thy H<sup>3</sup> à J5 pour mesurer la prolifération cellulaire spécifique (Index Mitogénique).

## Résultats

En 2007, 22 patients ont pu être recrutés pour un prélèvement tardif, 18 jours à 11 ans après leur épisode de peste. Ce qui ramène à 34 le nombre de patients prélevés

depuis le début du projet.

Les prélèvements sanguins étaient récoltés en vue de mettre en évidence, parallèlement à une sérologie de détection d'anticorps anti-F1 spécifiques de la peste, une éventuelle prolifération des lymphocytes T après stimulation par antigène F1 (cellules mémoires reconnaissant l'antigène F1).

Après leur détection au 8<sup>ème</sup> jour après le début des symptômes, les IgG anti-F1 restaient détectables 3 ans après l'épisode de peste (cas de 4/12 patients testés après 33 mois). La réponse anticorps restait élevée du moins jusqu'à 15 mois après le diagnostic (pour 6/9 individus testés).

Une prolifération des cellules T était observée 2 mois après le début de la maladie (4/6 individus analysés entre 0 à 5 mois). Elle devenait significative et persistait jusqu'à 4 ans pour 11/12 cas testés. Une exception a été observée chez un cas de peste pulmonaire pour lequel les IgG anti-F1 et l'index mitogénique restaient élevés 11 ans après la maladie.

Ces données montrent qu'après une infection naturelle par la peste, un individu développe d'abord une immunité humorale laquelle peut persister pendant quelques mois. La réponse T mémoire semble apparaître 2 mois après le début de la maladie et persisterait quelques années.

### Perspectives

La caractérisation de la réponse inflammatoire au cours d'une infection pesteuse devra encore être menée si des cas sont recrutés. En effet, malgré l'extension du recrutement dans de nouveaux centres en 2007, suite à la baisse du nombre de cas de peste à Madagascar observée depuis 2005 nous n'avons pu recruter que très peu de malades au bon moment. Ces cas étaient survenus dans des zones particulièrement enclavées d'où la mise en oeuvre extrêmement difficile du protocole de notre étude (prélèvements frais acheminés dans les plus brefs délais...). Vu l'importance de cette étude, nous souhaitons la poursuivre mais en prenant le modèle du réservoir animal c'est-à-dire le rat.

### 3- ETUDES SUR LA DIFFUSION DE LA PESTE À MADAGASCAR: IMPORTANCE DES DÉPLACEMENTS DES HOMMES ET DES RATS DE L'ÉCHELLE DE L'HABITAT À CELLE DU PAYSAGE ; DÉTERMINATION DES FACTEURS DE RISQUE

IPM : *S Rahelinirina, M Ranjalaha, P Andriambolamaro, L Ralafiarisoa, M Ratsimba, N Randriananja, C Raharimanana, M Rajerison, L Rahalison*  
Faculté Sciences (Biologie Animale) : *O Ramilijaona*  
Faculté Lettres (Géographie) : *Y Raharilantsoa, J Ramamonjisoa.*  
IRD Mali : *Y Papillon*

IRD Montpellier : *JM Duplantier, C Brouat*  
UPPA : *D Laffly*  
Université de Strasbourg : *P Handschumacher*

Deux thèses sont réalisées dans le cadre de ce projet : une sur le volet réservoir, thèse depuis octobre 2005 de Mme Rahelinirina S de la faculté des sciences de l'Université d'Antananarivo ; une sur le volet humain thèse depuis juillet 2007 de Mlle Raharilantsoa Y de la faculté des lettres de l'Université d'Antananarivo. Le volet vecteur est abordé depuis peu dans le cadre du post-doc de Mlle Telfer S de l'Université de Liverpool.

Ce projet est effectué en collaboration avec l'IRD, accepté en décembre 2006 pour un financement par l'ANR et avec l'Université de Liverpool pour un financement par Wellcome Trust depuis août 2007.

La peste, maladie des rongeurs, est transmise à l'homme via un vecteur, les puces hématophages. Bien que le cycle épidémiologique à Madagascar soit bien connu, l'explication de la persistance et de l'extension de la maladie sur les hautes-terres depuis son introduction en 1898 dans l'île ne peut encore être clairement donnée. La répartition actuelle de la maladie témoigne d'une variabilité spatio-temporelle importante encore mal comprise.

De précédentes études ont montré qu'en zone endémique de peste au relief accidenté, les séroprévalences humaines relatives à la maladie dans les différents villages étaient très hétérogènes, ce qui témoigne d'épidémies humaines très ponctuelles. D'autres études avaient également montré que les rats noirs d'intérieur et ceux d'extérieur ne portaient pas les mêmes cortèges des puces, on supposerait alors des flux migratoires réduits entre ces sous populations.

Dans le but de mieux comprendre l'hétérogénéité de la répartition des cas humains de peste à l'échelle locale et régionale, il est important de :

- valider les observations sur les séroprévalences dans les populations humaines en étendant l'étude géographique déjà réalisée sur deux zones à deux autres régions (une plaine / une zone de relief);
- évaluer si la topographie a un impact sur la structuration des populations de rongeurs et les mouvements des individus entre les populations;
- estimer le niveau de structuration des populations de rats, et les échanges entre populations de différents habitats.

Nos activités en 2007 ont abordé la question sur la diffusion de la peste dans les populations humaines et de rongeurs.

## ▪ Volet humain

### Introduction

La thèse de Mlle Raharilantsoa Y réalisée sous la direction du Prof Ramamonjisoa et des Drs Laffly et Handshumacher porte sur “l’*Etude de la dynamique spatio-temporelle des espaces à risques pesteux dans les Hautes Terres de Madagascar*”. L’intéressée était accueillie à l’Unité Peste de l’IPM afin de lui de faciliter la réalisation de travaux de terrain afin de mettre un cadre de travail et d’échange pour la réalisation des différentes étapes de la thèse.

### Objectifs

Les objectifs pour le volet *Analyse spatiale et épidémiologie humaine* sont : l’identification des facteurs de risques pour les populations humaines, la production d’indicateurs environnementaux du risque pesteux et l’élaboration détaillée des bases de données spatiales.

### Méthodologie

- Questionnaire pour les enquêtes domiciliaires.
- Guides des entretiens auprès des décideurs, des différents acteurs d’aménagement régional et des personnes ressources locales.
- Questionnaires pour des enquêtes spécifiques (mobilité spatiale, vie de relation, foncier, statut social, etc.) élaborés en fonction de la nécessité.

### Réalisations en 2007

- Collecte documentaire : bibliographie, statistiques, archives, cartes, images, choix et achat des cartes
- établissement et test des questionnaires et guides d’entretien sur le terrain
- missions de reconnaissance des 4 sites à savoir Betafo du 3–12 septembre (Inanantonana, Ankazomiriotra et Ambohimambola ) ; Moramanga du 6–10 août (Andasibe, Morarano Gara, Ampasimpotsy, Route d’Anosibe An’ala ) ; Ambositra (Ivato, Ambalamanakana, Andina, Ambatofitorahana, Ambositra) ; Antsirabe II (Mangarano, Ibity) du 28 novembre au 05 décembre
- enquêtes domiciliaires et entretiens auprès des différents acteurs de l’aménagement régional et local et des décideurs locaux et régionaux dans le site de Betafo et de Moramanga
- saisi de l’information et ébauche de la constitution de la base de données sociales, spatiales, sanitaires, géographiques et environnementales;
- ébauche du diagnostic paysagé à partir de l’analyse des images satellitaires et de leur confrontation aux données d’archive au stade d’initiation à l’analyse spatiale et l’Infographie sur le logiciel Arc view et Map Info, Canvas et Excel.

## Perspectives

Les travaux d’enquêtes sur le terrain se poursuivront en 2008. Les travaux de mise au point des méthodes d’analyse des données et d’imagerie débuteront la même année.

## ▪ Volet réservoir

### Introduction

La peste étant avant tout une maladie des rongeurs, nous faisons l’hypothèse que les différences observées dans les populations humaines sont dues à une circulation différente de la maladie dans les populations de réservoirs et à une structuration de ces dernières. Nous supposons l’existence de 2 sous populations pour laquelle la limite intérieure - extérieure constitue une barrière significative aux flux de gènes. Si c’était le cas, nous devrions observer une différenciation génétique entre les deux sous populations.

La circulation des rats et leur structuration vont être estimées par deux méthodes : le suivi des déplacements individuels par appâts marqués (biomarqueurs) et la structuration génétique des populations (marqueurs microsatellites).

L’apport de ces informations doit nous permettre d’identifier des facteurs et des indicateurs de risque et d’établir une cartographie des habitats et des zones à risque, afin de proposer aux services de santé une meilleure politique de prévention.

### Objectifs

- Les objectifs spécifiques étaient :
- mettre en place une technique de marquage des rongeurs par la rhodamine B, marqueur systémique qui donne une fluorescence rouge aux poils de rats lorsque ingéré, puis de l’appliquer sur le terrain pour l’étude de déplacement, après qu’elle ait été évaluée;
  - évaluer comparativement la variabilité et la structure génétiques des populations des rats noirs dans les différentes zones d’études, et dans les différents habitats écologiques (taille des populations, estimation de la dispersion, isolement par la distance) à l’aide de marqueurs microsatellites.

### Matériel et méthodes

- Suivi des déplacements individuels de rongeurs par appâts marqués à la Rhodamine B dans des villages en zone d’endémie pesteuse dans les districts d’Antsirabe II et Betafo et dans 3 habitats : maisons (intérieur), haies de sisal (extérieur), bas fonds de champs et rizières (extérieur)
- Capture par piégeage des rats pendant 3 nuits consécutives 1, 2 et 3 mois après appâtage - Suivi des indicateurs peste : pour toutes les captures effectuées,



les index pulicidiens, la séroprévalence des petits mammifères, leur portage ainsi que des puces de *Y. pestis* sont déterminés.

▪ Etude de la structuration génétique par les marqueurs microsatellites : les populations analysées étaient celles des études de déplacement. Dix-sept (17) locus microsatellites dont 7 qui avaient été mis au point initialement sur *R. norvegicus* (kit 1) et 10 sur *R. rattus* (kit 2) ont été étudiés sur les tissus prélevés sur le terrain.

### Réalisations en 2007

Le suivi du déplacement des rats a montré que :

- les rendements de piégeages restaient les plus élevés dans les haies de sisal
- les index pulicidiens étaient les plus élevés dans les maisons et les haies de sisal
- des *Xenopsylla cheopis* dans les maisons et des *Synopsyllus fonquerniei* dans les haies de sisal étaient porteuses de *Y. pestis*
- des rats séropositifs étaient trouvés dans tous les types d'habitats
- les rats semblaient se déplacer essentiellement entre les maisons et les haies de sisal en saison de transmission
- les haies de sisal et les maisons seraient les habitats clé de la circulation et de la pérennisation de la peste dans les foyers ruraux à Madagascar
- pour la structuration génétique par les marqueurs microsatellites, sur l'ensemble des échantillons, on observe un polymorphisme relativement élevé pour chacun des 17 locus. Le nombre d'allèles par locus varie de 8 à 29 soit en moyenne 18 allèles par locus. La diversité génétique variait de 0,64 à 0,75. Plus on était en zone de relief plus le taux de migration était faible.

Madame Rahelinirina a effectué un stage du 21 mai au 11 août 2007 au CBGP/IRD de Montpellier dans le cadre des travaux d'analyses génétiques.

### Discussions et perspectives 2007

La peste étant saisonnière à Madagascar, les études de déplacements de rongeurs après marquage sur le terrain devront être réalisées en période de basse saison de transmission (vs les études en 2007 en période de haute transmission). La publication présentant les travaux sur l'étude de déplacements est en cours de préparation.

#### 4- GÉNÉTIQUE ET ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE A LA PESTE CHEZ LE RAT NOIR *RATTUS RATTUS*

IRD : C Tollenaere (thèse 2006-2009), C Brouat, JM Duplantier  
IPM : L Rahalison, M Ranjalalahy

Cette étude est réalisée dans le cadre d'une collaboration entre l'IPM et l'IRD de Montpellier. Elle fait

l'objet de la thèse de Mlle Tollenaere C. Pour ses travaux, cette dernière effectue des séjours intermittents à Madagascar.

### Contexte

Le rat noir (*Rattus rattus*) est le principal réservoir de la peste dans les villages des Hauts Plateaux malgaches. Des expériences d'infestation expérimentale réalisées à l'IPM ont montré que cette espèce est beaucoup plus résistante à la peste (dose létale pour la moitié des individus 1000 fois plus forte) sur les Hauts Plateaux de Madagascar (foyer pesteux) qu'à basse altitude (zone sans peste). Cette résistance, résultat de l'évolution des populations en réponse à la pression exercée par la maladie, a probablement des conséquences très importantes sur le maintien à long terme de la peste à Madagascar.

### Objectif

Déterminer les marqueurs génétiques liés à la résistance permettant d'évaluer la répartition actuelle de la résistance à la peste chez *R. rattus*. Le gène CCR5 candidat a été étudié comme gène.

### Méthodologie

Des individus de phénotype différent, ainsi que les populations des Hauts Plateaux (Betafo, Manjakandriana) et des zones de basse altitude (Brickaville, Miandrivazo, Vatomandry), étaient comparés pour des marqueurs génétiques : **1**) par une approche gène candidat; **2**) par une approche génomique par des marqueurs AFLP. Pour caractériser le phénotype des individus, des infestations expérimentales étaient réalisées sur des rats sauvages. Les rats mourant à des doses inférieures à 100cfu (resp. survivants à des doses supérieures à 10<sup>5</sup> cfu) sont considérés "sensibles" (resp. "résistants").

D'autre part, des croisements de rats résistants et sensibles étaient mise en route de façon à étudier le déterminisme génétique de la résistance (dominance, nombre de gènes) et d'obtenir des lignées de rats de phénotype différent.

### Réalisations en 2007, état d'avancement

Mlle Tollenaere a effectué des séjours de 2 mois (février-mars 2007) et 3 mois (août-octobre) à l'IPM.

La différence très importante de sensibilité entre les deux zones, ainsi que la coexistence de rats sensibles et résistants sur les Hauts Plateaux, ont été confirmées par les infestations expérimentales. L'approche gène candidat a été conduite sur le gène CCR5 et a révélé des résultats intéressants (une substitution non synonyme dont la répartition diffère légèrement entre individus de

phénotype différents et entre zones, manuscrit soumis dans *Infection, Genetics and Evolution*).

L'approche génomique ainsi que l'étude des autres gènes candidats (TLR4, TNF) sont en cours, de même que les élevages et croisements des rats.

#### **Discussion, conclusion**

Le gène CCR5 pourrait être un gène mineur impliqué dans la résistance à la peste et d'autres marqueurs génétiques restent à déterminer.

---

### **ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE**

*(voir page 54)*

---

---

# TUBERCULOSE ET MYCOBACTERIES

---

---

## RESPONSABLES SCIENTIFIQUES

- **V Rasolofa Razanamparany**, scientifique, chef de l'Unité des Mycobactéries
- **H Ramarokoto**, médecin, chef du Centre National de Référence des Mycobactéries

## SCIENTIFIQUES ASSOCIES

- **V Richard**, médecin épidémiologiste, chef de l'Unité d'Epidémiologie
- **V Raharimanga, M Ratsitorahina, R Ratovoson, R Randremanana**, médecins, Unité d'Epidémiologie
- **O Domarle**, scientifique, chef de l'Unité d'Immunologie (jusqu'en septembre)
- **S Rakotondrasoa** (jusqu'en juin), **V Razanakotomalala** (jusqu'en février), médecins contractuels, projet Lèpre
- **C Raharisolo Vololonantenaina**, médecin anatomopathologiste, Centre de Biologie Clinique
- **N Rakotosamimanana**, étudiant en thèse, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo et de Paris 6
- **HAO Saïd Tohir, O Rabe**, étudiants en thèse, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo/CNRE
- **J Rabemiarana, L Andriamihantsoa**, étudiants DEA, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo
- **S Chomel de Varagnes**, stagiaire 5<sup>ème</sup> année, Faculté de Pharmacie, Lyon I

## COLLABORATIONS

### Prestataire

- **V Raniriharisoa, B Rakotondrasoa**, médecins de l'Association des Médecins d'Exercice Libéral (AMEL)

### Locales

- **B Rarivoson, O Ratsirahonana, A Rakotoarisaonina**, Programme National Tuberculose, Service de Lutte contre la Tuberculose et la lèpre, SLTL - Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale
- **Responsables du Programme National** pour l'Élimination de la Lèpre, division lèpre / SLTL, MinSan PFPS
- **B Ravalison, E Ranaivoson, J Razananirinomenjanahary**, médecins du Dispensaire Antituberculeux (DAT) d'Antananarivo, Institut d'Hygiène Sociale
- Responsables des Centres de Santé de Base (CSB)
- Correspondants Régionaux Tuberculose-Lèpre (CRTL), MinSan PFPS
- Centre National de Recherches pour l'Environnement (CNRE)
- Services de Pédiatrie de l'Hôpital Joseph Raseta de Befelatanana et de CENHOSOA, Hôpital Pédiatrique d'Ambohimandra, Hôpital Mère-Enfant de Tsaralalana
- Centre National de Recherches pour l'Environnement (CNRE)

### Extérieures

- **B Gicquel, O Neyrolles**, Unité de Génétique Mycobactérienne, IP Paris
- **G Marchal**, Laboratoire d'Immunothérapie, IP Paris
- **N Rastogi et Coll.**, Laboratoire de recherche sur la tuberculose et les mycobactéries, IP Guadeloupe
- **L Abel, JL Casanova**, Laboratoire de Génétique Humaine des maladies infectieuses, INSERM U550, Hôpital Necker, Paris
- **R Broch**, Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne, IP Paris
- **H Engers, A Assefa et Coll.**, Armauer Hansen Research Institute (AHRI), Addis Abeba, Ethiopie

## SOUTIENS FINANCIERS

- Gouvernement Malgache (Global Funds)
- DAI-IP/Programmes Transversaux de Recherche
- EDCTP
- Institut Pasteur de Madagascar
- Association Française Raoul Follereau

La tuberculose et la lèpre sont toujours un problème mondial de santé publique, avec environ 9 millions de nouveaux cas déclarés et 2 millions de décès chaque année, fléau aggravé par l'infection par le VIH et l'apparition de souches multirésistantes dans de nombreux pays. A Madagascar, l'incidence des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire est de l'ordre de 80 à 100 pour 100 000 habitants, avec une co-infection par le VIH < 1% chez les patients tuberculeux. Les patients sont pris en charge par le Programme National Tuberculose (PNT - Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale).

Les activités de l'unité des mycobactéries de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) comprennent le diagnostic de la tuberculose, des activités de santé publique et de recherches menées en collaboration avec le PNT. Depuis 2003, l'unité des mycobactéries s'est renforcée pour le développement de futurs essais cliniques, à travers le projet VACSIS conduit conjointement avec l'unité d'épidémiologie. Ce projet s'est achevé en décembre 2006 et l'analyse des résultats s'est poursuivie en 2007. Le renforcement des capacités pour la réalisation d'essais vaccinaux va se poursuivre avec le projet EDCTP. Le problème sur les outils diagnostiques de la tuberculose est abordé avec l'étude sur l'évaluation de tests sanguins et également à travers l'étude sur la susceptibilité génétique aux infections mycobactériennes qui a débuté en 2007.

Concernant la lèpre à Madagascar, le pays a atteint en 2006 le seuil d'élimination de < 1 patient pour 10 000 habitants. En 2007, l'étude sur la résistance de *M. leprae* à la rifampicine a porté sur la faisabilité des tests moléculaires de détection de la résistance à partir des sérosités.

---

## DECOMPOSITION DU PROGRAMME

### ACTIVITES DE RECHERCHE

- Etude de marqueurs de l'immunité anti-tuberculose chez les sujets contacts de patients tuberculeux pulmonaires (Projet VACSIS)
- Place de l'IDR dans la lutte contre la tuberculose
- Polymorphisme génétique des souches *M. tuberculosis* à Antananarivo
- Susceptibilité génétique à la tuberculose
- Outils de diagnostic de la tuberculose active
- Modélisation spatio-temporelle du risque de tuberculose en milieu urbain
- Détection par PCR de la résistance de *M. leprae* à la rifampicine à partir de biopsies et de sérosités de lépreux
- Activité antimycobactérienne de substances naturelles

### ACTIVITES DU LABORATOIRE NATIONAL DE REFERENCE DES MYCOBACTERIES (voir page 62)

- 1- Activités de diagnostic et de supervision du CNRM
  - 2- Enquête nationale sur la résistance primaire de *Mycobacterium tuberculosis*
-



# ACTIVITES DE RECHERCHE

## 1- ETUDE DES MARQUEURS DE L'IMMUNITÉ ANTI-TUBERCULEUSE CHEZ LES SUJETS CONTACTS DE PATIENTS TUBERCULEUX PULMONAIRES (PROJET VAC SIS)

IPM : JL Soares, V Richard, M Ratsitorahina, N Rakotosamimanana, L Andriamihantsoa, SF Andriamandimby, V Raharimanga, H Ramarokoto, V Rasolofo

IHS : B Ravalison, E Ranaivoson, M Rakotonjanahary, J Razananirinomenjanahary

Partenaires du projet VAC SIS

Le projet VAC SIS est un projet multicentrique financé par la Commission Européenne (INCO-DEV Contract No. ICA4-CT-2002-10052) et auquel participent 3 instituts Européens (University College London-UCL, Londres ; Statens Serum Institute- SSI, Copenhague ; Unité de Génétique Mycobactérienne, IPP) et 4 instituts de recherche en Afrique (MRC Laboratories, Gambie ; AHRI, Addis Ababa ; UNZA, Lusaka ; IPM). Le projet multicentrique est coordonné par A Zumla (UCL).

L'étude à Madagascar a été réalisée avec la contribution de l'unité d'épidémiologie de l'IPM, le PNT, le dispensaire antituberculeux d'Antananarivo (DAT) et le laboratoire national de référence du Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale.

### Introduction

Bien que le vaccin BCG protège les jeunes enfants des formes graves de la tuberculose, son efficacité chez l'adulte est discutable. Différents candidats vaccins sont actuellement à l'étude et certains d'entre eux sont déjà testés dans des essais cliniques de phase I. Toutefois, l'évaluation de l'efficacité de nouveaux vaccins peut durer des années voire des décennies car le délai entre l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et la maladie est très long. Une alternative est l'identification de marqueurs spécifiques de l'immunité antituberculeuse pour sélectionner ces vaccins potentiels et les tester en diminuant la durée et le coût des essais cliniques. Le contrôle de l'apoptose étant fondamental dans la réponse immunitaire aux infections, les gènes impliqués dans l'apoptose s'avèrent être des marqueurs intéressants à étudier.

### Objectifs

L'objectif de cette étude était de rechercher des marqueurs de l'immunité anti-tuberculeuse qui pourront être utilisés dans des essais vaccinaux. Il s'agissait plus spécifiquement :

- d'étudier l'expression de marqueurs associés à l'immunité contre la tuberculose, dont des marqueurs de

l'apoptose, chez les sujets contacts de tuberculeux pulmonaires à microscopie positive (TPM+) ;

- de déterminer s'il existe une relation entre le génotype des souches BK et la réponse immune, la transmission ou la sévérité de la maladie.

### Approche méthodologique et expérimentale

La méthodologie a déjà été décrite dans les rapports d'activité précédents. En bref, l'étude a porté sur trois cohortes d'individus recrutés de juin 2004 à décembre 2006 : **1)** nouveaux patients TPM+ (cas index ou CI) du DAT, **2)** sujets contacts rapprochés (SC) de ces cas index (vivant sous le même toit) et **3)** des sujets témoins (T) non-tuberculeux (recrutés au dispensaire antituberculeux de l'IPM), sans notion de contact avec un patient tuberculeux. Les sujets contacts ont été suivis pour déceler l'apparition éventuelle de la maladie.

L'infection par *M. tuberculosis* a été déterminée par le test d'IDR à la tuberculine et par mesure de l'IFN $\gamma$  par le test ELISPOT, après stimulation des cellules du sang par des antigènes spécifiques. L'expression de gènes de plusieurs marqueurs de l'apoptose (TNFR1, TNFR2, FLIPS, FLICE, Fas, FasL et Bcl2) a été mesurée par l'analyse quantitative des ARNm à partir du sang total, en utilisant la technique de PCR quantitative (qRT-PCR) en temps réel.

Les souches de BK isolées au cours de l'étude ont été typées par spoligotyping.

L'analyse des résultats a porté sur la corrélation entre l'expression des marqueurs étudiés et la protection contre la tuberculose chez les sujets contacts ainsi que la relation entre génotype des souches et immunité antituberculeuse.

### Résultats

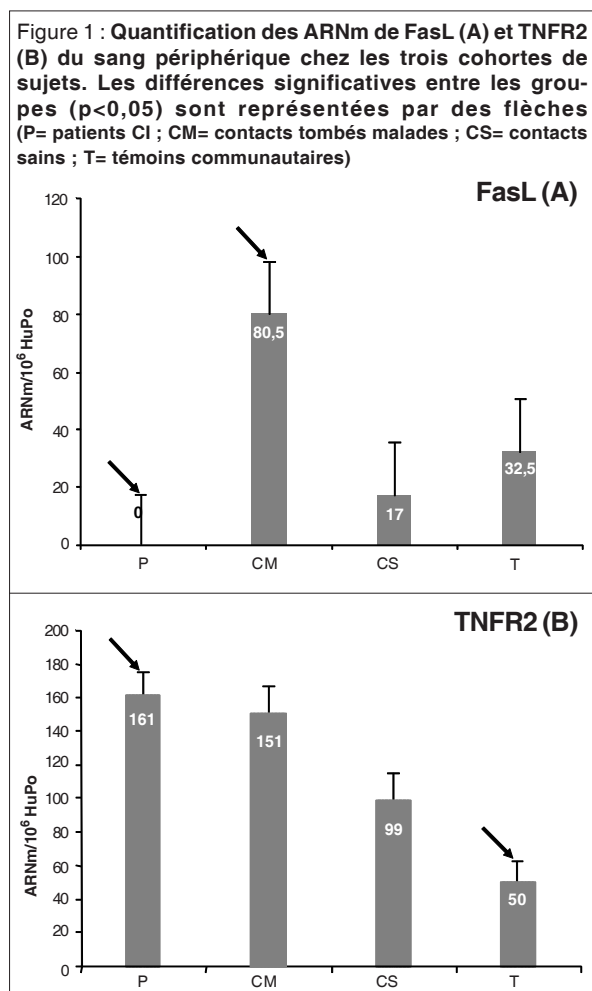
Au total de juin 2004 à décembre 2006, 104 cas index (CI), 305 sujets contacts (SC) et 186 témoins (T) ont été inclus et suivis par les médecins de l'étude. Les caractéristiques des cohortes ainsi que les résultats de l'étude de la réponse des sujets au test IFN $\gamma$ /ELISPOT ont été reportés dans le rapport annuel 2006.

#### • Etude de l'expression des marqueurs de l'apoptose

L'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire a été quantifiée chez 23 patients CI, 79 SC dont 10 sont tombés malades de tuberculose à microscopie négative au cours de l'étude, et chez 44 T.

La comparaison de l'expression des marqueurs étudiés, TNFR1 et 2, FLICE, FLIPs, Fas, FasL ainsi que Bcl2

entre les différents groupes de sujets n'a montré aucune différence significative ( $p > 0,05$ ). Cependant, quand on compare les groupes deux à deux, il a été observé que l'expression de FasL chez les contacts tombés malades (CM) était plus importante par rapport à celle des CI. De même, TNFR2 est significativement plus exprimé chez les P que chez les T (figure 1).

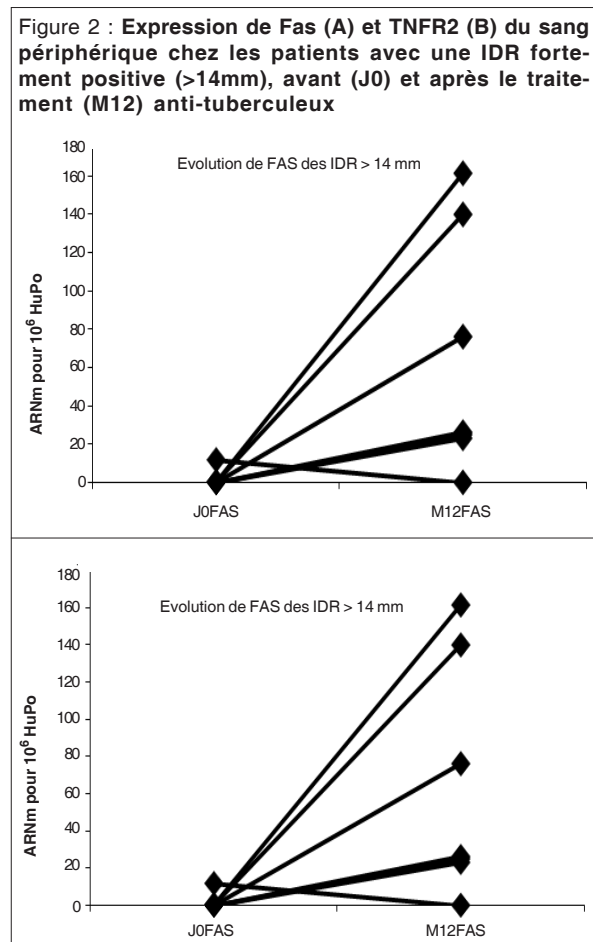


Les expressions de FLIPs et FasL sont significativement plus élevées ( $p$  respectifs : 0,0024 et 0,027), chez les SC restés sains positifs au test IDR par rapport aux SC négatifs à l'IDR. Cette tendance est aussi observée chez les SC sains (CS) et les T positifs au test IFN $\gamma$ /ELISPOT-PPD où l'expression des marqueurs est plus élevée que chez les sujets PPD négatifs.

Par ailleurs, si l'on considère les sujets IDR positifs, il a été observé que Fas et FasL sont généralement significativement moins exprimés chez les CI que chez les autres groupes de sujets. Cependant, une expression significativement plus importante du TNFR2 a été observée chez les CI par rapport aux T, alors que pour FLIPs, cette expression est plus importante chez les CS comparée aux T.

Chez les patients IDR fortement positifs et PPD positifs, des variations de l'expression des marqueurs sem-

blent être observées avant et après le traitement (12<sup>ème</sup> mois) avec notamment, une tendance à une diminution des TNFR1 et TNFR2, de FLICE, de FLIPs et Bcl2, alors qu'une augmentation de l'expression de Fas et de FasL est observée (figure 2).



Ces résultats semblent indiquer que la mort cellulaire par apoptose est inhibée chez les CI, et que l'augmentation de FasL chez les sujets en infection chronique avec les BK semble être à l'origine de maladie chez les contacts qui ne produisent pas assez l'antagoniste FLIPs.

Ces résultats seront associés avec ceux des autres partenaires VACSIS pour une analyse combinée

#### • Relation entre le génotype des souches BK et la réponse immune

Les modèles expérimentaux d'infection suggèrent que différentes souches de *M. tuberculosis* pourraient induire des réponses immunitaires variables. Mais on ne sait pas comment ces différences influent sur la réponse immune ou sur l'issue clinique chez l'hôte humain. Nous avons donc analysé la réponse IFN $\gamma$ /ELISPOT chez les patients et chez leurs contacts proches en fonction des spoligotypes des souches infectantes.

Les résultats ont montré que les souches *M. tuberculosis* de spoligotypes récents comme Beijing ou CAS (“Central Asian”) avaient tendance à donner une réponse IFN $\gamma$  faible comparée aux souches de spoligotype ancestral comme les EAI (“East African Indian”). Ce qui suggère que les souches auraient évolué au cours du temps pour s’adapter à l’hôte et induire ainsi des réponses immunes différentes dans les diverses populations. Ceci devrait être pris en compte pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### Perspectives

A la suite du projet VACSIS, un nouveau projet (PTR 253) sera développé en 2008, en collaboration avec l’Institut Pasteur Paris, l’Institut Pasteur Korea et l’IPBS/CNRS-Toulouse. L’objectif est de mieux comprendre les relations entre diversité génétique et virulence chez *M. tuberculosis* par des approches de biologie moléculaire et cellulaire, et par une approche épidémiologique.

## 2- PLACE DE L’IDR DANS LA LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE

IPM : R Ratovoson, V Raharimanga, V Rasolofo, V Richard

La place de l’IDR à la tuberculine pour le diagnostic de la tuberculose en zone de forte endémie comme à Madagascar est très souvent controversée. Ce travail avait donc pour objectif de déterminer sa place dans le dépistage de la tuberculose chez les sujets contacts de malades tuberculeux.

L’étude a été réalisée à Antananarivo de 2004 à 2007 sur les familles des malades TPM+ comparées à des témoins recrutés parmi les consultants du Dispensaire antirabique de l’IPM. Des questionnaires, des examens cliniques et biologiques ainsi que des IDR ont été effectués sur les 477 sujets âgés de plus de 1 an recrutés.

Les résultats de l’étude n’ont pas mis en évidence de relation statistiquement significative entre le diamètre de l’IDR et le genre, le statut vaccinal, la notion de traitement antituberculeux ou l’aération de la maison. Mais ils ont révélé une différence significative ( $p < 0,01$ ) entre la taille de l’IDR et la notion de contact avec un TPM+ et ce notamment chez les enfants de moins de 5 ans. Les résultats ont également montré que l’estimation de la valeur prédictive de l’IDR (4,3%) reste supérieure à celle des nouveaux tests sérologiques (CFP7 : 2,4% ; ESAT 6 : 2,2% ; PPD : 2,5%).

L’utilisation de l’IDR à la tuberculine chez les enfants en début de scolarité afin de dépister un éventuel tuberculeux dans son entourage serait donc une nouvelle perspective dans la lutte contre la tuberculose à Madagascar.

## 3- POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE DES SOUCHES *M. TUBERCULOSIS* À ANTANANARIVO

IPM : J Rabemiarana, N Rakotosamimanana, V Rasolofo  
IPG : T Zozzio, N Rastogi

De nombreuses études sur la diversité génétique des souches du complexe *M. tuberculosis* utilisant des marqueurs génétiques comme *IS6110*, le spoligotyping, les MIRU/VNTR ou les SNPs ont permis de déterminer les relations phylogéniques entre les souches. Suite au projet VACSIS, il était intéressant de mieux comprendre la relation entre le génotype et la virulence des souches infectantes (voir paragraphe ci-dessus). Cependant, il serait nécessaire de connaître la représentativité des différents génotypes des souches circulant dans la capitale. Les spoligotypes de 300 isolats de patients tuberculeux pulmonaires d’Antananarivo pendant 3 périodes, 1994-1995, 1997-2000 et 2005-2006, ont été étudiés. Les familles de spoligotypes EAI, T, Haarlem et LAM ont toujours été très représentées à Antananarivo pendant les 3 périodes étudiées.

## 4- SUSCEPTIBILITÉ GÉNÉTIQUE À LA TUBERCULOSE

IPM : V Richard, V Raharimanga, H Ramarokoto, V Rasolofo  
AMEL : V Raniriharisoa, B Rakotondrasoa  
DAT : B Ravalison et coll.  
Services de Pédiatrie : HJRB, Ambohimandra, Tsaralalana, CENHOSOA  
INSERM U550 : L Abel, JL Casanova  
IPP : R Brosch

Cette étude fait partie du sous-programme “mycobactéries” du PTR 202 “Genetics of host predisposition of infectious diseases” coordonné par Philip Avner.

### Introduction

La tuberculose est toujours un problème majeur de santé publique, en particulier dans les pays en voie de développement. Il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles voies pour combattre cette infection. Parmi celles-ci, l’identification des facteurs génétiques de l’hôte contrôlant la réponse à l’infection est fondamentale. Ce qui permettra l’approfondissement des connaissances en immuno-pathologie, entraînant ainsi des conséquences au niveau médical comme le diagnostic moléculaire, le développement de nouveaux vaccins ou de traitement immuno-modulateur.

### Objectifs

L’objectif général de ce projet est de déterminer les bases moléculaires de la prédisposition génétique de l’hôte à la tuberculose, c’est-à-dire d’identifier les gènes, et les polymorphismes de ces gènes, contrôlant la réponse des sujets infectés par *M. tuberculosis* et le développement de la maladie.

Pour cela, une très large étude familiale sera conduite à Madagascar, portant à la fois sur les formes pédiatriques et les adultes, par une stratégie combinant une approche de génétique mendélienne (étude approfondie de quelques familles particulières) et de génétique épidémiologique (étude de nombreux polymorphismes génétiques dans l'ensemble des familles recueillies).

### Méthodologie

Le projet a été soumis au Comité d'Éthique auprès du Ministère la Santé et a obtenu un avis favorable.

Il s'agit de recruter environ 500 familles avec un patient tuberculeux dont 250 cas pédiatriques (<15 ans) et 250 patients TB pulmonaires adultes (≥ 5 ans) pendant 3 ans à Antananarivo. Les patients adultes ont été recrutés au DAT et les enfants tuberculeux dans les différents services de pédiatrie de la capitale.

L'inclusion est faite après information et consentement des sujets. Les données épidémiologiques sur ces familles seront recueillies. Des échantillons biologiques seront récoltés. L'ADN sera extrait à partir du sang des sujets et servira pour d'une part le séquençage des gènes candidats et d'autre part l'étude d'association familiale permettant de rechercher le rôle des polymorphismes génétiques fréquents. L'étude sur ces ADN sera faite par le Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses INSERM U550, Hôpital Necker, Paris.

Les souches *M. tuberculosis* isolées chez les patients seront caractérisées.

### Etat d'avancement des travaux

A ce jour, 74 patients tuberculeux et au total 153 membres de leurs familles (parents ou collatéraux) ont été recrutés. Soixante-sept patients venaient du DAT, 4 du Service de Pédiatrie de l'Hôpital Befelatanana et 3 de l'Hôpital Mère-Enfant de Tsaralalana. L'âge des patients variait de 1 à 55 ans. Soixante-huit étaient des patients TPM+, et 6 des enfants avec une tuberculose extrapulmonaire (1 méningite et 5 miliaires).

La recherche de BK a été faite pour tous les prélèvements suspects reçus au laboratoire. Sept-cent quatre-vingt-six échantillons provenant de 360 sujets, dont 66 adultes et 294 enfants des services de pédiatrie ont été mis en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen (LJ). Quatre-vingts patients (53 du DAT et 27 des services de pédiatrie) ont, à ce jour, une culture positive. Il s'agissait de 77 tuberculeux pulmonaires, 2 méningites et 1 tuberculose ganglionnaire.

Le diagnostic de la tuberculose chez l'enfant est difficile. La bactériologie étant le plus souvent négative (7,8% des enfants suspects de tuberculose dans cette

étude), le diagnostic repose essentiellement sur les examens cliniques, radiologiques, biologiques et histologiques ainsi que le test à la tuberculine. Beaucoup d'enfants suspects de tuberculose ne répondaient pas aux critères d'inclusion. L'étude a alors été orientée essentiellement vers le recrutement d'enfants présentant une forme sévère de tuberculose (méningite, miliaire) pour l'étude des mutations mendéliennes.

## 5- OUTILS DE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE ACTIVE

IPM : HAO Said Tohir, R Ramaroson, O Domarle, V Rasolofo

IPP : G Marchal

IHS : Médecins du DAT

### Introduction

De nouveaux tests rapides et sensibles pour le diagnostic précoce de la tuberculose sont toujours recherchés pour limiter la dissémination des souches *M. tuberculosis*. Parmi les tests développés ces dernières années, figurent les tests sanguins commercialisés comme le Quantiféron® et le T-SPOT®, basés sur la réponse IFN $\gamma$  des sujets aux antigènes ESAT6 et CFP10. Si ces tests semblent utiles dans les pays à faible endémie tuberculeuse, leur spécificité est discutable dans les pays à forte endémicité.

L'antigène APA a été étudié par l'équipe de G. Marchal (IPP) depuis plusieurs années. Cet antigène est sécrété au cours de la phase de croissance de *M. tuberculosis*. Par ailleurs, des résultats récents ont suggéré que la réponse des lymphocytes T stimulés par APA était plus élevée chez les patients tuberculeux que chez les sujets sains. Il était donc intéressant de tester cet antigène pour le diagnostic de la tuberculose à Madagascar, avec un test de type Quantiféron.

### Objectifs

L'objectif de cette étude était de mettre au point et d'évaluer un outil de diagnostic pour la tuberculose reposant sur la réponse cellulaire des malades vis-à-vis cet antigène :

- par le dosage de l'IFN $\gamma$  sécrété *in vitro* après stimulation des cellules du sang par APA, par la méthode ELISA en utilisant les réactifs du kit Quantiféron CMI (Cellestis) ;

- par l'étude de la prolifération des lymphocytes T colorés au CFDA par la cytométrie de flux.

### Méthodologie

Trois groupes de sujets ont été recrutés : **1**) des nouveaux patients TPM+, âgés de 20 à 50 ans, VIH négatifs, au Dispensaire antituberculeux d'Antananarivo (DAT) ; **2**) un groupe de sujets sains, proches contacts



de patients TPM+ ; 3) des sujets témoins sains parmi les sujets du centre antirabique de l'IPM.

Le dosage de l'IFN $\gamma$  à partir du sang total après stimulation par des antigènes spécifiques PPD, APA, peptide APA et le PBS (témoin négatif) a été fait en utilisant le kit Quantiféron-CMI (Cellestis). Par ailleurs, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées. L'analyse de la prolifération cellulaire par la cytométrie de flux après culture en présence de PPD, d'antigène APA ou de peptide APA, et marquage cellulaire avec le CFDA (carboxy fluorescéine diacétate) a été faite. L'analyse doit permettre de déterminer la sensibilité et la spécificité des antigènes pour le diagnostic précoce chez les sujets contacts.

L'accord du Comité d'Ethique auprès du Ministère de la Santé a été obtenu en février 2006.

## Résultats

De septembre 2006 à mars 2007, 21 cas index (CI), 10 sujets contacts (SC) et 9 témoins (T) ont été inclus et suivis par les médecins de l'étude (tableau I).

Tableau I : Recrutement des sujets

Groupe	Cas Index (CI)	Sujets Contacts (SC)	Témoins (T)
No. sujets	21	10	9
Age moyen	35,6 ans (22-53)	34,6 ans (21-50)	31 ans (20-44)
<b>Sexe</b>			
M	14	4	7
F	7	6	2
<b>IDR</b>			
Négative	6	0	6
5-14 mm	5	2	3
> 15 mm	7	7	0
ND	3	1	0
<b>Réponse IFN avec (1)</b>			
PPD	5,13	7,68	5,55
Antigène APA	2,33	2,99	3,24
Peptide APA	2,35	0,98	1,63
<b>Index de stimulation (2)</b>			
PPD	1,12	1,19	-
Antigène APA	1,39	0,98	-
Peptide APA	1,53	0,98	-

(1) : Valeur moyenne d'IFN $\gamma$  secrété en UI/ml

(2) : Valeur médiane de l'index de stimulation : la prolifération cellulaire est mesurée par cytométrie de flux après stimulation des cellules mononuclées du sang par l'antigène et culture en présence de CFDA.

Le test de dosage de l'IFN $\gamma$  après stimulation des cellules du sang total avec les différents antigènes a été réalisé sur 20 cas index, 9 sujets contacts et 9 témoins. Il a donné une réponse moyenne relativement plus élevée chez les SC et les T que chez les CI avec l'antigène APA. Cette réponse était plus forte chez les SC avec le PPD que chez les CI et les T. Avec le peptide APA, la quantité moyenne d'IFN $\gamma$  mesurée était plus élevée chez les CI que chez les SC et les T. Cependant, cette réponse n'était ni assez sensible ni spécifique pour une utilisation du test pour le diagnostic de la tuberculose.

L'analyse de la prolifération cellulaire par cytométrie de flux/CFDA a été faite chez 18 cas index et 8 sujets contacts. On a observé un indice de stimulation, qui traduit la prolifération des lymphocytes T colorés au CFDA, avec une valeur médiane plus élevée chez les CI que chez les SC avec l'antigène APA et le peptide APA. Cependant, Cette méthode n'est pas non plus assez sensible pour être utilisée pour le diagnostic.

## 6- MODÉLISATION SPATIO-TEMPORELLE DU RISQUE DE TUBERCULOSE EN MILIEU URBAIN

IPM : R Randremanana, F Rakotomanana, V Richard

L'objectif principal de cette étude est de proposer un modèle prédictif spatio-temporel de la tuberculose pulmonaire à partir des données des années 2004 à 2006 en milieu urbain (ville d'Antananarivo).

Les objectifs spécifiques sont d'identifier les facteurs de risque les plus fortement associés à la tuberculose à travers le modèle retenu et de cibler les zones les plus à risque dans la ville pour y proposer des interventions en matière de prévention et en matière d'enquête épidémiologique autour d'un cas.

Avancée des travaux : l'enquête sur le terrain a débuté. L'analyse des données sera réalisée au 1<sup>er</sup> semestre 2008.

## 7- DÉTECTION PAR PCR DE LA RÉSISTANCE DE *M. LEPRAE* À LA RIFAMPICINE À PARTIR DE BIOPSIES ET DE SÉROSITÉS DE LÉPREUX

IPM : S Chomel de Varagnes, V Razanakotomalala, S Rakotondrasoa, C Raharisolo, H Ramarokoto, V Rasolofo

IPP : N Honoré, St Cole

Ministère Santé et PF : SLTL - PNEL

## Introduction

Le Service de Lutte contre la Tuberculose et la Lèpre (Ministère de la Santé et du Planning Familial) conduit un programme d'élimination de la lèpre (PNEL) en partenariat avec l'OMS, la FRF et le NLR. Bien que Madagascar ait atteint l'objectif de l'OMS d'élimination de la lèpre en tant que problème de santé publique, avec une prévalence actuelle < 1 pour 10 000 habitants sur l'ensemble du pays, la prévalence est encore supérieure à 1 pour 10 000 dans certaines régions comme celles de Fianarantsoa, Antsiranana, Toliara et Mahajanga. Une des difficultés majeures de la lutte contre la lèpre est l'éloignement des patients des centres de santé de base (CSB), rendant ainsi difficiles le dépistage et le suivi. L'apparition de souches de *M. leprae* résistantes aux antibiotiques est à craindre chez les patients irréguliers et dans les cas de rechute.

Les tests de sensibilité de *M. leprae* aux antibiotiques sur coussinets plantaires de souris ne sont pas réalisables dans la majorité des pays endémiques de lèpre. Une technique de PCR-hybridation, réalisée sur biopsies cutanées de lésions lépreuses multibacillaires (MB), a été mise au point par *N Honoré et St Cole* (Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne, Institut Pasteur, Paris) pour détecter les mutations responsables de la résistance à la rifampicine, au niveau du codon Ser425 du gène *rpoB* de *M. leprae*. Une autre méthode de détection, la Touch-down-PCR en temps réel a été mise au point à l'IPM.

Par ailleurs, le prélèvement de biopsie peut présenter des inconvénients comme le risque d'infection et la nécessité de faire une anesthésie locale. La biopsie n'est pas non plus recommandée chez les enfants et n'est pas réalisable pour les lésions du visage. Il était donc intéressant de tester ces deux techniques de PCR pour la détection des mutations à partir d'ADN extrait des sérosités déjà fixées sur les lames utilisées pour le diagnostic bacilloscopique de la lèpre.

### Objectifs

Les principaux objectifs de ce projet étaient :

- mettre en place la méthode de PCR-hybridation pour la détection des mutations du codon Ser425 du gène *rpoB* à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM)
- développer une autre méthode rapide de détection des mutations, basée sur la Touch-down-PCR, en utilisant la technologie de PCR en temps réel avec l'intercalant Sybr Green I (TD-PCR-SG)
- évaluer la faisabilité de ces deux techniques à Madagascar pour la prédiction de la résistance des *M. leprae* à la rifampicine à partir de biopsies de lésions MB de patients MB et à partir de prélèvements de sérosités MB; puis d'étudier la résistance de *M. leprae* dans des régions endémiques.

### Méthodologie

Les patients inclus dans l'étude étaient les malades lépreux MB nouveaux cas, les patients suspects de rechute MB et les malades irréguliers. Les patients ont été recrutés soit par les personnels des CSB soit par les médecins recrutés spécifiquement pour le projet au cours des missions effectuées dans les régions endémiques de lèpre. Les patients lépreux ont d'abord été détectés suivant les critères de diagnostic clinique (multibacillaire [MB], paucibacillaire [PB]). Pour les patients suspects de lèpre MB, des frottis de sérosités (OG, OD, et/ou lésions cutanées) ont été réalisés pour la confirmation du diagnostic par la bacilloscopie. Une biopsie cutanée de lésion lépreuse MB a été prélevée. Pour les patients

recrutés en 2006 et 2007, l'examen anatomopathologique sur les biopsies a également été réalisé pour le diagnostic.

Les ADN ont été extraits des biopsies et des sérosités par la méthode de congélation-décongélation et/ou la méthode au Chelex 5%. Les ADN ont été analysés par la méthode de PCR-hybridation reverse, développée par *N Honoré et coll.* (IPP). Les ADN ont aussi été testés par la technique de Touch-Down-PCR en temps réel avec l'agent intercalant Sybr Green (TD-PCR-SG) qui a été développée à l'IPM.

Les ADN standard utilisés comme témoins positifs étaient des plasmides portant une séquence du gène *rpoB* avec respectivement le codon sauvage Ser425, et les codons mutés Ser425Leu, Ser425Met et Ser425Phe. Des ADN extraits de biopsies de pattes de souris infectées par des *M. leprae* mutés sur le codon Ser425 du gène *rpoB* ont été utilisés pour la validation des deux tests moléculaires. Ces ADN ont été fournis par *N Honoré (IPP)*.

### Résultats

#### • Recrutement des patients MB et diagnostic de la lèpre

Au total, depuis 2002, 188 patients cliniquement suspects de lèpre MB ont été recrutés dans différentes régions endémiques de lèpre à Madagascar (Est, Sud-Est, Ouest et Sud-Ouest) ainsi que dans la capitale Antananarivo. Parmi ces patients, 55 ont été confirmés lépreux MB soit par la bacilloscopie positive sur les sérosités soit par l'examen anatomopathologique. Il s'agissait de 34 nouveaux cas, 11 suspects de rechutes, 5 perdus de vue ou malades irréguliers et 5 patients dont l'historique de la lèpre n'était pas connu. L'âge moyen des patients était de 35,7 ans (variant de 12 à 74 ans) ; 5 d'entre eux avaient moins de 15 ans. Sur ces 51 patients MB, 45 ont eu une biopsie cutanée de lésion.

#### • Évaluation des deux tests de résistance par PCR sur biopsies de patients lépreux MB

Les résultats des PCR à partir des ADN extraits de biopsies MB ont été décrits dans le rapport d'activité 2006. En résumé, sur 28 ADN ayant donné des résultats interprétables par les deux techniques, 24 (13 de nouveaux cas, 6 suspects rechutes, 1 perdu de vue, 4 cas inconnus) ont été trouvés avec le codon sauvage Ser425 par les 2 méthodes de PCR. Par contre pour 4 patients dont les ADN ont été trouvés sensibles par la PCR-hybridation, les résultats par la TD-PCR-SG étaient différents : les biopsies N°171 et N°231 (mélange des allèles Ser425 et Ser425Leu), la biopsie N°167 (Ser425Leu) et la biopsie N°172 (Ser425Phe).

• **Résultats des tests de résistance réalisés à partir de sérosités de lésions MB**

L'extraction de l'ADN a été faite à partir de 51 lames dont l'indice bacillaire (IB) était positif au moment du diagnostic. Avant l'extraction, les lames ont toutes été relues au microscope : 31 avaient un IB >0 et 20 avaient un IB nul.

Sur les 51 ADN extraits de sérosités, seulement 2 ont donné un résultat positif par la PCR-hybridation. Ces deux échantillons portaient l'allèle sauvage Ser425.

Sur 49 extraits de sérosités (de 31 patients) qui ont été analysés par la méthode de TD-PCR-SG, 19 ADN (de 13 patients) ont donné un résultat interprétable. Ces ADN correspondaient à 18 sur 29 lames à IB>0 (62%) et 1 sur 20 lames à IB=0. 17 ADN portaient le codon Ser425. Par contre pour 2 sérosités, en plus du codon sauvage Ser425, on a obtenu une réponse avec respectivement le codon muté Ser425Leu et le codon Ser425Met, suggérant que ces ADN pourraient porter deux allèles différents du codon 425.

### Conclusion

Les résultats ont montré que l'application des deux méthodes de PCR sur des biopsies cutanées de lésions à bacilloscopie positive était réalisable. La PCR-hybridation à partir de sérosités n'a pas été efficace. Bien que la TD-PCR-SG ait été moins sensible avec l'ADN des sérosités fixées sur lame (62%) qu'avec l'ADN extrait des biopsies (78%), elle peut être un recours si l'on veut réaliser une étude sur la résistance de *M. leprae* quand la pratique d'une biopsie n'est pas possible. Cependant la sensibilité est dépendante de la richesse en bacilles des prélèvements biologiques.

Par ailleurs, pour valider ces méthodes, il était nécessaire de disposer de plus d'échantillons provenant de patients en rechute MB pour augmenter les chances

de trouver des *M. leprae* avec un gène *rpoB* muté. Au total, seulement 11 patients suspects de rechute MB et 5 malades irréguliers ont été trouvés et inclus dans l'étude, ce qui est insuffisant pour l'évaluation de ces méthodes. Ceci montre la difficulté à diagnostiquer les patients MB et à les recruter dans un pays où seul le diagnostic clinique de la lèpre est possible dans les zones reculées.

### 8- ACTIVITÉ ANTIMYCOBACTÉRIENNE DE SUBSTANCES NATURELLES

IPM : O Rabe, H Ramarokoto, V Rasolofo Razanamparany  
CNRE : L Ramarason, H Andriamanatoanina  
Faculté des Sciences Antananarivo : A Andriantsimahavandy  
IPP : G Marchal

Cette étude fait partie des travaux de thèse de doctorat de Sciences de O Rabe, travaux réalisés au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE, dans l'Unité des Mycobactéries de l'IPM, et au Laboratoire d'immunothérapie à l'IPP.

Il n'y a pas eu de découverte de nouveau médicament antituberculeux depuis 40 ans. C'est pourquoi la recherche de nouvelles molécules ayant des activités antimycobactérienne est toujours d'actualité. L'objectif de cette étude était de rechercher une activité antimycobactérienne dans des extraits de plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle à Madagascar.

L'activité *in vitro* d'environ 200 substances naturelles malgaches a été évaluée par le test à la résazurine. Deux molécules, le terpinen-4-ol et linalool, ayant une activité inhibitrice sur la croissance de *M. tuberculosis*, *M. bovis* et plusieurs mycobactéries atypiques ont ainsi été isolées d'un extrait d'huile essentielle de *Phellolopium madagascariensis*.

---

## ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE

(voir page 62)

---

---

# MALADIES VIRALES

---

---

## RESPONSABLES SCIENTIFIQUES

- **JM Reynes**, vétérinaire Ph D, chef de l'Unité de Virologie
- **M Rakoto Andrianarivelo** (jusqu'en novembre), médecin Ph D, adjoint au chef de l'Unité
- **R Razafindratsimandresy**, scientifique, adjoint au chef d'Unité, responsable du laboratoire National OMS pour la Poliomyélite et la Rougeole
- **SF Andriamandimby**, médecin, adjoint au chef d'Unité, responsable des laboratoires Arbovirus, Virus des Fièvres Hémorragiques et de la Rage
- **JM Héraud**, scientifique, adjoint au chef d'Unité, responsable du laboratoire National OMS pour la Grippe

## SCIENTIFIQUES ASSOCIES

- **E Jeanmaire**, vétérinaire, étudiante, Certificat d'Etudes Approfondies Vétérinaires

## COLLABORATIONS

### Laboratoire National OMS de Référence pour la Poliomyélite et la Rougeole

- **B Randriamanalina, F Razaiarimanana**, Service de la Vaccination, Ministère de la Santé et du Planning familial
- **L Tapsoba**, OMS Antananarivo
- **F Kasolo, C Byabamazima**, OMS/AFRO (Poliomyélite)
- **A Dosseh**, OMS/AFRO (Rougeole)
- **N Gumede**, NICD, Johannesburg, Laboratoire Régional OMS pour la Poliomyélite
- **M Masango**, NICD, Johannesburg, Laboratoire Régional OMS pour la Rougeole
- **“Comité de Coordination Inter-Agences”** pour le programme élargi de vaccination (PEV)

### Laboratoire National OMS de Référence pour la Grippe

- **L Tapsoba**, OMS Antananarivo
- **Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale :**
  - . **RR Andrianirina**, Direction des Urgences et de la Lutte contre les Maladies Transmissibles (DULMT)
  - . **L Ravololona**, Service de Lutte contre les Maladies Emergentes et Ré-émergentes (SLMER/DULMT)
  - . **A Randriamanarivo Solofoniaina**, Service de Surveillance Epidémiologique (SSUREP/DULMT)
- **Système de surveillance sentinelle :**
  - . CMS Ambassade de France, Isoraka
  - . Dispensaire Adventiste, Manjakaray
  - . Dispensaire Catholique, Anosisoa - Ambohimanarina
  - . Dispensaire Catholique, Analamahitsy
  - . Dispensaire des Soeurs, Ilanivato
  - . Dispensaire Catholique, Alasora
  - . OSTIE, Behoririka

### Laboratoire National de Référence pour la Rage

- **LT Razafimanantsoa**, vétérinaire, chef de service de la lutte contre les maladies animales, direction de la santé animale et du phytosanitaire, Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche
- **EF II Ramahafalalao**, Point Focal Rage, service de la Lutte contre les Maladies Emergentes et Ré-émergentes, Direction des Urgences et de la Lutte contre les Maladies Transmissibles (DULMT)

### Laboratoire pour les Arbovirus et les virus responsables des Fièvres Hémorragiques

- Direction des Urgences et de la Lutte contre les Maladies Transmissibles (DULMT)
- Service de Surveillance Epidémiologique (SSUREP)
- Service de Lutte contre les Maladies Emergentes et Ré-émergentes (SLMER)



### **SOUTIENS FINANCIERS**

- Ministère de la Santé Française
  - Banque Mondiale
  - Organisation Mondiale de la Santé
  - Direction des Affaires Internationales du Réseau International des Instituts Pasteur
  - Department of Human Health Services (DHHS), USA
  - Institut Pasteur de Madagascar.
- 

## **DECOMPOSITION DU PROGRAMME**

### **ACTIVITES DE RECHERCHE**

- Paramyxovirus et chauves-souris à Madagascar
- Lyssavirus et chauves-souris
- Etude de la séroprévalence de l'hépatite A

### **ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE (voir page 57)**

- 1- Laboratoire National de référence OMS pour la poliomyélite**
  - 2- Laboratoire National de référence OMS pour la rougeole**
  - 3- Laboratoire National de référence OMS pour la grippe**
  - 4- Laboratoire National de référence pour la rage**
  - 5- Laboratoire pour les Arbovirus et les virus responsables des Fièvres Hémorragiques**
-

## ACTIVITES DE RECHERCHE

### PARAMYXOVIRUS ET CHAUVES-SOURIS À MADAGASCAR

E Jeanmaire, R Rakoto Rakotomalala, GM Razafitrimo, T Rakotojoelinandrasana, NS Andriamamonjy, JM Reynes avec la collaboration de N Tordo et P Marianneau, Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, IP Lyon

Des virus de la sous-famille des Paramyxovirinae ont été associés au cours des 10 dernières années à l'émergence de nouvelles maladies chez l'homme et chez l'animal. Ces quatre nouveaux virus ont été décrits en Asie du Sud, du Sud-Est ou en Australie et ont pour particularité de partager un même réservoir, des chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* (famille des Pteropodidae). Trois espèces endémiques de cette famille sont présentes à Madagascar : *Pteropus rufus*, *Rousettus madagascariensis* et *Eidolon dupreanum*. Dans le cadre d'une Action Concertée Inter-Pasteurienne (ACIP), nous avons montré la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre des paramyxovirus chez ces animaux, notamment dans la région de Marozevo, chez des individus d'une colonie de l'espèce *Eidolon dupreanum*<sup>1</sup>.

Suite à ce résultat, des collectes de prélèvements (sang, urine ou écouvillon de gorge) avaient été organisées mensuellement en 2006, chez cette colonie et sur une autre, géographiquement proche, comprenant des individus de la même espèce (cf infra). Le but était d'isoler le virus de la sous-famille des Paramyxovirinae responsable des séroconversions. Les résultats de cette recherche avaient été négatifs. Cette recherche a été poursuivie en 2007 en augmentant le délai entre deux collectes de prélèvements pour ne pas stresser les colonies. Ainsi, des collectes de prélèvements ont été organisées en avril, septembre et décembre 2007. Une étude sérologique a été également effectuée sur l'ensemble de la collection de sérums constitués pendant le suivi afin d'apprécier ou non une période de circulation du virus pendant la période d'observation.

#### Tentative d'isolement

Les tentatives d'isolement de ces virus ont été effectuées sur cellules Vero E6 (cellules de rein de singe) à partir des prélèvements urinaires et pharyngés collectés.

A partir des 109 prélèvements pharyngés (53 collectés en avril, 21 en septembre et 35 en décembre) et des 92 prélèvements urinaires (47 collectés en avril, 19 en septembre et 26 en décembre) inoculés en 2007, deux effets cytopathogènes (ECP) ont été obtenus sur cellules. Un (CS950U) était compatible avec une infection par un paramyxovirus (formation de syncytia) tandis qu'un autre (CS963U) produisait une ECP diffus et lyti-

que (un troisième prélèvement, CS963G, a induit une toxicité cellulaire). L'immunofluorescence indirecte réalisée avec des polyclonaux dirigés contre le virus Nipah et contre une dizaine d'arbovirus pathogène pour l'homme à Madagascar a été négative. L'identification de virus de la famille des Herpesviridae par PCR consensus a été négative.

#### Suivi sérologique

Les sérums obtenus en quantité suffisante après centrifugation des prélèvements sanguins effectués entre novembre 2005 et avril 2007 sur les chauves-souris des grottes d'Angavokely et d'Angavobe ont été testés en ELISA pour la recherche d'anticorps anti-Nipah, Hendra et Tioman selon la technique précédemment décrite<sup>2</sup>.

Une prévalence d'infection plus forte est observée au début du suivi, pendant la saison des pluies 2006 (janvier-mars) faisant suite à la saison de mise bas (décembre) puis à nouveau la même année avant la saison de mise bas et la saison des pluies (tableau I). En analyse univariée, seule la date de capture est significativement liée au résultat du test ELISA (regroupement des mois de capture par "saison", novembre-février 2006, mars-mai 2006, juin-août 2006, septembre-novembre 2006, décembre 2006, et avril 2007, de façon à obtenir des effectifs positifs suffisants) (tableau II).

Sur les 14 animaux capturés et prélevés plusieurs fois, 5 ont fait l'objet d'une séroconversion : N°2005 entre novembre 2005 et mars 2006, N°2156 entre mai et juillet 2006, N°2182 entre juin et août 2006, N°2169 entre mai et octobre 2006, N°2313 entre août et novembre 2006. Cinq autres ont fait l'objet d'une "séronégativation" : N°2024 et N°2071 entre janvier et février 2006, N°2078 entre janvier et mars 2006, N°2051 entre mars et mai 2006, N°2025 entre janvier et mai 2006.

Les 64 sérums positifs en ELISA ont été testés en séroneutralisation contre les trois virus, dans l'unité de biologie des infections virales émergentes de l'Institut Pasteur à Paris délocalisée à Lyon (UBIVE). Trente et un des 58 sérums trouvés par ELISA porteurs d'anticorps dirigés contre les virus Hendra et/ou Nipah ont été trouvés porteurs d'anticorps neutralisant les virus Hendra et/ou Nipah, avec des titres allant de 20 à 160. Aucun des 6 sérums trouvés par ELISA porteurs d'anticorps dirigés contre le virus Tioman n'a été trouvé porteur d'anticorps neutralisant le virus Tioman.

1 : Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM, Faure C, Georges-Courbot MC, Rousset D, Reynes JM. Henipavirus and Tioman virus antibodies in Pteropodid bats, Madagascar. *Emerg Infect Dis*, 2007; 13 : 159-161.  
2 : Reynes JM, Counor D, Ong S, Faure C, Seng V, Molia S, Walston J, Georges-Courbot MC, Deubel V, Sarthou JL. Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis*, 2005; 11 : 1042-1047.

Tableau I : Recherche par ELISA d'anticorps dirigés contre les virus Nipah, Hendra et Tioman dans le sérum de chauves-souris de l'espèce *Eidolon dupreanum* prélevées à Angavokely et Angavobe

Date collecte prélevements	Nb testés (prélevés)	Nb séropositifs anti-			Nb séropositifs (%)
		Nipah	Hendra	Tioman	
Novembre 05	33 (34)	1	1	1	2 (6)
Janvier 06	35 (36)	14	11	0	14 (40)
Février 06	7 (28)	2	1	0	2 (29)
Mars 06	31 (40)	10	7	0	10 (32)
Avril 06	33 (34)	7	4	0	7 (12)
Mai 06	39 (40)	0	0	0	0 (0)
Juin 06	38 (39)	2	2	0	3 (8)
Juillet 06	23 (23)	1	1	1	2 (4)
Août 06	18 (18)	2	1	0	2 (11)
Septembre 06	20 (20)	0	0	2	2 (10)
Octobre 06	30 (31)	11	7	0	11 (37)
Novembre 06	21 (23)	3	1	0	3 (14)
Décembre 06	32 (32)	3	3	1	3 (9)
Avril 07	52 (52)	2	1	1	3 (6)
Septembre 07	0 (22)	NA	NA	NA	NA
Décembre 07	0 (34)	NA	NA	NA	NA
<b>Total</b>	<b>412 (506)</b>	<b>58</b>	<b>40</b>	<b>6</b>	<b>64 (16)</b>

NA = non applicable

Tableau II : Analyse univariée, facteurs de risque de positivité du test ELISA

Variable	p value (chi2 ou test exact)
Sexe	0,2857
Age	0,1351
Colonie	0,793
Saison	0,012

## Conclusion

L'analyse sérologique montre qu'il y a eu circulation d'un paramyxovirus pendant la période de suivi. Le test ELISA utilisé a de bonnes performances en matière de sensibilité (87%) et spécificité (99%) quant il s'agit de détecter des anticorps neutralisants dirigés contre le virus Nipah comme dans le contexte cambodgien où le virus Nipah était présent. Dans le cadre de notre suivi, le fait de trouver négatifs par technique de séroneutralisation 46% des sérums positifs par ELISA est en faveur d'une mauvaise spécificité. Cela confirme notre hypothèse de la circulation d'un autre paramyxovirus différent mais proche des paramyxovirus testés.

Un seul isolat produisant un ECP compatible avec celui produit par un paramyxovirus a été isolé sur cellules. L'identification par immunofluorescence indirecte avec des anticorps dirigés contre le virus Nipah a été négative. Dans l'hypothèse de la circulation d'un virus proche mais différent de celui-ci, une tentative d'identification sera faite par technique moléculaire avec des amorces permettant d'amplifier les virus de la sous-famille des paramyxovirines. Le suivi est poursuivi avec des collectes de prélèvements ciblant particulièrement

les périodes où le virus d'après nos résultats sérologiques est susceptible de circuler à savoir juste après la période de mise bas (décembre) et pendant l'hiver austral (juillet-août).

Si le virus était isolé, nous pourrions reprendre notre étude sérologique en utilisant ce virus et l'antigène produit à partir de ce virus pour avoir des tests sérologiques plus sensibles et spécifiques. Nous pourrions confirmer ou non nos résultats préliminaires, à savoir que l'infection ne semble pas différer selon le sexe ni l'âge des individus, qu'elle ne semble pas différer non plus selon la colonie (ce qui n'est pas surprenant car les deux colonies sont géographiquement proches et les déplacements de chauve-souris de l'une à l'autre de ces deux colonies ont été observés fréquemment), et identifier correctement les périodes de circulation virale par l'étude des séroconversions qui ne sont pas bien identifiées avec les virus utilisés actuellement.

## LYSSAVIRUS ET CHAUVES-SOURIS

*E. Jeanmaire, R. Rakoto Rakotomalala, GM Razafitrimo, T Rakotojoelinandrasana, NS Andriamamonjy, JM Reynes avec la collaboration de H Bourhy, Unité de Recherche et d'Expertise Dynamique des Lyssavirus et Adaptation à l'Hôte, Institut Pasteur, Paris*

Sur tous les continents, les chauves-souris hébergent et transmettent des lyssavirus. En 2006, la détection d'un lyssavirus circulant chez les chauves-souris à Madagascar avait été tentée sur des prélèvements pharyngés et des caillots sanguins obtenus lors d'études transversale et longitudinale, par isolement de virus sur souriceaux nouveaux-nés et par recherche de génome viral (voir rapport annuel 2006). Aucun lyssavirus n'avait été détecté. Cette recherche de virus a été poursuivie dans le cadre du suivi des colonies d'*E. dupreanum* à Angavokely et Angavobe (district de Moramanga). Elle a été complétée par une étude sérologique visant à vérifier qu'un lyssavirus avait bien circulé dans ces colonies.

## Détection de virus

Trois séries de captures (avril, septembre et décembre) ont permis de recueillir 101 prélèvements pharyngés et 164 caillots sanguins.

Les prélèvements pharyngés ont été regroupés en 13 pools. La détection de génome a été négative pour 9 d'entre eux et non concluante pour 4 autres (absence de détection du gène de la  $\beta$  actine, témoin de présence d'ARN dans les pools). La tentative d'isolement sur souriceaux nouveau-nés est négative pour 8 d'entre eux et reste à faire pour les 5 autres.

Les caillots sanguins ont été traités également par pools (18 pools). La détection de génome a été négative pour 12 d'entre eux et non concluante pour 6 autres. La tentative d'isolement sur souriceaux nouveau-nés est positive pour 4 pools et reste à faire pour 6 autres (N°90 à 95). Deux isolats ont été identifiés, par le Centre Collaborateur OMS de référence et de recherche pour les Arbovirus à l'Institut Pasteur de Dakar, comme étant des souches du virus Ife (orbivirus), un autre isolat comme étant une souche du virus Dakar Bat (flavivirus) et le dernier est encore en cours d'identification

### Etude sérologique

Des anticorps neutralisant le virus rabique (CVS), le virus Lagos Bat (LBV), le virus Australian Bat Lyssavirus (ABLV), les virus European Bat Lyssavirus (EBLV) 1 et 2, ou le virus Mokola (MOKV) ont été recherchés par technique rapide de réduction de foyers fluorescents dans les sérums, choisis au hasard dans la bibliothèque, de 50 individus de l'espèce *E. dupreanum* capturés sur ces deux colonies. Cette technique a été effectuée par l'unité de recherche et d'expertise dynamique des Lyssavirus et adaptation à l'hôte de l'Institut Pasteur à Paris. Aucun anticorps dirigé contre les virus EBLV-2, MOKV, ABLV CVS n'a été détecté. Un sérum contenait des anticorps dirigés contre EBLV-1 mais 12 sur 50 (24%) contenaient des anticorps dirigés contre LBV, avec des titres variant de 35,2 à 65. Un autre échantillon a été analysé par la même technique. Il contenait les sérums de 28 individus de l'espèce *P. rufus* capturés lors de l'étude transversale. Cinq (18%) contenaient des anticorps dirigés contre EBLV-1 et un des anticorps dirigés contre LBV.

### Conclusion

Aucun lyssavirus n'a pu être encore détecté dans les prélèvements récoltés cette année même si d'autres virus ont pu être isolés à partir des prélèvements de caillots. Il reste cependant des prélèvements à analyser. L'étude sérologique a permis de confirmer qu'un lyssavirus avait circulé dans la colonie, ce qui nous encourage à poursuivre les prélèvements sur ces sites. La circulation de LBV ou d'un virus très proche n'est pas surprenante chez *E. dupreanum* car LBV est hé-

bergé en Afrique par *E. helvum*, seule autre espèce du genre et nous avons déjà pu montrer que ces deux espèces partageaient au moins deux autres virus, le virus Ife et un herpesvirus (données non publiées). La détection d'anticorps dirigés contre EBLV-1 chez une autre des trois espèces frugivores malgaches est en faveur de la circulation d'un autre lyssavirus chez les chauves-souris de Madagascar. Les sérums des individus de l'espèce *E. dupreanum* avaient été choisis au hasard dans la collection de sérums de l'étude longitudinale. Il se trouve qu'il s'agit de sérums d'animaux qui ont parfois été recapturés. L'étude sérologique devrait se poursuivre en recherchant des anticorps dirigés contre LBV dans les sérums des animaux plusieurs fois capturés. Ceci devrait permettre d'identifier une période de circulation de virus au cours du suivi des colonies et nous aider à cibler une période pour accroître nos chances d'isolement du lyssavirus.

### ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DE L'HEPATITE A

V Raharimanga, JF Carod, V Richard

L'objectif principal de cette étude était d'estimer la séroprévalence d'anticorps anti-VHA dans la Communauté urbaine d'Antananarivo.

Au total, 926 sérums collectés en 2004 de la population de 2 à 24 ans ont été analysés pour la recherche de l'anticorps IgG anti-VHA par un test ELISA. Des questionnaires standardisés ont été utilisés pour recueillir les informations concernant les sujets. 406 hommes et 520 femmes ont été inclus. La séroprévalence globale était de 92,2% (854/926). La séroprévalence en anticorps anti-VHA ne différait significativement selon le genre ( $p=0,16$ ). L'âge, la profession du chef de famille, les antécédents d'injection ou de perfusion IV, la nature du sol, l'existence de douche, le mode de cuisson des aliments sont les variables liées à la prévalence de l'anticorps anti-VHA.

Malgré l'amélioration des conditions d'hygiène pendant ces dernières années, la séroprévalence observée dans la CUA classe encore Madagascar dans une zone de forte endémicité. La vaccination n'est pas recommandée pour la population résidente, mais pour les voyageurs qui devraient séjourner à Madagascar.

---

## ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE

(voir page 57)

---

---

# BACTERIOLOGIE

---

---

## 1- PROGRAMME TRANSVERSAL DE RECHERCHE SUR LES STAPHYLOCOCCUS AUREUS RÉSISTANT À LA METHICILLINE

Il s'agit d'une étude multicentrique dont l'objectif principal est de décrire les infections à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline dans 5 contextes africains (Madagascar, Cameroun, Sénégal, Niger, Maroc).

### Objectifs

Les objectifs spécifiques sont :

- d'estimer l'incidence des infections à SARM dans des structures hospitalières urbaines, à l'aide d'une étude épidémiologique prospective;
- d'identifier les facteurs de risque d'infection par un SARM et les facteurs de risque d'infection par un SARM vs par un *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) en milieu hospitalier par enquête cas-témoins;
- et de réaliser l'analyse génétique des souches par typage de la protéine A (*spa* typing), typage par séquençage multilocus ("MLST"), typage du système *agr*, typage de la cassette *SCCmec* et détermination du profil toxinique des souches.

### Avancée des projets

Le recrutement des patients a pris fin début 2008.

#### • 548 prélèvements

#### • 419 germes isolés dont :

- 80 *S. aureus* (7,4% SARM)
- 205 entérobactéries (33% BLSE)
- 34 *A. baumannii* (47% BMR)
- 38 *Pseudomonas aeruginosa*
- 66 Streptocoques et Staphylocoques coagulase négatif.

Les études de biologie moléculaire ont démarré.

### Conclusion

Cette étude partielle a montré un faible taux d'infection à *S. aureus* et encore moins à SARM. Les infections à Entérobactéries sont de loin les plus fréquentes pour des services de Chirurgie et de réanimation avec un taux de BLSE à 30%.

## 2- PROGRAMME TRANSVERSAL DE RECHERCHE SUR LA RÉSISTANCE AUX QUINOLONES CHEZ LES ENTÉROBACTÉRIES

Il s'agit d'une étude multicentrique dont les objectifs sont de :

- Identifier et décrire la résistance aux quinolones

par mécanisme plasmidique parmi les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, en Afrique, en Asie et

- déterminer, chez les entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter* spp) résistantes aux céphalosporines de troisième génération, la proportion des résistances plasmidiques aux quinolones en Afrique et Asie (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*) et les facteurs de risque d'acquisition de ces mécanismes
- déterminer le contexte génétique dans lequel circulent ces déterminants génétiques et en particulier leur localisation sur les intégrons de la famille In4.

### Protocole

- les souches nosocomiales seront issues des prélèvements du protocole PTR SARM et les patients venant au Centre de Biologie Clinique (CBC)
- les souches communautaires seront issues des prélèvements qui seront effectués au CBC.

Cent souches BLSE obtenues (communautaires et nosocomiales), détection par PCR des *qnrA*, *B* et *S* ainsi que *aac 6'* en cours. Seules les souches *qnr* et *aac 6'* positives seront envoyées à IP Maroc puis IP Dakar pour typage et séquençage.

Mais toutes les BLSE seront typées à l'IPM par PCR.

## 3- ETUDE SUR LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DANS UN SERVICE DE CHIRURGIE

Etude prospective dans un service de chirurgie de l'HJRA basée sur la surveillance globale de toutes les interventions de la spécialité chirurgicale, y compris la chirurgie ambulatoire, de manière ininterrompue pendant 6 mois. Surveillance de tous les patients admis dans le service pour plus de 48 heures.

### Objectif principal

Décrire l'épidémiologie des infections nosocomiales du service de chirurgie.

## 4- ETUDE DE LA FRÉQUENCE DE PORTAGE, DU NIVEAU DE CONTAMINATION ET DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES FLORES PATHOGÈNES PRÉSENTS SUR LES POULETS DE CHAIR AU STADE DE L'ABATTAGE

Etude multicentrique financée par la DAI, réalisée par les 11 laboratoires d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement du réseau de l'Institut Pasteur .



## Résultats obtenus par le LHAE-IPM

Etude de la prévalence de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les poulets : Sur 150 échantillons de poulets prélevés au sein d'une vingtaine d'abattoirs toutes catégories comprises (industriels, artisanaux, à domicile, sur les rues); 72 % ont été contaminés par des *Campylobacter* dont 74% jejuni, 17% coli, 6% upsaliensis et 4% lari ;16 % des poulets ont été contaminés par des *Salmonella* dont 75% des sérotypes *Enteritidis*, 17% *Bardo*; 4% *Lerum* et 4% *Newport*.

Les souches isolées ont été, par la suite, soumises à des tests d'antibiorésistance : 79% des souches de *Salmonella* isolées ont été résistantes à au moins un antibiotique : 84% résistaient à l'association Amoxicilline - Ticarcilline, 42% ont été résistantes à l'association Amoxicilline - Ticarcilline et Tetracycline;

24% des souches de *Campylobacter* isolées ont été résistantes à au moins un antibiotique, 8% ont montré une résistance à deux antibiotiques, 8% ont été multirésistantes. La résistance à l'Amoxicilline a été la plus fréquente 19%, vient ensuite une résistance à l'Erythromycine 17%, puis à l'Azithromycine 9%, la résistance avec la Gentamycine et la ciprofloxacine a été très faible.

### 5- ETUDE DE LA FRÉQUENCE DE L'INFECTION PAR *HELICOBACTER PYLORI* DES PATIENTS PRÉSENTANT UNE PATHOLOGIE GASTRO-DUODÉNALE, DE LA SENSIBILITÉ DES SOUCHES AUX ANTIBIOTIQUES ET DE LA DIVERSITÉ DE LA RÉGION 3' DU GÈNE *CAG A*

IP Dakar : *S Breurec*

IPM : *C Raharisolo Vololonantenaina, E Corradi, JF Carod, M Ratsitorahina*

HJRB : *R Ramanampamonjy*

Financement : ACIP – IP Paris

## Introduction

Il s'agit d'une étude multicentrique associant plusieurs Instituts du Réseau International des Instituts Pasteur (Sénégal, Algérie, Madagascar, Cambodge, Grèce) et l'Institut Pasteur à Paris. Il est la continuité d'une 1<sup>ère</sup> ACIP, menée en 2004 au Cambodge et en Nouvelle-Calédonie. Cette année a été marquée par la difficulté et la lenteur d'obtention des autorisations administratives pour le démarrage du projet. L'inclusion des patients a commencé en avril 2007.

## Contexte national

A Madagascar, une étude épidémiologique a été effectuée à l'Hôpital Joseph Raseta de Befelatanana (HJRB), service de Médecine Interne. Chez des patients entrants de plus de 15 ans, la séroprévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* était de 82,2%. Aucune don-

née n'est disponible concernant l'isolement d'*H. pylori* chez des patients atteints de pathologie gastro-duodénale et concernant le profil de résistance de cette bactérie aux antibiotiques.

## Rappel des objectifs

Les objectifs étaient la mise en place ou la consolidation au niveau de chaque site (Algérie, Cambodge, Grèce, Madagascar, Sénégal) d'un réseau de compétence pour l'étude des pathologies gastro-duodénales liées à *H. pylori* associant microbiologistes, anatomo-pathologistes et gastro-entérologues, d'une étude de la pathologie gastro-duodénale associée à l'infection par *H. pylori* chez des patients examinés en milieu hospitalier, d'une étude bactériologique avec culture, identification et étude de la sensibilité aux antibiotiques de *H. pylori*, et d'une étude de la diversité de la région 3' du gène *cagA* et de son lien avec la pathologie gastro-duodénale associée.

Cette ACIP sert de base à un projet Européen ERA-NET "Pathogenomics", financé par l'Agence Nationale de la Recherche pour la partie française, associant les Instituts du RIIP concernés par l'ACIP, l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, l'Institut Louis Malardé à Tahiti, l'Institut Pasteur à Paris, l'Institut Max Planck de Berlin, la Faculté de Médecine d'Hanovre et leurs laboratoires partenaires dans le monde (Cameroun, Indonésie, Java Kenya, Namibie et Nouvelle-Guinée).

## Méthodologie

Des biopsies gastriques (antre et fundus) ainsi que des prélèvements sanguins pour une sérothèque et une culothèque ont été réalisées chez des patients présentant une affection gastro-duodénale non traitée. Un examen anatomopathologique a été fait en parallèle avec la bactériologie sur les biopsies. Pour la bactériologie, il s'agit d'un isolement des souches pour extraction d'ADN, un test à l'urée et une coloration de gram pour identification de l'agent pathogène.

## Patients inclus

Entre avril et décembre, 27 patients ont été inclus dans l'étude, soit 18 hommes et 9 femmes âgés de 19 à 74 ans. Localement, les examens anatomopathologiques de toutes les biopsies sont assurés par le Dr C Raharisolo Vololonantenaina (IPM). Globalement, la relecture des biopsies gastriques faite par le Dr Michel Huerre (IP Paris), responsable de la standardisation de la lecture sur l'ensemble des sites concorde avec les résultats locaux.

### Examen anatomopathologique

18 patients sur 27 (66,7%) montrent la présence d'*H. pylori* au niveau de l'antra ou du fundus ou les deux. La pathologie gastrique associée à la présence de *H. pylori* est une gastrite chronique non atrophique dans 66,66% des cas (12/18), la métaplasie intestinale a été trouvée dans un cas. Les follicules lymphoïdes ont été observés dans 66,66% des cas (12/18). Aucune lésion de dysplasie ni d'adénocarcinome n'a été trouvée sur tous les prélèvements examinés.

### Examen bactériologique

*E Corradi*

Aucune souche n'a été isolée sur toutes les biopsies communiquées (27 biopsies antrales et 26 biopsies fundiques). Les milieux de culture utilisés (sang de cheval laqué) n'ont pas permis aux bactéries de pousser. Par conséquent, aucun antibiogramme ni extraction d'ADN n'a été effectué. Le gram et le test à l'urée sont positifs pour deux cas (2 antrales et 2 fundiques), 1 cas avec gram positif (antra et fundus) et test à l'urée négatif pour les 2 biopsies, et un autre cas avec gram et test à l'urée positifs uniquement sur les biopsies antrales.

Une sérothèque et une culothèque ont été faites pour chaque patient.

Le nombre de souches requis n'a pas été atteint pour les sites Alger, Madagascar et Sénégal, les inclusions se poursuivront en 2008.

### Discussion et perspectives

L'isolement sur les milieux de culture basé sur le sang de cheval laqué étant négatif, un partenariat avec l'Escadron Mixte de la Gendarmerie de Fort Duchesne d'Antananarivo a été élaboré en mars 2008, pour obtenir des poches de sang de cheval frais à raison de 200 ml par semaine pour remplacer le sang de cheval laqué. L'isolement effectué sur un cas avec ce nouveau milieu de culture est positif.

### 6- *NEISSERIA GONORRHOEAE*

*E Ratsima*

#### Objectif

Etude Mutations ponctuelles au sein des gènes *ponA* et *penA* de *Neisseria gonorrhoeae* liées à une sensibilité diminuée à la pénicilline : mise en place d'une surveillance moléculaire par PCR en temps réel dans plusieurs zones géographiques.

- 55 ADN envoyés à l'IP Nouvelle Calédonie
- Résultats en cours



---

---

# CYSTICERCOSE

---

---

Intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la cysticercose.

## **Objectif**

Le but de cette étude est de mettre au point un meilleur test de diagnostic de la cysticercose et en particulier de la neurocysticercose en évaluant la PCR comme outil de diagnostic de la cysticercose sous sa forme sous-cutanée et cérébro-méningée (neurocysticercose). La PCR a déjà été étudiée dans la littérature comme outil de diagnostic de pièces histologiques de NC : biopsies neurochirurgicales notamment mais elle n'a jamais été envisagée sur le sang, les nodules sous cutanés ou le LCR. Cet outil de biologie moléculaire sera d'abord mis au point sur des morceaux de viande ladre de différentes régions de Madagascar (Protocole Viande Ladre), puis évalué sur des biopsies sous-cutanées fortement suspectes. Enfin, la ou les PCR donnant le meilleur résultat seront testées sur les sérums et LCR de patients fortement suspects de neurocysticercose.

Cette étude permettra également de situer phylogénétiquement les *Taenia solium* malgaches.

## **Activités en 2007**

Etude phylogénétique des cysticerques porcins :

- extraction, PCR, séquençage, phylogénie : en collaboration avec la génopôle de l'IPM
- recrutement patients cysticercose cutanée et neurocysticercose
- mise au point des PCR, simple et nested.

## **Résultats préliminaires**

### *Phylogénétique*

Co-circulation à Madagascar de souches Américaines-Africaines et de souches asiatiques (Article phylogénie en cours de rédaction).

### *PCR diagnostic*

Efficacité de la PCR sur les biopsies positives en anatomopathologie (corrélation 100%), efficacité d'un protocole PCR avec 60 cycles sur la mise en évidence d'ADN dans du LCR, essai d'une PCR nichée de meilleure sensibilité que la PCR simple mais manque de spécificité sur l'humain.

---

---

# **ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE**

---

---

---

---

# ACTIVITES DE SANTE PUBLIQUE

---

---

## **Considérations générales**

*Les différentes unités de l'Institut Pasteur de Madagascar interviennent dans des actions de Santé Publique, pour certaines directement en tant que centres de référence OMS ou nationaux, pour d'autres par leur participation active à la surveillance épidémiologique.*

*Par ailleurs, des missions d'expertise ou des interventions peuvent être effectuées à la demande du Ministère de la Santé et du Planning Familial. Ces capacités s'étendent aussi au niveau de la zone Océan Indien, puisque l'Institut Pasteur de Madagascar est régulièrement sollicité par les autorités sanitaires des Comores et des Seychelles.*

*L'Institut Pasteur de Madagascar abrite plusieurs centres ou laboratoires de référence :*



- Centre Collaborateur OMS pour la Peste
- Laboratoire National de Référence OMS pour la Poliomyélite
- Laboratoire National de Référence OMS pour la Grippe
- Laboratoire National de Référence OMS pour la Rougeole
  
- Laboratoire National de Référence des Mycobactéries
- Laboratoire Central de la Bilharziose
- Laboratoire National de Référence pour la Rage
- Laboratoire Central de la Peste
- Laboratoire de Référence National d'Analyse des Eaux dans les Industries Agro-alimentaires et de Contrôle des Denrées Animales ou d'Origine Animale.
- Centre National de Référence pour *Vibrio cholerae*, *Salmonella* et *Shigella*

# Activités des Centres de Référence



## 1- Centre Collaborateur OMS pour la Peste

### 1.1 Surveillance de la peste humaine

#### • Données de laboratoire et situation épidémiologique

IPM: *M Ratsitorahina, C Raharimanana, V Andrianaivoarimanana, M Rajerison, V Richard, L Rahalison*

Laboratoire Central de la Peste: *M Ratsimba, N Randriananja, L R alafiarisoa*

Ministère de la Santé et du Planning Familial: *DULMT/SLME/ Div Peste - SSD foyers de peste*

Le LCP, laboratoire du Ministère de la Santé malgache et laboratoire référent pour la peste à Madagascar est situé à l'IPM. Il fonctionne sous la supervision de l'Unité Peste de cet institut. Il était financé jusque là par le gouvernement malgache via des crédits alloués par la Banque Mondiale. Ce financement s'est terminé en avril 2007.

La peste est endémique sur les hautes terres centrales malgaches. Chaque année, des cas sont notifiés avec une certaine variabilité spatio-temporelle. Une surveillance de la peste humaine est en place dans le cadre du Programme National de Lutte contre la Peste depuis 1997. Le LCP est impliqué dans cette surveillance dans le volet diagnostic biologique. Le LCP reçoit toutes les déclarations accompagnées des prélèvements venant des Formations Sanitaires (FS) pour le diagnostic biologique. Le diagnostic de routine est réalisé par les méthodes de bactériologie (culture et inoculation à la souris) et le TDRA (Test de Diagnostic Rapide de Détection d'Antigène F1).

Les données saisies et analysées dans une base de données informatisée (logiciel ACCESS), nous permettent l'analyse de la situation épidémiologique de la peste à Madagascar.

En 2007 (données du 15/2/2008), 583 cas suspects (412 en 2006) étaient déclarés au laboratoire par 31 Services de Santé District (SSD) (tableau I). Le taux de confirmation (avec isolement de souche) était de 41,8% soit 201 confirmés / 481 prélevés (40% en 2006, 31,1% en 2005), le taux de TDRA positifs était de 72.8% soit 350 positifs / 481 prélevés (62,6% en 2006, 57% en 2005). Le taux de prélèvement en 2007 était de 82,5% (vs 91,5% (377/412) en 2006 et 90% en 2005), 25/31 SSPFD déclarant des cas avaient ce taux supérieur ou égal à la moyenne nationale. Toute méthode confondue dont le

TDRA est aujourd'hui reconnu comme test de confirmation pour les pays d'endémie pesteuse comme Madagascar, on constate une amélioration progressive du taux confirmation de la peste à Madagascar. Treize SSPFD (6 en 2006) étaient particulièrement performants en terme de taux de prélèvement et taux de confirmation (supérieurs aux moyennes nationales), il s'agit d'Ambalavao, Ambositra, Ankazobe, Antananarivo Avaradrano, Antanifotsy, Antsirabe I, Bealanana, Betafo, Fenoarivo, Manjakandriana, Moramanga, Soavinandriana et Tsiroanomandidy. Les indicateurs de performance de programme sont donnés dans le tableau II.

Tableau I : Répartition des cas de peste déclarés en 2007 (arrêtée le 15/02/2008 date de réception) par Service de Santé et du Planning Familial de District et résultats au laboratoire (bactériologie et TDRA)

SSPFD	NP	Bactériologie			TDRA LCP		Total	
		C	N	X	P	N		
Ambalavao	10	32	11	15	43	15	68	
Ambatofinandrahana	3	18	8	7	23	10	36	
Ambohidratrimo		3	1	4	4	4	8	
Ambohimahasoa		2	5	4	7	4	11	
Ambositra	6	20	11	5	29	7	42	
Andilamena	21	7	11	17	18	17	56	
Anjozorobe	1	4	4	6	7	7	15	
Ankazobe		6	1	1	7	1	8	
Anosibe An'ala		1	1	1	2	1	3	
Anta-Avaradrano		6	6	2	11	3	14	
Anta-Renivohitra	1	1	6	5	4	8	13	
Antanifotsy		1	0	0	1	0	1	
Antsirabe I		1	1	0	2	0	2	
Antsirabe II	4	4	9	0	11	2	17	
Arivonimamo	6	3	5	1	6	3	15	
Bealanana	1	5	3	0	8	0	9	
Betafo		3	1	0	3	1	4	
Fandriana	6	6	7	3	13	3	22	
Faratsiho		6	7	2	10	5	15	
Fenoarivo	10	6	3	16	3		19	
Fianarantsoa I		0	4	2	3	3	6	
Fianarantsoa II		3	16	8	17	10	27	
Ikalamavony		0	3	1	3	1	4	
Mahajanga I	3	0	0	0	0	0	3	
Manandriana		13	21	3	27	10	37	
Manjakandriana	3	18	8	3	26	3	32	
Miarinarivo		3	1	2	4	2	6	
Moramanga		1	0	0	1	0	1	
Soavinandriana	1	6	4	0	9	1	11	
Tsaratana	36	11	11	4	22	4	62	
Tsiroanomandidy		7	7	2	13	3	16	
<b>Total</b>		<b>102</b>	<b>201</b>	<b>179</b>	<b>101</b>	<b>350</b>	<b>131</b>	<b>583</b>

SSPFD : Service de Santé et du Planning Familial  
 TDRA : Test de Diagnostic Rapide de détection d'antigène F1  
 NP : non prélevé X : non testé C : confirmé  
 P : positif N : négatif

Les 9 SSPFD qui ont déclaré le plus de cas en 2007 (plus de 20 cas/an chacun) étaient ceux d'Ambalavao, d'Ambatofinandrahana, d'Ambositra, d'Andilamena, de Fandriana, de Fianarantsoa II, de Manandriana, de

Manjakandriana et de Tsaratanàna. Le maximum de déclaration se trouvait dans le SSPFD d'Ambalavao (d' Ambositra en 2006).

Dix SSPFD ont déclaré en tout 30 cas de peste pulmonaire dont treize étaient positifs en bactériologie et/ou en TDRA. Il s'agit de: Ambositra, Ambalavao, Ambohidratrimo, Andilamena, Anjozorobe, Ankazobe, Faratsiho, Fenoarivo, Manjakandriana et Soavinandriana.

Sur les 13 cas de peste déclarés au SSPFD d'Antananarivo Renivohitra, tous étaient des cas suspectés de peste bubonique. Quatre cas étaient confirmés en bactériologie ou positifs en TDRA.

Trois déclarations sans prélèvement du SSPFD de Mahajanga I sont parvenues au LCP.

Tableau II : **Récapitulatif des indicateurs de programme peste de 2003 à 2007** (arrêté le 15 février 2008)

Indicateurs	2003	2004	2005	2006	2007
Nb Cas déclarés	933	1 214	421	412	583
% Cas prélevés	90,1%	96,5%	90%	91,5%	82,5%
Taux de confirmation bactériologique	38,4%	35,8%	31,13%	40%	41,8%
Taux de confirmation par TDRA	63%	63%	57%	62,6%	72,8%
% de peste pulmonaire cas déclarés (% forme pulmonaire cas confirmés)	5,8% (4,2%)	10,3% (2,8%)	10,1% (3,6%)	2,5% (3,3%)	5,4% (2,9%)
Létalité globale (Létalité parmi les cas confirmés)	11,8% (19,9%)	8,1% (14,8%)	8,3% (24%)	12,4% (16,5%)	12,1% (16,4%)
Nb SSPFD déclarants	32	34	27	32	31

SSPFD : Service de Santé du District TDRA : Test de Diagnostic Rapide  
% : Pourcentage

## Discussions

Si une tendance générale à la baisse du nombre de cas déclarés et confirmés de peste à Madagascar a été observée en 2005 et 2006, 2007 a vu une augmentation de 41,5% du nombre de déclarations. Le taux de confirmation biologique continue de s'améliorer. La létalité due à la peste avec certitude n'est pas descendue en dessous des 10%, objectif du Programme National.

Toutes ces observations argumentent toujours aujourd'hui l'absolue nécessité d'évaluer le programme à travers divers indicateurs de performance tels l'exhaustivité des déclarations, l'efficacité des prises en charge et ripostes (couverture en médicaments, insecticides, tests de diagnostic rapide), les facteurs de risques liés à la létalité, les formes cliniques... Une telle évaluation permettrait en partie d'expliquer la tendance épidémiologique observée les dernières années et de dégager d'autres pistes éventuelles d'explication.

Par ailleurs, depuis l'utilisation en routine dans les centres de santé des tests rapides, le taux de confirmation n'a cessé de s'améliorer. L'impact de l'apport de ces tests mérite également d'être évalué.

## • Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Y. pestis* isolées à Madagascar

IPM : *C Raharimanana, V Andrianaivoarimanana, M Rajerison, L Rahalison*

Laboratoire Central de la Peste : *M Ratsimba, N Randriananja, L Ralafiarisoa*

Ministère de la Santé et du Planning Familial : *DULMT/SLME/ Div Peste - SSD foyers de peste*

La surveillance régulière de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Y. pestis* isolées à Madagascar revêt d'un caractère primordial afin de détecter sans tarder l'éventuelle apparition de circulation de souches résistantes.

Pour le diagnostic de routine de la peste, les prélèvements passés en bactériologie au LCP en vue d'un isolement de *Y. pestis* sont :

- des broyats de puces et de rates des rats dans le cadre de la surveillance de la peste murine

- des prélèvements de cas suspects vivants envoyés par les Formations Sanitaires FS (bubon et/ou crachat) et post-mortem (foie et poumon droit, gauche).

Deux cent vingt trois (223) souches de *Y. pestis* dont 20 issues de puces, 2 issues de rate des rats et 201 issues de prélèvements humains ont été isolées au Laboratoire Central de la Peste en 2007. Parmi les souches humaines, 186 provenaient de pus de bubon, 2 de crachats et 13 de prélèvements post mortem.

La sensibilité de ces souches à 6 antibiotiques recommandés pour le traitement de la peste (streptomycine, gentamycine, sulfamides (sulfaméthoxazole-triméthoprime), tétracycline, ampicilline et chloramphénicol) a été testée. Toutes les souches étaient sensibles à ces antibiotiques.

La biothèque de l'unité peste est aujourd'hui riche de près de 5 400 souches de *Y. pestis* provenant d'humains, de réservoirs et de vecteurs.

### 1.2 Investigation d'épidémie

IPM : *M Ratsitorahina, C Raharimanana, V Andrianaivoarimanana, M Rajerison, L Rahalison, V Richard*

Laboratoire Central de la Peste : *M Ratsimba, N Randriananja, L Ralafiarisoa*

Ministère de la Santé et du Planning Familial : *DULMT/SLME/ Div Peste - SSD foyers de peste*

Lorsque des situations particulières ou inhabituelles surviennent (bouffée épidémique, recrudescence, mortalité importante, peste pulmonaire, nouveau foyer...), nous pouvons être amené à mener des investigations complètes, et ce en fonction également des moyens disponibles.

Au cours de la dernière quinzaine du mois d'août 2007, le Centre Hospitalier de District d'Andilamena

a déclaré 4 cas humains suspects de peste bubonique, confirmés localement par bandelettes. Ces cas étaient survenus entre le 22 et le 29 août 2007. Il n'existait pas de notion de mortalité humaine liée à cet épisode pesteux. Tous les cas avaient un point commun : ils travaillaient tous dans les carrières d'extraction de pierres précieuses d'Andrebabe où ils avaient débuté leur maladie.

Compte-tenu du fait qu'il s'agissait de cas humains de peste :

- apparus dans un district qui en avait déclaré très peu les 5 années précédentes, dans un foyer méconnu qui n'a jamais fait l'objet d'investigations,

- ayant une activité identique (exploitants miniers), une mission, ayant pour objectifs de (1) décrire la dynamique de cette épidémie de peste et identifier les facteurs de risque associés et (2) déterminer les indicateurs de circulation de la peste au sein de la population animale et du risque de transmission de la maladie à l'homme dans le contexte qui prévaut, a été menée par une équipe mixte épidémiologiste-laboratoire. Le rapport final a été établi par les épidémiologistes et remis aux personnes idoines.

**En conclusion**, il s'agissait d'une épidémie survenue dans une communauté humaine occupant une zone forestière en contact direct et permanent avec la population murine.

Les indicateurs peste au niveau des rats et puces étaient en faveur du risque épidémique toujours présent. La vigilance et l'intérêt de mener la surveillance murine (densité et modification de la dynamique, mortalité) étaient recommandés. En effet, il faut donc s'attendre à voir resurgir ce type d'épidémie dans la région en question car il semble difficile d'en modifier l'écosystème. Par ailleurs, le risque de diffusion de la peste à partir de zones comme Andrebabe avec une population cosmopolite doit être envisagée. Tout médecin de Madagascar quelle que soit la zone dans laquelle il exerce doit savoir évoquer ce diagnostic devant une fièvre avec bubon ou signes respiratoires sévères chez une personne revenant d'une zone où le risque de peste est connu.

### **1.3 Activités du Centre Collaborateur OMS Peste**

L'Unité peste a reconduit son mandat de Centre Collaborateur OMS pour la peste en avril 2004 pour 4 ans. A ce titre, elle assure des services intéressants les programmes de l'OMS d'intérêt régional et mondial.

#### **• Mission**

IPM : *Unités Peste, Epidémiologie, Entomologie*

Collaboration internationale :

OMS Genève : *E Bertherat*

Mission terrain à Madagascar: à l'occasion de la visite du référent peste au WHO/HQ//HSE/EPR Genève, nous avons effectué une mission du 6 au 10 décembre 2007 dans le district d'Ambalavao où une recrudescence de cas de peste a été observée. La mission avait pour objectif d'enquêter sur cette recrudescence et de faire une supervision de l'utilisation des tests rapides.

#### **• Programme EQA**

IPM : *M Rajerison, C Raharimanana, N Randriananja, L Rahalison*

OMS Genève : *E Bertherat*

OMS Lyon : *S Cognat*

National Health Laboratory Service (NHLS) : *L Arntzen*

Un programme d'évaluation d'assurance qualité a été mis en place par l'OMS avec le NHLS Afrique du Sud depuis 2002, à l'attention des laboratoires africains qui font le diagnostic de la peste. Ce programme voit la participation de 72 laboratoires de 45 pays africains. Dans le cadre de ce programme, l'Unité Peste est laboratoire référent. Un échantillon par trimestre était analysé (100% de conformité des résultats). Une réunion de restitution des résultats de ce programme, avec la participation de l'Unité Peste, s'est tenue à Johannesburg en Septembre 2007.

#### **• Appui à d'autres pays**

##### **- République Démocratique du Congo (RDC) :**

IPM : *Unité Peste*

Collaboration internationale :

Malteser International : *D Rakotoarison, A Kinzelbach*

Laboratoire de référence du District de l'Ituri, Bunia,

RDC : *JC Shako*

OMS Genève : *E Bertherat*

La RDC est un des foyers de peste les plus actifs au monde. Des ré-émergences et recrudescences ont été observées les dernières années, notamment dans la Province Orientale. Le Centre Collaborateur OMS Peste a toujours apporté son soutien à la RDC : en 2005 lors d'une épidémie dans le camp minier de Zobia, en 2006 en collaborations avec les équipes sanitaires locales et ONG lors d'épidémies dans l'Ituri et dans le Haut-Uélé.

L'objectif est de continuer à appuyer la RDC en matière de diagnostic biologique de confirmation de la peste et ce dans le cadre d'un programme de validation de l'utilisation des TDRA.



En 2007, un protocole appuyé financièrement par Malteser International a permis de mettre en place un programme de renforcement des équipes sanitaires locales en matière de diagnostic de la peste. Pour cela, des TDRA ont été pré-positionnées pour être utilisées en cas d'alerte. Les travaux en RDC sont effectués sous la coordination de Malteser International avec la collaboration du Laboratoire de référence du District de l'Ituri. Le protocole prévoit une confirmation par culture par ce dernier laboratoire avec l'aide éventuelle de l'Unité Peste de l'IPM.

#### - Algérie

En 2007, nous avons été sollicités par les référents peste en Algérie (Oran) pour valider leur test sérologique par ELISA. Des sérums contrôle, des tests rapides ont été fournis. Par ailleurs, nous avons testé en double aveugle quelques uns de leurs échantillons.



## 2- Laboratoire National OMS pour la Poliomyélite

R Razafindratsimandresy, S Rabemanantsoa, NS Andriamamonjy

Le laboratoire pour la poliomyélite de l'Institut Pasteur de Madagascar est un Centre de Référence Inter-Pays qui assure le diagnostic d'infection par les poliovirus des cas de paralysies flasques aiguës (PFA) détectées à Maurice, aux Seychelles, aux Comores et à Madagascar. En 2007, le laboratoire a analysé 386 échantillons de selles issus de 194 cas de PFA : 2 cas (4 selles) aux Comores, 183 cas dont 2 sans 2ème prélèvement (364 selles) à Madagascar et 9 cas (18 selles) à l'île Maurice. Les prélèvements en provenance de Comores et de Maurice sont tous conformes (2 selles par cas et collectés entre les 14 jours après le début de la maladie). Aucune selle de l'île Maurice ou des Comores n'a été trouvée positive. A Madagascar, 2 cas de PFA ont été trouvés infectés par un poliovirus : 1 cas dans le district de Tsiroanomandidy (Antananarivo) et 1 cas dans le district de Fenoarivo-Est (Toamasina). Six poliovirus de type vaccinal ont été isolés des selles de ces cas : 2 poliovirus Sabin 2 et 2 poliovirus Sabin 3 (mélange) pour le cas de Tsiroanomandidy, et 2 poliovirus Sabin 1 pour le cas de Fenoarivo-Est (tableau). La technique de différenciation intra-typique par RT-PCR-RFLP appliquée à ces isolats a montré qu'il s'agissait de poliovirus vaccinal. Ces isolats envoyés au Laboratoire Régional en Afrique du Sud (National Institute for Communicable Diseases, Johannesburg) ont confirmé nos résultats de typage par RT-PCR spécifique et ELISA.

L'isolement de poliovirus dans ces échantillons cliniques a été fait avec le nouvel algorithme (délai de résultat de 14 jours mais tolérance encore à 28 jours en 2007). Il a été mis en place au laboratoire à partir de février 2007. Ce nouvel algorithme préconise de n'identifier que les virus isolés sur cellules L20B (cellules murines exprimant le récepteur spécifique du poliovirus CD155) mais après avoir augmenté le titre viral par un passage sur cellules RD (lignées continues de rhabdomyosarcome humain sensibles à tous les entérovirus). Pour définir le sérotype et l'origine vaccinale, dérivée du vaccin (VDPV) ou sauvage du poliovirus, notre laboratoire a mis en place en 2007, suite à une formation organisée par l'OMS à Entebbe Ouganda, les 2 méthodes de différenciation intratypique préconisée par l'OMS (RT-PCR et ELISA). Ces deux méthodes sont venues compléter celle utilisée auparavant par le laboratoire (RT-PCR RFLP). Au final, le délai de résultat depuis la tentative d'isolement jusqu'à la différenciation intratypique du poliovirus est ramené de 42 jours à 21 jours.

Le tableau montre l'évolution des critères de performance de la surveillance et du laboratoire à Madagascar ces 4 dernières années. Le seuil de détection des cas de PFA en 2007 dépasse le niveau requis. Dans l'ensemble, les critères ont été respectés, mis à part la faible proportion d'échantillons de selles (54%) qui arrivent dans le laboratoire dans les 3 jours requis traduisant les difficultés d'acheminement des prélèvements vers le laboratoire. Parmi les cas de PFA, le taux d'isolement d'entérovirus non poliovirus est faible (7%) par rapport à l'année 2006. Par ailleurs, les cas détectés ne sont pas représentatifs de tout le territoire car seulement 72 districts (65%) sur les 111 ont signalé au moins un cas (figure).

Tableau : Critères de performance du laboratoire et de la surveillance des PFA à Madagascar (2004-2007)

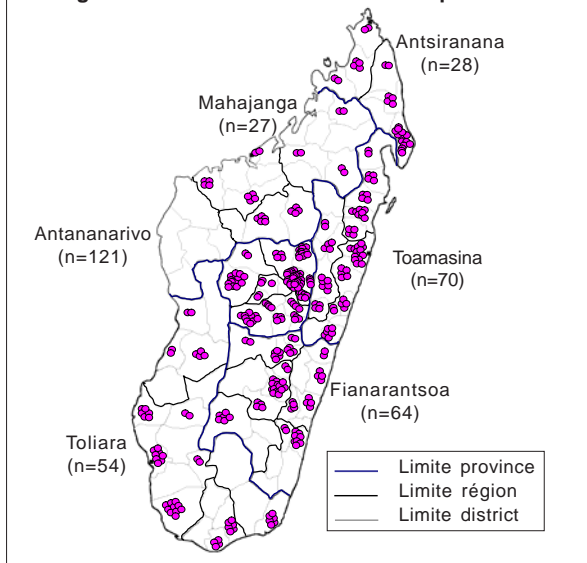
Critères	Performance attendue	2004	2005	2006	2007
Nbre de cas de PFA	80	117	173	176	183
Nbre d'échantillons analysés	160 (80x2)	233	352	351	364
Echantillons adéquats	≥ 90%	86%	87%	93%	92%
Réception au labo ≤ 3 j	≥ 90%	71%	63%	60%	51%
Bonnes conditions	≥ 90%	98%	97%	94%	96%
Rendu des résultats ≤ 28 j	≥ 90%	100%	100%	100%	100%
Entérovirus non polio isolés	10%	17%	8%	10%	7%
Poliovirus isolés	-	0	16**	2*	6
Envoi des souches de polio-virus ≤ 7 j vers le labo régional	≥ 90%	-	100%	100%	100%
Résultat "Proficiency test"	≥ 90%	100%	95%	100%	100%

\* Les 16 souches de poliovirus ont été isolées à partir de 10 cas de PFA dont 5 cas associés à des VDPV de type 2 et 3. Les 5 autres cas ont probablement été infectés par le VPO issu des campagnes de vaccination avant ou au décours de la paralysie. Au total, 7 PV2, 1 recombinant PV2+ENPV, 3 PV1, 2 mélanges PV1+PV2, et 3 PV3 ont été isolés

\*\* Les 2 souches de poliovirus ont été isolées à partir de 2 cas de PFA du district d'Ankazoabo (Toliara) et d'Ikalamavony (Fianarantsoa). Il s'agit de poliovirus vaccinal Sabin 2



Figure : Carte de répartition des 364 prélèvements des selles (183 cas de PFA) détectés en 2007 à Madagascar et leur distribution dans les 6 provinces



### 3- Laboratoire National de Référence OMS pour la Rougeole

R Razafindratsimandresy, Randriamanantena AH

La surveillance nationale des cas suspects de rougeole à Madagascar a démarré après les campagnes de vaccination de masse organisées en septembre et octobre 2004. Dans le cadre de cette surveillance, le laboratoire est chargé du diagnostic sérologique de la rougeole chez les patients suspects prélevés par les centres de soin. Une nouvelle campagne de vaccination a été organisée au niveau national en octobre 2007. Cette dernière a eu pour cible les enfants de 9 à 59 mois.

En 2007, le laboratoire a reçu 178 échantillons de sérums (177 cas suspects dont 1 cas ayant 2 prélèvements), soit une diminution du nombre de cas suspects de 16% par rapport à 2006 (211 cas suspects de rougeole prélevés). L'adéquation de l'échantillon de sérum à la réception (température entre 0 et 8°C) est de 97% mais la performance en matière de réception de l'échantillon dans les 3 jours qui suivent le prélèvement est encore loin d'être atteinte (tableau). L'âge moyen des patients était de 7,1 ans (0 à 44 ans) avec un écart-type de 6,4 ans et le sex-ratio (M : F) de 0,7. Cent trois des 177 patients (58,19%) avait des antécédents de vaccination contre la rougeole. Quarante prélèvements ont été collectés dans les 3 jours qui suivent l'éruption et 133 dans les 4 à 28 jours. Le moment de prélèvement par rapport à la date de début de l'éruption n'est pas connu pour 5 cas. La figure 1 indique la répartition spatiale des 178 prélèvements de cas suspects de rougeole en 2007 ainsi que le nombre des cas par

province. Cette répartition des cas n'est pas homogène car il y a encore des districts "silencieux" (comme ceux des provinces de Toamasina, Mahajanga et Toliara). Sur les 111 districts, seulement 46 ont fait au moins une déclaration de cas, soit 41%. Il faut souligner que l'absence de cas non rapporté ne signifie pas l'absence de circulation du virus de la rougeole.

Figure 1 : Répartition des 178 prélèvements de cas suspects de rougeole à Madagascar en 2007 et selon les 6 provinces

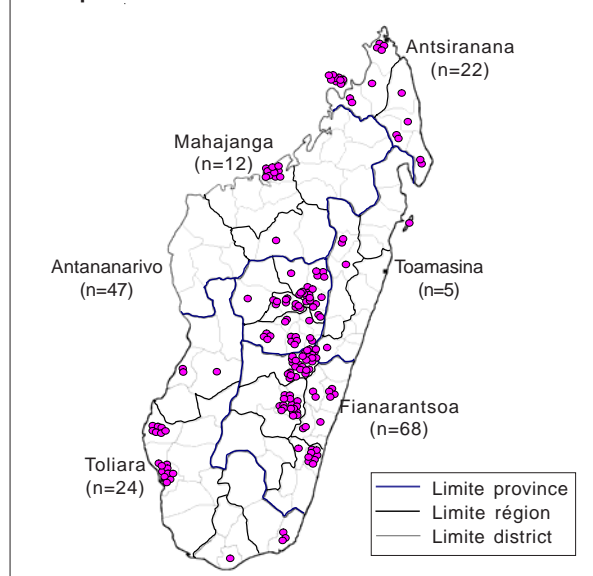


Tableau : Performance de la surveillance des cas suspects de rougeole à Madagascar en 2007

Critères	Performance attendue	2007
Nbre de cas suspects de rougeole déclaré et prélevé	358 cas attendus (2/100 000 hab)	177 cas
Echantillons adéquats (collecte ≤ 28 j suivant le début de l'éruption)	> 90%	97% (173 cas)
Réception au labo ≤ 3 j	> 90%	55%
Rendu des résultats ≤ 7 j	> 90%	100%
Bonnes conditions des échantillons	> 90%	97%
<b>Résultats IgM rougeole :</b>		
- Positif	< 10%	0%
- Négatif	-	173 (97,2%)
- Douteux	-	5 (2,89%)
<b>Résultats IgM rubéole :</b>		
- Positif	-	58 (32,68%)
- Négatif	-	112 (62,9%)
- Douteux	-	8 (4,5%)
Résultat "Proficiency test" 2007	> 90%	100%

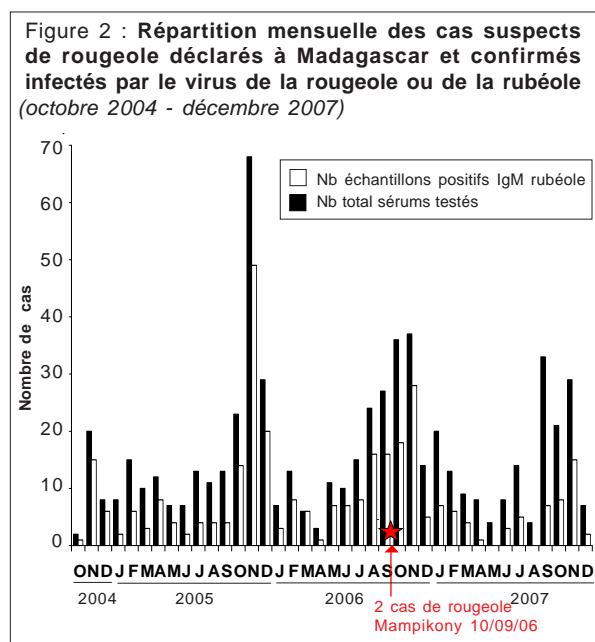
La recherche d'IgM spécifiques de la rougeole et de la rubéole dans les sérums a été effectuée par technique ELISA (kits de diagnostic Dade Behring fournis par l'OMS). Les IgM anti-rubéole ont été recherchées seulement quand la recherche d'IgM anti-rougeole a été négative.

- la recherche d'IgM anti-rougeole a été négative pour 173 échantillons. Pour ces échantillons, la recherche des IgM anti-rubéole a été positive pour 57 d'entre eux, négative pour 108 et a donné un résultat douteux pour 8.

- le résultat de la recherche d'IgM anti-rougeole a été douteux pour cinq échantillons. Ces échantillons ont été prélevés entre les 4<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jours post-éruption. La recherche des IgM anti-rubéole a été positive pour ces 5 sérums.

Il existe un risque d'obtenir des résultats faussement négatifs pour la rubéole dans 30% des cas prélevés avant le 3<sup>ème</sup> jour. Parmi les 178 prélèvements, 40 ont été collectés dans les 3 premiers jours post-éruption, 133 entre 4 et 28 jours, et pour 5 cas les dates de prélèvement ne sont pas connues. Parmi les 40 sérums recueillis précocement, le résultat de la recherche d'IgM anti-rubéole a été positif pour 12 sérums (30%), négatif pour 25 (62,5%), et douteux pour 3 (7,5%) sans qu'un sérum tardif ait pu être obtenu et analyser pour conclure de manière définitive.

Au final, plus de la moitié des cas suspects (58,8%) étaient associés à une infection récente par le virus de la rubéole indiquant la circulation active de ce virus chez les jeunes enfants (figure 2). Seulement 2 parmi les 8 échantillons ayant un résultat " douteux " pour la rubéole ont été testés une seconde fois sur le même prélèvement et non sur un prélèvement tardif et ces résultats ont été confirmés.



Deux envois d'échantillons ont été organisés le 10 octobre 2007 et le 10 janvier 2008 vers le Laboratoire Régional de Référence en Afrique du Sud (National Institute for Communicable Diseases - Serology Laboratory). Normalement, 4 envois sont prévus par an mais, malheureusement, deux seulement (Q3 et Q4) ont été effectués pour l'année 2007 suite à la mise en place

tardive du TSA (signature de l'Accord de Services Techniques entre l'OMS et l'IPM). Les résultats étaient concordants dans 94% des cas. Les discordances portent sur des résultats trouvés douteux par un laboratoire et négatifs par l'autre, extension de la surveillance à tous les districts, investigation d'épidémies); (b) l'augmentation de la couverture vaccinale de routine; (c) l'organisation de campagnes de vaccination de suivi.



#### 4- Laboratoire National de Référence OMS pour la Grippe

*JM Héraud, SF Andriamandimby, GM Razafitrimo*

La surveillance de la grippe saisonnière est une activité en place à l'Institut Pasteur de Madagascar depuis 1978. C'est en effet depuis cette date que le Laboratoire National pour la Grippe (LNG) est reconnu par l'OMS. Cette surveillance de la grippe est restée centrée sur le système sentinelle mis en place depuis plusieurs années sur Antananarivo. Elle est entièrement supportée financièrement par l'Institut Pasteur de Madagascar à l'exception du kit de réactifs permettant l'identification des virus et l'envoi de souches aux Centre Collaborateur OMS à Londres supportés par l'OMS. Dans le cadre de la surveillance de l'émergence d'une grippe pandémique due au virus A/H5N1 ou à un nouveau ré-assortant, le LNG a étendu, en collaboration avec la Direction des Urgences et de la Lutte contre les Maladies Transmissibles du Ministère de la Santé et du Planning Familial et de la Protection Sociale, son réseau de surveillance à 13 nouveaux sites sentinelles répartis sur l'ensemble du territoire malgache. Ainsi, cette surveillance a pour objectif de détecter précocement des variants viraux susceptibles d'être à l'origine d'une épidémie voire d'une pandémie, de contribuer aux choix des souches pour la composition mondiale du vaccin anti-grippal, et d'entretenir à Madagascar un savoir-faire en matière d'isolement de virus grippal utile au niveau national dans le cadre d'investigation par les équipes du Ministère de la Santé et du Planning Familial d'épidémies de syndrome respiratoire.

Cette surveillance sentinelle repose sur un système à deux composantes :

- une surveillance virologique (identification de souches circulantes)
- une surveillance syndromique (indicateur épidémique).

## 4.1 Méthodologie

### • Surveillance virologique

Les 6 centres sentinelles bénévoles en 2007 sont :

- Dispensaire EKAR Alasora
- Centre Médico-Social de l'Ambassade de France, Isoraka

- Dispensaire adventiste, Manjakaray
- Dispensaire EKAR Anosisoa
- Dispensaire des Sœurs Carmélites Ilanivato
- Dispensaire EKAR Analamahitsy

Des prélèvements oro-nasaux sont effectués chez les patients consultant un des cinq centres et présentant une fièvre d'apparition brutale évoluant depuis moins de cinq jours avec toux et maux de gorge. Chaque prélèvement est placé dans un cryotube contenant du milieu de transport viral puis est conservé à +4°C dans les centres. Ces cryotubes sont récoltés deux fois par semaine par l'Institut Pasteur de Madagascar afin de tenter d'isoler des virus grippaux à partir des prélèvements. Des prélèvements peuvent être reçus également dans le cadre de diagnostic individuel. Les tentatives d'isolement se font sur cellules de rein de chien Madin-Darby (MDCK) selon la technique OMS (WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev.1). Les résultats individuels sont communiqués une fois par semaine aux médecins participants au réseau et un bilan synthétique hebdomadaire est communiqué au Ministère de la Santé et sur le site Web Flunet de l'OMS. Les isolats viraux obtenus sont envoyés au moins deux fois par an au Centre Collaborateur OMS à Londres pour une caractérisation plus fine des sous-types isolés dans notre laboratoire. Celle-ci permet de suivre la dérive génétique et antigénique des souches circulantes en vue d'adapter le choix des souches composant le vaccin anti-grippal.

### • Surveillance syndromique

Sur Antananarivo, elle consiste en un relevé hebdomadaire de la fréquence des syndromes grippaux parmi les consultants du centre de santé de l'OSTIE Behoririka. Ce centre reçoit par semaine plusieurs milliers de consultants issus de l'agglomération d'Antananarivo et permet d'avoir une indication sur l'activité épidémique des syndromes grippaux. L'activité grippale est considérée comme épidémique quand la fréquence des syndromes grippaux parmi les consultants du centre de santé de l'OSTIE à Antananarivo dépasse les 20%.

Une surveillance clinique a aussi été mise en place sur 13 sites, dans le cadre du réseau de surveillance des fièvres. Ces 13 sites sont :

- CSB2 Urbain à Tsiroanomandidy
- CSB2 Urbain I à Maevatanana
- CSB2 Urbain Mahabibo à Mahajanga

- CSB2 à Morondava
- Centre de Santé Materno-Infantile (CSMI) à Moramanga

- Dispensaire Urbain Tanambao I à Toamasina
- Dispensaire SALFA annexe à Taolagnaro
- CSB2 Tanambao à Antsiranana
- CSB2 Tanambao I à Toliara
- CSB2 Urbain à Antsohihy
- CSB2 Urbain à Farafangana
- CSB2 Ankily à Ihosy
- Dispensaire Salfa à Ejeda

### • Résultats

Le volume d'activité du laboratoire lié à la surveillance de la grippe sur Antananarivo a baissé en 2007 de 28% par rapport à l'an dernier avec 491 prélèvements reçus contre 685 en 2006 (tableau I). Ceci s'explique par l'absence de réelle épidémie de grippe en 2007 bien que deux périodes d'activités accrues aient pu être observées. De plus nous avons imposé pour les prélèvements des critères d'inclusions plus spécifiques. Ces nouveaux critères nous ont permis de gagner en spécificité puisque sur l'ensemble de l'année nous confirmons 36% des cas suspects et depuis le 01/10/2007 (date de mise en place effective des critères d'inclusions), nous sommes passés à près de 60% de confirmation des cas. Nous observons une grande disparité dans le nombre de prélèvements provenant des différents centres. Aussi, compte tenu de l'extension de notre surveillance syndromique sur le territoire malgache, nous pensons remplacer dans notre surveillance virologique 2 centres sentinelles par l'OSTIE Behoririka, qui est favorable à une participation active à la surveillance virologique et qui participe déjà à la surveillance syndromique. L'analyse des cas confirmés, indique un ratio Homme/Femme de 0,83 et une répartition en fonction de l'âge des cas confirmés montre une prédominance des enfants âgés de moins de 5 ans (tableau II). Cependant il existe sans doute un biais dans le recrutement des sujets puisque les centres sentinelles se situent au sein d'enceintes scolaires confessionnelles.

Tableau I : Volume d'activités du Laboratoire National OMS pour la grippe en 2007 sur Antananarivo

Centres sentinelles	Cas suspects (%)	Cas confirmés (%)	% d'isolats
Disp. Alasora	95 (20)	39 (41)	22
Disp. Anosivavaka	42 (9)	13 (31)	7
Disp Ilanivato	115 (23)	49 (43)	29
Disp. Manjakaray	105 (21)	32 (30)	18
CMS Isoraka	119 (24)	39 (33)	22
IPM	15 (3)	4 (27)	2
<b>Total</b>	<b>491 (100)</b>	<b>176 (36)</b>	<b>100</b>

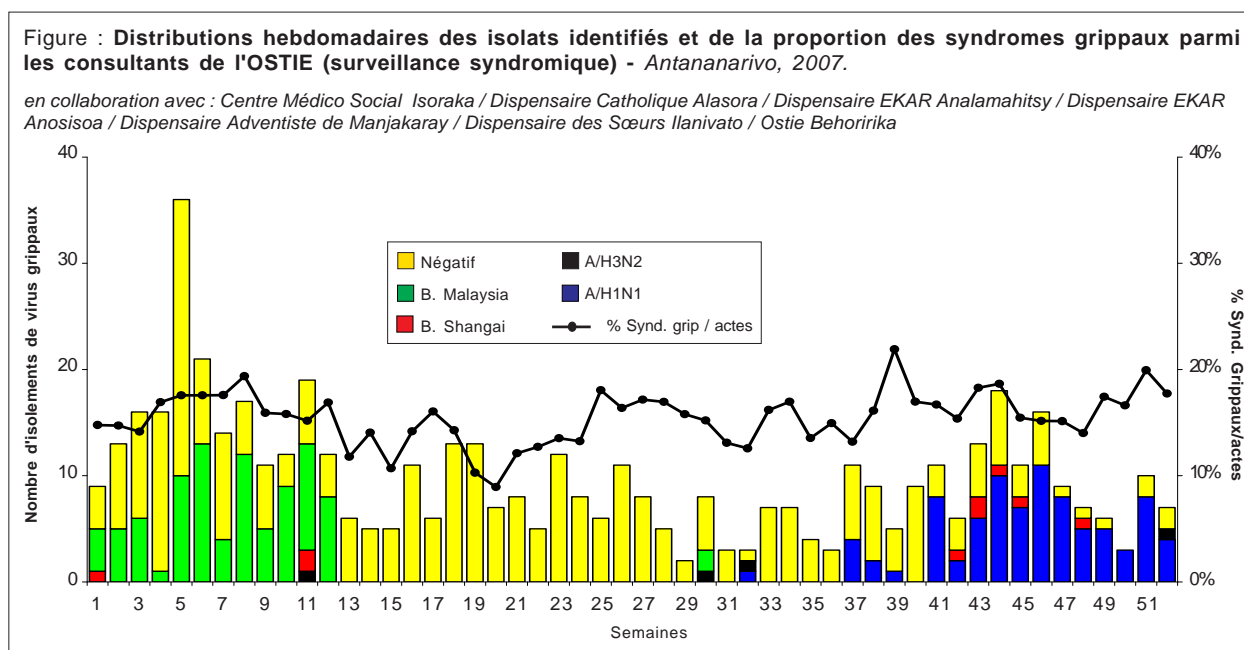
Tableau II : Répartition par tranche d'âge des cas confirmés d'infection grippal

Tranche d'âge	Nb cas suspects	(%)
0-4	74	43,3%
5-9	25	14,6%
10-14	8	4,7%
15-20	16	9,4%
>20	48	28,1%
<b>Total</b>	<b>171</b>	<b>36%</b>

L'an dernier, un pic de syndromes grippaux a été détecté au cours de la semaine 8 (mi-février) avec une valeur de 19% proche du seuil épidémique (figure). Cette épidémie est due au virus B/Malaysia. Un second pic (18%) a été observé à la semaine 25 (fin juin) mais qui ne correspond à aucun isolement de virus grippal. Enfin, à

la semaine 39 (dernière semaine de septembre) nous observons un troisième pic avec une valeur de 22%. Ce dernier pic est le précurseur d'une période épidémique à domaine A/H1N1, et qui va se prolonger jusqu'à la fin du mois de février 2008.

Sur l'ensemble de l'année 2007, nous constatons une fois de plus deux périodes d'activités accrues du virus de la grippe saisonnière. La première s'étend du mois de janvier au mois d'avril avec une majorité de virus de type B/Malaysia et une seconde période s'étendant de début septembre à la fin du mois de décembre 2007 avec essentiellement des virus de type A/H1N1 isolés. Au total, 176 isolats ont été obtenus : 89 B/Malaysia, 85 A/H1N1, 9 B/Shangai et 2 A/H3N2.



Deux envois concernant 167 souches ont été organisés sous carboglace vers le Centre Collaborateur OMS de Londres (National Institute for Medical Research) en juillet et décembre 2007. 144 souches ont pu être réisolées et caractérisées (77 B/lignée Victoria, 5 B/lignée Yamagata, 60 A/H1N1 et 2 A/H3N2). Le pourcentage de réisolement est en progrès constant et nous avons atteint 90% sur les derniers envois d'isolats (67/74). Cela confirme ainsi que les souches sont correctement conservées dans notre laboratoire. L'analyse antigénique des différents isolats par les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) a donné les résultats suivants :

- sur 60 isolats H1N1 à Madagascar, 8 sont analogues sur le plan antigénique au virus A/New Caledonia/20/99 et aux virus récents de références A/Thessalonika/24/05 et A/St. Petersburg/10/07. Cependant la majorité des isolats sont antigéniquement proches du virus A/

Solomon Island/3/06 qui est la souche vaccinale composant le vaccin de l'hémisphère Sud pour l'hiver austral 2008. On observe qu'un certain nombre de ces isolats donne des titres IHA faibles et semble plus proche de la souche de référence A/Netherlands/345/07. L'analyse des séquences HA et NA des récents isolats (05/12/2007) A/Madagascar/2323/07 montre qu'ils appartiennent au clade 2B comme la majorité des virus H1 isolés de par le monde. Enfin le pyroséquençage de tous les isolats malgaches a pu montrer qu'aucune de ces souches ne possédait la mutation H274Y de résistance à l'oseltamivir.

- Les 2 isolats H3N2 isolés à Madagascar sont analogues sur le plan antigénique au virus A/Wisconsin/67/05. Le séquençage de HA de ces 2 virus a montré qu'ils étaient proches de la souche A/California/7/04.

- Les 77 isolats B de la lignée Victoria (Malaysia) malgaches sont analogues sur le plan antigénique aux



virus de références B/Hong Kong/45/05 et B/Victoria/304/06. L'analyse des séquences HA des souches isolées au cours de 2007 indique qu'il n'y a pas eu de glissement (drift) antigénique significatif entre les récents isolats et les virus précédemment isolés (B/Malaysia/2506/04 ou encore B/Madagascar/2828/06 et /Madagascar/2828/06).

- Les 5 virus B de la lignée Yamagata (Shanghai) sont très proches sur le plan antigénique des virus B/Florida/7/06 et B/Egypt/144/05. Les séquences HA des derniers isolats sont identiques et proche de la souche B/Egypt/144/05.

#### • Investigations épidémiologiques

La mise en place des sites sentinelles sur d'autres villes de Madagascar, nous a permis de détecter des augmentations du nombre de suspicion de grippe et de déclencher des alertes. C'est ainsi qu'entre septembre et décembre 2007, nous avons déclenché et répondu à 3 alertes syndromiques provenant des sites d'Antsiranana, Tsiroanomandidy et Farafangana. Dans le 1<sup>er</sup> cas, nous avons reçu des prélèvements à analyser alors que dans le 2 autres cas, nous avons conduit une investigation épidémiologique en collaboration avec l'unité d'Epidémiologie de l'IPM et le SLMER (Service de Lutte contre le Maladie Emergentes et Ré-émergentes du Ministère de la Santé, du Planning familial et de la Protection Sociale).

Tableau III : Résultats des investigations épidémiologiques sur 3 sites sentinelles

Centres Sentinelles	% de Syndrome grippal (semaine)	Prélèvements reçus	Cas confirmés (%)	Virus isolés
CSB2 Antsiranana	17 (40)	5	1 (20)	1 B/Shanghai
CSB2 Tsiroanomandidy	49 (42)	12	8 (67)	8 H1
CSB2 Farafangana	70 (51)	6	5 (83)	4 H1, 1 H3
<b>Total</b>		<b>23</b>	<b>14 (61)</b>	<b>12 H1, 1 H3, 1 B/Shanghai</b>

Excepté l'investigation de l'alerte Antsiranana, dont nous pensons que les prélèvements ont été mal réalisés ou mal conservés, nous avons pu confirmer pour les 2 autres alertes que l'augmentation de cas suspect de grippe était bien le reflet d'une activité locale d'un virus grippal. De plus, nous avons pu constater que le virus A/H1N1 était majoritaire parmi les isolats reçus et qu'il circule sur l'ensemble du territoire malgache.

#### • Conclusion

L'activité grippale a été d'une moindre importance comparée aux années précédentes. Nous avons tout de

même pu observer une fois de plus 2 périodes de circulation du virus grippal saisonnier. La première période correspond à l'été austral (janvier à avril). Par rapport à 2006, la seconde période a débuté la même semaine (37), mais le pic d'isolements positif a été atteint la semaine 46 contre 41 en 2006. De même, en 2007, la saison grippale qui a débuté à la fin de l'hiver austral s'est étendue sur une plus longue période (15 semaines contre 9 semaines en 2006) et a continué durant les 4 premières semaines de l'année 2008. La mise en place de sites sentinelles dans d'autres villes du pays dans le cadre de la surveillance des arboviroses nous a permis également de surveiller les syndromes grippaux et de lancer des alertes. Le LNG a également fait l'objet d'un audit interne portant sur l'ensemble de la procédure de surveillance de laboratoire de la grippe. Il est à noter que les souches isolées récemment sont très proches sur le plan antigénique des souches isolées dans de nombreuses régions du monde ainsi que de celles recommandées pour la composition du vaccin.

Dans le cadre de la réponse à une potentielle pandémie de grippe aviaire due au sous-type A/H5N1, et suite à la nomination en mars 2006, par l'OMS, du laboratoire comme Laboratoire Régional pour le Diagnostic de la Grippe Aviaire de la Région OMS-AFRO, le laboratoire a participé à 2 contrôles externes de qualité. Lors du premier contrôle réalisé en mars 2007, 2/6 échantillons H5 n'avaient pu être détectés (67% de spécificité). Après optimisation des conditions (nouveau programme et nouvelles amorces), nous avons pu détecter lors du second contrôle la totalité des échantillons H5 (8/8). Enfin nous avons participé au diagnostic d'une suspicion d'infection H5 chez un groupe de moineaux (10) décédés brutalement, ainsi qu'à l'investigation associée. Les résultats ont été négatifs pour le virus A/H5N1.

## 5- Laboratoire National de Référence des Mycobactéries (CNRM)

### 5.1 Activités de diagnostic et de supervision du CNRM

IPM : *H Ramarokoto, P Ravololonandriana, V Rasolofo Razanamparany*

PNT : *A Rakotoarisaonina*

Le Centre National de Référence des Mycobactéries (CNRM) comprend le Laboratoire National de Référence (LNR) à l'Institut d'Hygiène Sociale (IHS) et le Laboratoire des Mycobactéries de l'IPM.

### • Laboratoire des Mycobactéries de l'IHS

L'activité de dépistage de ce laboratoire est essentielle pour le PNT, car elle permet de poser le diagnostic du malade et de commencer le traitement approprié. L'objectif mondial (OMS) étant de dépister 70% des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive dans la collectivité, ce taux a été dépassé en 2007 à Madagascar puisqu'il atteint 85% sur l'ensemble du pays.

Les demandes d'examen pour recherche de BAAR proviennent essentiellement du Dispensaire antituberculeux (DAT) de l'IHS, du Service des Maladies Respiratoires du CHU de Befelatanana, de quelques centres et médecins privés en ville. En 2007, les lames provenant de 6 784 patients ont été examinées au LNR par microscopie pour la recherche de BK. Le taux de dépistage annuel ou fréquence des cas positifs parmi les cas suspects (20%) reste identique à celui des années précédentes.

Le réseau national est constitué du CNRM, de 5 laboratoires régionaux de référence (LRR) et 234 laboratoires périphériques. En 2007, 67 techniciens de laboratoire ont été formés au diagnostic microscopique de la tuberculose. Le LNR et les LRR effectuent le contrôle de qualité de tous les laboratoires du réseau. Au total, 74 laboratoires sur 240 (soit 31%) ont été contrôlés dans tout Madagascar en 2007.

### • Laboratoire des Mycobactéries de l'IPM

Le Laboratoire des Mycobactéries de l'IPM réalise les analyses pour le diagnostic de la tuberculose pour le Centre de Biologie Clinique de l'IPM (CBC), le PNT (CNRM et enquêtes) et les activités de recherche.

#### Evolution des activités de 2003 à 2007

De 2003 à 2007, le laboratoire a reçu 15 004 prélèvements dont 61,8% pour la clientèle privée du CBC, 29,5% pour le PNT (demande des médecins, enquêtes), et 8,7% pour les projets de recherche : 93,6% des échantillons étaient d'origine pulmonaire et 6,4% d'origine extrapulmonaire (figure 1). Tous les échantillons ont été analysés par la microscopie après coloration à l'auramine (figure 2).

La culture est demandée dans le cadre des cas de tuberculose de diagnostic difficile (tuberculose pulmonaire à microscopie négative, tuberculose de l'enfant, tuberculose extrapulmonaire), pour les enquêtes et les projets de recherche. De 2003 à 2007, 8 534 prélèvements ont été mis en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen (LJ), dont 32,8% pour la clientèle privée du CBC, 51,9% pour le PNT (demande des médecins, enquêtes), et 15,3% pour les projets de

recherche (figure 3). Le pic observé en 2005-2006 est dû à l'augmentation du nombre de crachats mis en culture pour l'enquête sur la résistance primaire. En 2007, 1 580 cultures ont été effectuées dont 1 346 de prélèvements pulmonaires et 234 de prélèvements extrapulmonaires. Sur 1 507 résultats disponibles, 369 (352 pulmonaires et 17 extrapulmonaires) étaient positifs (24,5%).

Figure 1 : Prélèvements biologiques reçus au laboratoire de 2003 à 2007

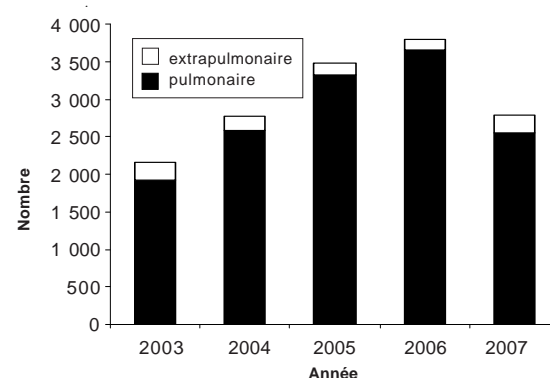
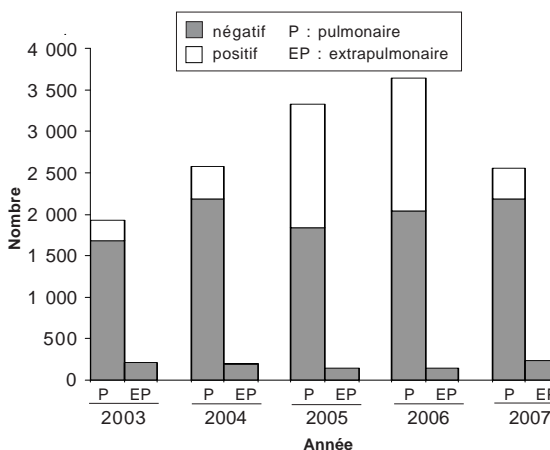


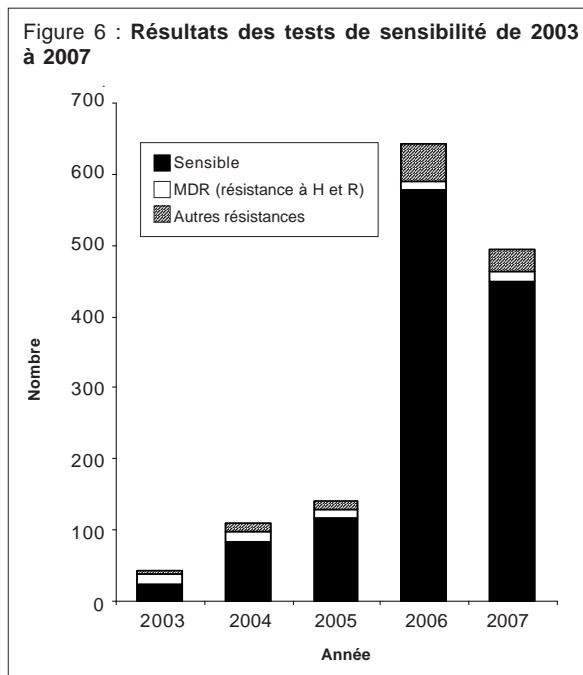
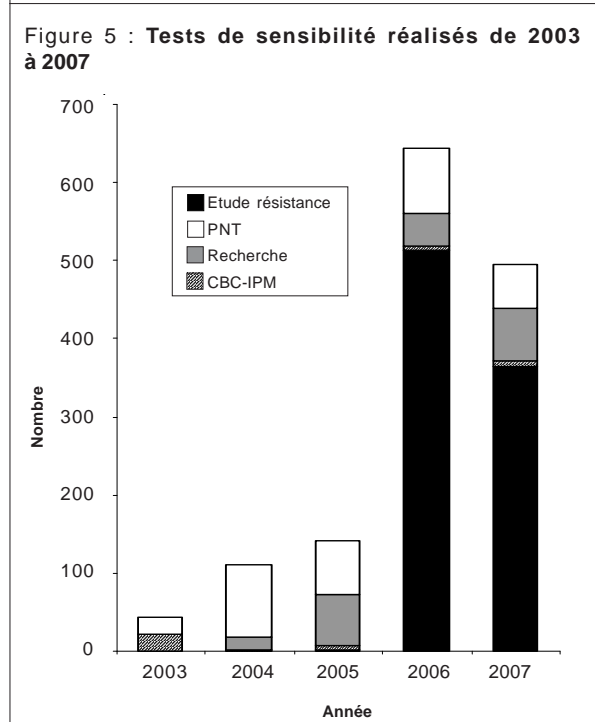
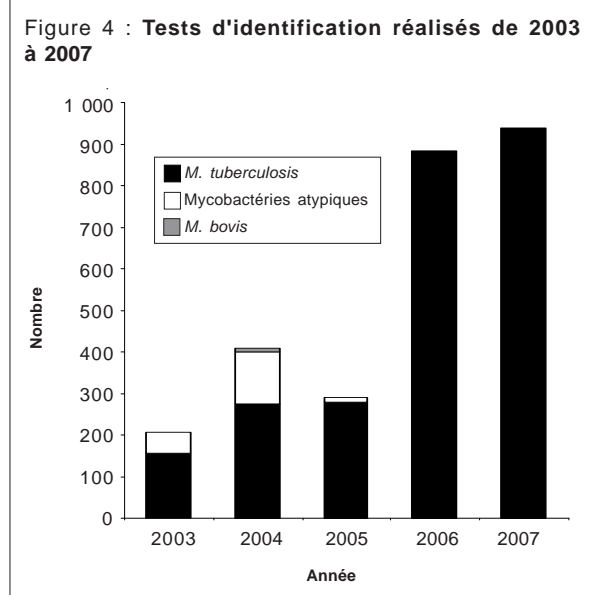
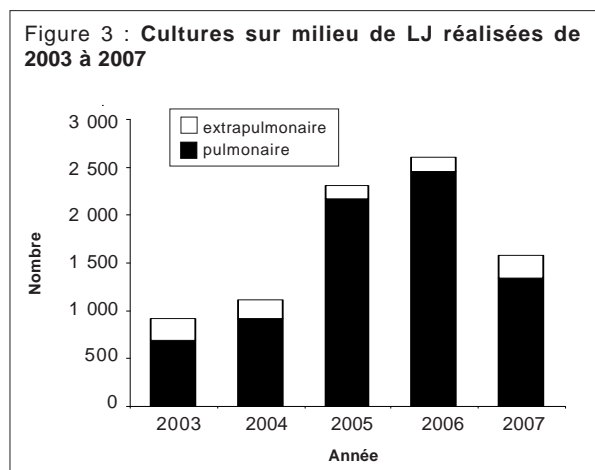
Figure 2 : Examens bacilloscopiques réalisés



Les souches de mycobactéries sont identifiées par les tests biochimiques standard. L'évolution du nombre de souches identifiées de 2003 à 2007 est donnée sur la figure 4. En 2007, 938 tests d'identification ont été faits. Toutes les souches étaient des *M. tuberculosis*.

Les antibiogrammes sont rarement demandés pour les nouveaux cas, mais essentiellement pour les cas déjà traités et les enquêtes. La sensibilité aux principaux antituberculeux (streptomycine 4µg/ml [S], isoniazide 0,2µg/ml [H], rifampicine 40µg/ml [R], éthambutol 2µg/ml [E]) est testée selon la méthode indirecte des proportions sur milieu de LJ. De 2003 à 2007, 1 434 tests de sensibilité ont été réalisés pour la clientèle du CBC, pour le compte du PNT et dans le cadre des projets de recherche de l'unité des mycobactéries (Figure 5), avec

un pic en 2006 correspondant à l'enquête nationale sur la résistance aux antituberculeux. L'évolution du nombre de souches résistantes est montrée sur la figure 6.



#### • Contrôle de qualité de la bacilloscopie

Pour assurer la fiabilité des résultats de la microscopie rendus par les deux laboratoires des mycobactéries du CNRM, un contrôle de qualité inter-laboratoire basé sur la relecture de frottis, est effectué tous les trimestres. Le taux de concordance qualitative des résultats entre les deux laboratoires était de 96,6% en 2007.

Par ailleurs, le laboratoire des mycobactéries de l'IPM effectue le contrôle de qualité de la microscopie du Laboratoire de l'Hôpital El Maarouf, pour le Programme National de Lutte contre la Tuberculose des Comores.

#### 5.2 Enquête nationale sur la résistance primaire de *M. tuberculosis*

IPM : *H Ramarokoto, P Ravololonandriana, V Rasolofo Razanamparany, JL Soares*

PNT : *B Rarivison, O Ratsirahonana, A Rakotoarisaonina*

Les enquêtes quinquennales du PNT sur la résistance primaire des souches *M. tuberculosis* permettent de surveiller la circulation de souches résistantes et en particulier des souches multirésistantes (MDR) à au moins l'isoniazide et la rifampicine dans la population. La dernière étude de surveillance des résistances (2005-2006) est une enquête nationale, avec pour objectif de définir au niveau national les taux de prévalence de la résistance primaire et des résistances acquises aux 4 antibiotiques majeurs : isoniazide (H), rifampicine (R), streptomycine (S) et éthambutol (E).

L'échantillonnage a été fait sur 205 centres de diagnostic et de traitement du pays, sur le modèle d'un



sondage en grappe de type PEV : 35 grappes de 30 patients TPM+ ont été retenus, soit 1050 nouveaux cas TPM+ à inclure de manière consécutive, pour l'étude de la résistance primaire. La résistance secondaire est évaluée sur les patients TPM+ déjà traités, inclus au cours de la même période. Les tests de sensibilité aux 4 antibiotiques S, H, R et E sont réalisés à l'IPM, sur milieu de LJ, par la méthode indirecte des proportions et par le test à la résazurine.

Au total, 1 294 patients TPM+ (1 209 nouveaux cas et 85 de cas récurrents) ont été inclus et 987 tests de sensibilité ont été réalisés. Les résultats, disponibles pour 968 patients (909 nouveaux cas, 59 cas récurrents) fin février 2008, montrent une résistance primaire globale (à au moins 1 antibiotique) de 6,4% et secondaire de 10,16%. Les taux de résistance primaire et secondaire à H sont de 3,2% et 3% respectivement. Le taux de MDR primaire est de 0,4% (4/909) et la MDR secondaire 3% (2/59). Ces résultats confirment que les taux de résistance et de MDR restent à un niveau relativement bas à Madagascar, ce qui est un atout pour la réussite du PNT.

Les résultats finaux seront obtenus à la fin du premier semestre 2008. Le contrôle de qualité externe des tests de sensibilité est réalisé par le laboratoire supranational de Londres.

## 6- Laboratoire National de Référence pour la Rage

*JM Reynes, SF Andriamandimby, GM Razafitrimo, R Rakoto Rakotomalala*

La rage à Madagascar est endémique et essentiellement de type canin. Le diagnostic de la rage est effectué dans l'unité de virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar par détection de la nucléocapside du virus rabique sur un prélèvement frais de corne d'Ammon et de bulbe de cerveaux d'animaux suspects de rage, grâce à un anticorps spécifique couplé à la fluorescéine (conjugué antinucléocapside lyophilisé et adsorbé, Bio-Rad, Marne la Coquette, France). Pour les cas trouvés négatifs par cette technique, une technique supplémentaire est utilisée : l'inoculation intracérébrale de broyat de cerveau suspect à une portée de souriceaux nouveau-nés et une surveillance de la portée pendant 21 jours. Un animal est sacrifié tous les deux jours à partir du 5<sup>ème</sup> jour post-inoculation et un diagnostic par immunofluorescence est alors effectué sur les cerveaux des animaux sacrifiés. Cette surveillance passive est entièrement supportée financièrement par l'Institut Pasteur de Madagascar. Il n'existe pas encore à Madagascar de plan national de lutte contre la rage.

Le laboratoire a reçu 78 prélèvements en 2007. Il s'agissait des cerveaux (ou têtes) de 60 chiens, 12 chats, 3 lémuriers, 1 bovin, 1 rat et 1 homme. Ils provenaient de 5 des 6 provinces : Mahajanga (3 chiens et 1 chat), Toamasina (3 chiens et 1 chat), Antsiranana (3 chiens), Fianarantsoa (1 homme), et Antananarivo (le reste des animaux). Le volume de cette activité de surveillance est en léger recul par rapport aux deux dernières années (vraisemblablement à cause de la baisse des moyens mis à la disposition des vétérinaires sanitaires pour nous faire parvenir des prélèvements). Cette activité reste encore très marginalisée et centrée sur Antananarivo faute de mise en place d'une surveillance nationale dans le cadre d'un programme de lutte contre la rage à Madagascar. Nous avons pu cependant trouver au cours de ces trois dernières années des animaux enrégés dans les 6 provinces de Madagascar.

Les résultats ont été interprétables pour tous les animaux sauf 4 chiens (le cerveau de ces animaux était putréfié). Le bovin (Antananarivo ville), les trois lémuriers (Antananarivo ville et Ambohidratrimo), et le rat (Antananarivo) ont été trouvés négatifs. Six des 12 chats étaient positifs (5 d'Antananarivo ville, 1 de Moramanga). L'homme ayant des antécédents de morsure par un "fosa" à Ihosy a été trouvé positif (la souche responsable du décès a été séquencée partiellement à l'Institut Pasteur à Paris et est très proche des souches rabiques canines de Madagascar). Trente-deux des 56 chiens avec un résultat valide ont été trouvés positifs (57% de positifs). Des chiens positifs sont retrouvés dans les quatre provinces d'où sont originaires les prélèvements.

Tableau I : Résultats de diagnostic de laboratoire de la rage pour les chiens suspects en 2007

Code postal et districts	Résultats		Total
	Négatif	Positif	
101 Antananarivo	15	13	28
102 Antananarivo-Atsimondrano	2	5	7
103 Antananarivo-Avaradrano	2	0	2
104 Ambatolampy	1	0	1
108 Ankazobe	1	3	4
111 Antsirabe II	0	2	2
112 Arivonimano	0	2	2
119 Tsiroanomandidy	0	1	1
201 Antsiranana I	0	2	2
209 Iharana	1	0	1
412 Maeavatanana	1	2	3
514 Moramanga	1	2	3
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>56</b>

Du fait de cette surveillance passive, il n'est pas possible d'avoir une idée précise de la circulation de la rage dans les 111 districts de Madagascar. Deux projets ont été soumis à des appels d'offre en 2007. Un premier

projet portant sur l'épidémiologie moléculaire de la rage et qui visait à recueillir des prélèvements de la quasi-totalité des districts a été soumis à l'appel "Biodiversité des îles de l'Océan Indien" de l'Institut Français de la Biodiversité mais il n'a pas été retenu. Un deuxième plus ambitieux portant sur la mise en place d'un programme de lutte à 5 ans de la rage à Madagascar a été soumis à la Fondation B&M Gates via l'OMS mais cet appel ouvert à moins de 10 pays a été remporté par la Tanzanie. D'autres sources de financement seront recherchées pour au moins améliorer la surveillance et acquérir des données justifiant la mise en place d'un programme de lutte contre la rage.

## 7- Laboratoire Central de la Bilharziose

*VE Ravaoalimalala, P Ravoniarimbina, AS Rafalimanantsoa, J Rahamefy*

Le Laboratoire Central Bilharziose a pour principales missions de contribuer à la mise en œuvre du programme national dans le domaine de la formation des personnels, de la diffusion de l'information et de la supervision des activités. Il collabore aussi avec les autres partenaires au développement sanitaire à travers la promotion et la mise en œuvre de la recherche opérationnelle.

L'année 2007 est à la fois une année très dure compte tenu de l'insuffisance de financement et une année de l'espoir face à l'opportunité qui se manifeste à propos de l'initiative mondiale vers une approche intégrée des maladies tropicales négligées auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé.

### 7.1 Mise en œuvre du Programme National de Lutte contre la Bilharziose

Pour l'année 2007, un petit budget de l'Etat a permis la réalisation de supervision formative dans 5 districts sanitaires endémiques en bilharziose et l'acquisition d'une quantité très limitée de médicaments pour le traitement de masse des populations des villages hyperendémiques dans 6 districts sanitaires.

#### • Supervisions formatives

Cinq districts sanitaires ont bénéficié de supervision formative : dans la région de Menabe, les districts sanitaires de Morondava, Belo sur Tsiribihina et Mahabo; dans la région d'Alaotra Mangoro, les districts sanitaires d'Anosibe an'Ala et Moramanga.

#### • Activités des districts formés

Les districts sanitaires de Marovoay, Miandrivazo, Betroka, Soavinandriana, Vatomaniry et Vavatenina ont

réalisé 27 enquêtes permettant d'identifier 22 villages hyperendémiques dont 4 à *Schistosoma haematobium* et 18 à *Schistosoma mansoni*.

Cette année 7 678 personnes ont été ciblées par le traitement de masse dans les districts sanitaires de Marovoay, Miandrivazo, Betroka, Fianarantsoa I, Soavinandriana et Vavatenina.

#### • Commentaires

Le défi du Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale est " l'accès de tous, plus particulièrement la couche la plus démunie et le milieu rural aux prestations de soins de qualité, aux programmes de prévention et de promotion de santé ". Selon l'engagement du Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale au Madagascar Action Plan (MAP) pour aider les groupes les plus vulnérables à s'intégrer à la croissance économique et à la réduction de la pauvreté, le programme national de lutte contre la bilharziose est parmi les stratégies efficaces permettant d'atteindre cet engagement. L'impact sur la communauté est la réduction de la morbidité grave due aux schistosomes en milieu rural et la guérison des malades leur permettant d'améliorer leur rendement. Grâce à la politique d'intégration de la lutte contre les maladies tropicales négligées (Bilharziose, Filarioses et autres helminthes transmissibles par le sol), le renforcement et la continuation du programme national de lutte contre la bilharziose sont à espérer.

### 7.2 Enquête parasitologique chez les cultivateurs de fraises

*Protocole d'accord de collaboration du 17 février 2004 entre le Centre Technique Horticole d'Antananarivo, le Ministère de la Santé et du Planning Familial et l'Institut Pasteur de Madagascar.*

#### • Introduction

Il s'agit de la continuation du dépistage de la bilharziose, du taeniasis et d'autres helminthes transmis par le sol chez les cultivateurs de fraises des communes de Bongatsara, de Tsiafahy et d'Ambatofahavalo.

#### • Objectifs

L'objectif global de cette activité de déparasitage étant l'élimination des parasites intestinaux, l'objectif spécifique est de prévenir la cysticercose par la lutte contre le taeniasis.

#### • Méthodologie

La sensibilisation pour cette enquête a été réalisée par les responsables du Centre Technique Horticole d'Antananarivo (CTHA), le président de l'Union

Fanavotana (association des cultivateurs de fraises) et les chefs des groupements des cultivateurs.

La récolte des prélèvements de selles a été faite dans les villages de :

- Andranonahary, Ambalabe et Ambohikely de la commune de Bongatsara,

- Ankorondrano, Ambodivary, Tsaravinany et Tsiafahy de la commune de Tsiafahy,

- Ankazobe et Faravohitra de la commune d'Ambatofahavalo

L'étalement et l'examen des préparations selon la technique de Kato ont été effectués au laboratoire.

#### • Résultats

130 personnes sur les 450 prévues ont participé à cette enquête, soit 28,88%.

74 prélèvements sont négatifs.

8 sont positifs en *Schistosoma masoni* soit 6,15%. Ils sont polyparasités, soit avec *Ascaris lumbricoïdes*, soit avec *Trichuris trichura*, soit avec ces deux parasites.

2 positifs en *Taenia spp*, soit 1,54%. Ils sont polyparasités aussi.

29 positifs en *Ascaris lumbricoïdes* (22,31%) et 23 en *Trichuris trichura* (17,69%).

Répartition des domiciles des porteurs d'œufs de *Schistosoma masoni* :

- Ambalabe, commune Bongatsara 2 cas

- Ambodivary, commune de Tsiafahy 4 cas

- Tsaravinany, commune de Tsiafahy 1 cas

- Tsiafahy, commune dudit 1 cas

Tous ces cas de schistosomiasis sont probablement autochtones. Aucune notion de déplacement en dehors de la région d'Analamanga n'a été évoquée.

32 individus seulement ont été traités pour la bilharziose, le taeniasis et les autres helminthes par praziquantel et mebendazole.

#### • Commentaires

Par rapport à leurs soucis pour la vente des fraises, la participation des cultivateurs de fraises au dépistage des parasites est très faible. Un complément de dépistage est à envisager pour les 320 individus absents. La sensibilisation est à renforcer et devrait être faite en collaboration du CTHA, du président de l'association des cultivateurs et des responsables des groupements.

A priori, c'est un nouveau foyer à surveiller et l'enquête malacologique devrait être menée.

# Autres activités de santé publique

## 1- Activité de santé publique du Groupe de Recherche sur le Paludisme

### 1.1 Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques à Madagascar et surveillance de la résistance des souches de *Plasmodium falciparum*

A Ratsimbaoa, A Randriamanantena, D Raveloariseheno, V Rabekotonirina, H Ranaivoson, DI Ralaizandriny, N Rasoarilalao, B Razanadrazanina, M Randrianariveolosia, MA Ranaivojaona, E Rakotomalala, M Jahevitra, H Andrianantenaina, S Rabearimanana, M Menard

#### Financement :

Global Fund 3<sup>ème</sup> round (objectif 4) : 380 113 US \$ (novembre 2004 à octobre 2009)

#### • Objectifs

Surveillance de l'efficacité des antipaludiques vis-à-vis de *P. falciparum* à Madagascar : approche *in vivo* et *in vitro* (phénotypique et génotypique) par :

(1) la restructuration du Réseau d'Etude de la Résistance (RER) et la mise en place de 8 sites sentinelles "représentatifs" des différents faciès épidémiologiques du paludisme à Madagascar.

(2) La création d'un réseau d'expertise, d'échange et de formation regroupant les différents interlocuteurs et institutions impliquées dans la lutte contre le paludisme à Madagascar et dans l'Océan Indien.

(3) Contribution à la mise en place d'un Centre National de Référence d'étude de la Chimiosensibilité du paludisme (CNRCP).

#### • Présentation du projet et des résultats

Localisation des 15 sites sentinelles de surveillance de la chimiosensibilité de *Plasmodium sp.*

Depuis 2007, 15 sites sentinelles sont fonctionnels et participent à la surveillance *in vitro* de la résistance des souches de *Plasmodium sp.* vis-à-vis des principaux antipaludiques recommandés par le Programme National de lutte contre le Paludisme, selon le tableau I.

Tableau I : Moyens mis en place pour la surveillance de la résistance

Molécules antipaludiques	Espèces	Phénotypage	Génotypage
<b>Chloroquine</b>	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i>	CI50% - CI90%	<i>Pfcr1</i> et <i>Pfmdr-1</i> <i>Pvcg10</i> et <i>Pvmr1</i>
<b>Amodiaquine</b>	<i>P. falciparum</i>	CI50% - CI90% Monodéthylamodiaquine	
<b>Dérivés de l'artémisinine</b>	<i>P. falciparum</i>	CI50% - CI90% Dihydroartémisinine (DHA)	<i>Pfarp6</i> Nb copie <i>Pfmdr-1</i>
<b>Quinine</b>	<i>P. falciparum</i>	CI50% - CI90%	
<b>Méfloquine</b>	<i>P. falciparum</i>	CI50% - CI90%	Nb copie <i>Pfmdr-1</i>
<b>Pyriméthamine</b>	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i>		<i>Pf-dhfr</i> <i>Pf-dhfr</i>
<b>Sulfadoxine</b>	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i>		<i>Pf-dhps</i> <i>Pf-dhps</i>

### Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la chloroquine (CQ), de l'amodiaquine (AQ), de l'association sulfadoxine/pyriméthamine (SP) et de la combinaison artésunate + amodiaquine (ASAQ) dans le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum*

L'étude visant à évaluer l'efficacité thérapeutique de la chloroquine (CQ), de l'amodiaquine (AQ), de l'association Sulfadoxine/Pyriméthamine (SP) et de la combinaison artésunate + amodiaquine (AS/AQ) dans le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* a été conduite en 2 étapes dans 8 sites sentinelles localisés dans les 4 principaux faciès épidémiologiques du paludisme à Madagascar :

- de février à juin 2006, à Ejeda et Ihosy dans le sud sub-désertique à risque épidémique, à Maevatanana et Miandrivazo sur la Côte Ouest (faciès tropical, paludisme endémique et saisonnier) et à Tsiroanomandidy et Moramanga, zone de faible transmission au niveau des marges des Hautes Terres Centrales correspondant au faciès des plateaux (altitude 900 m);

- de mars à juillet 2007, à Andapa et Farafangana sur la Côte Est de Madagascar (faciès équatorial, paludisme endémique toute l'année).

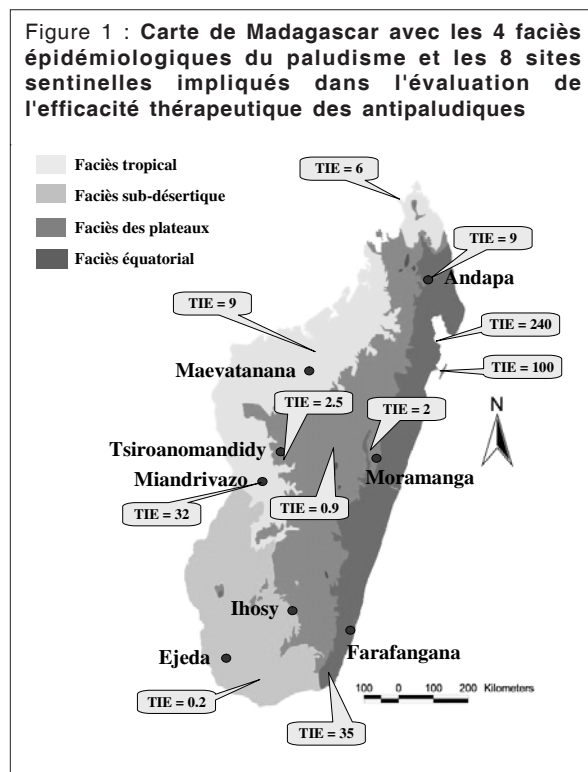
La localisation des sites ainsi que l'estimation du niveau de transmission (par le taux d'inoculation entomologique, TIE c'est-à-dire le nombre de piqûres infectantes reçues par une personne en une année) est donné dans la figure 1.

Le recrutement des patients s'est déroulé de la même façon au niveau des centres de santé de base dans les 8 sites. Tous les patients suspects de paludisme avec une température  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  et présentant un goutte épaisse (GE) positive à *Plasmodium falciparum* ont été inclus dans l'étude et ont reçu l'un des 4 traitements évalués selon le site sentinelle considéré :

- 1- la CQ, l'AQ, la SP ou l'ASAQ à Ejeda, Ihosy, Miandrivazo, Maevatanana et Moramanga;
- 2- la CQ, l'AQ ou la SP à Tsiroanomandidy;
- 3- l'AQ, la SP et l'ASAQ à Andapa et Farafangana.

Tous les patients âgés entre 6 mois et 15 ans étaient éligibles et pouvaient être inclus dans l'étude selon les critères du protocole OMS 2003 . Si le consentement écrit était signé, les sujets étaient enrôlés dans l'étude et un numéro leur était attribué. Le tirage au sort des traitements était effectué par groupe de 3 ou 4, selon le site considéré. Les traitements étaient ensuite administrés par un sujet non impliqué dans l'analyse des résultats.

tats. Les sujets recevaient soit de la CQ à la posologie de 10 mg/kg les 2 premiers jour puis 5 mg/kg le 3<sup>ème</sup> jour, soit de l'AQ à la posologie de 10 mg/kg pendant 3 jours, soit de la SP en dose unique (25 mg/kg de sulfadoxine et 1,25 mg/kg de pyriméthamine), soit de l'ASAQ à la posologie suivante, 4 mg/kg d'AS et 10 mg/kg d'AQ pendant 3 jours. Les patients étaient gardés pendant 30 minutes après la prise et la même dose était re-administrée en cas de vomissements. En cas de nouveaux vomissements, les patients étaient exclus de l'étude.



Au cours du suivi, tous les sujets étaient revus les jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28, ou un autre jour si le sujet ne se sentait pas bien. Du sang capillaire était prélevé au bout du doigt chez tous les sujets pendant les jours de suivi prévus ou imprévus. Ce sang servait à confectionner une goutte épaisse (GE)/frottis mince (FM) ainsi que des confettis sur papier buvard. Les GE/FM étaient lus au microscope à la recherche de parasites par un technicien qui ne connaissait pas le traitement reçu par le malade. Toutes les lames étaient contrôlées par un second technicien. Celui-ci ne connaissait ni le traitement reçu, ni le résultat de la 1<sup>ère</sup> lecture de la lame. Les lames présentant un résultat discordant entre les 2 techniciens étaient relues par un 3<sup>ème</sup> technicien et la règle " 2 sur 3 " était appliquée. Le taux d'hémoglobine des sujets était mesuré le jour de l'inclusion (J0) et le dernier jour de suivi avec un hémoglobinomètre portable HemoCue AB (Ängelholm, Suède).

Les réponses aux traitements étaient évaluées selon le protocole OMS 2003, à savoir en Echec thérapeutique

précoce (ETP), en Echec clinique tardif (ECT), en Echec parasitologique tardif (EPT) et en Réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA); était considéré comme Echec Thérapeutique (ET) la somme des ETP, des ECT et des EPT. Les sujets classés en ET étaient traités par la quinine à la posologie de 10 mg/kg 3 fois par jour pendant 7 jours, mais la réponse à ce traitement n'était pas évaluée.

Les sujets pouvaient être cependant exclus en cas d'utilisation d'antipaludique en dehors du protocole, en cas de présence de parasites à la GE/FM et de maladies fébriles concomitantes, en cas de rupture du consentement, en cas de perte de vu pendant le suivi, en cas de violation de protocole et en cas de décès due à une cause autre que le paludisme.

Les GE/FM étaient colorées au Giemsa à 10% pendant 10 minutes. La densité parasitaire était déterminée à partir de la GE en comptant le nombre de parasites pour 200 globules blancs (GB) ou 500 globules blancs si le nombre de parasites était inférieur à 10 pour 200 GB. Pour le calcul de la densité parasitaire (parasites/ $\mu$ l), le nombre de GB considéré était de 8 000 par  $\mu$ l. Une lame était classée comme négative si aucun parasite n'avait été vu parmi 100 premiers champs examinés. Le FM était utilisé pour détecter les infections dues aux autres espèces que *P. falciparum*.

La PCR a été utilisée pour distinguer les vrais échecs (ou recrudescences), des réinfections pour tous les sujets en échec après le 7<sup>ème</sup> jour. Le sang capillaire recueilli sur papier buvard au jour de l'inclusion, à J1 et le jour de l'échec a été utilisé pour étudier le polymorphisme des gènes *m*sp-1 (merozoïte surface protein-1) et *m*sp-2 (merozoïte surface protein-2) par PCR nichée comme précédemment décrit par Cattamanchi et collaborateurs. Premièrement, le profil du génotype *m*sp-2 de l'isolat au jour de l'échec était comparé à celui des isolats à J0 et à J1 avec le logiciel Quantity One<sup>®</sup> de BioRad. Si tous les allèles *m*sp-2 présents dans l'isolat au jour de l'échec étaient également présents dans les isolats J0 et J1, un nouveau génotypage était effectué au niveau du gène *m*sp-1. Le sujet était classé " recrudescence ", si tous les allèles *m*sp-1 et *m*sp-2 présents dans l'isolat au jour de l'échec étaient également présents dans les isolats J0 et J1, dans tous les autres cas le sujet était classé " réinfecté ".

Les données ont été saisies et vérifiées à l'aide du logiciel EpiInfo 6.04<sup>®</sup> (Centres for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States), puis analysées avec le logiciel MedCalc<sup>®</sup> version 9.1.0.1 (MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium).



L'efficacité du traitement a été évaluée par une analyse " per protocol ", qui incluait tous les patients non exclus de l'étude. Une analyse par classe d'âge (< 5 ans et ≥ 5 ans) a également été faite. La densité parasitaire a été normalisée par transformation logarithmique. Les variables qualitatives ont été comparées en utilisant le test du Chi 2 ou le test exact de Fisher, les variables quantitatives avec le t- test pour les échantillons indépendants. Les réponses aux traitements ont principalement été évaluées par l'estimation du risque d'ET à J14 et J28 (avant et après correction PCR). Les risques d'ET après correction PCR ont également été étudiés par la courbe de survie de Kaplan-Meier en éliminant les réinfections comme préconisé dans le nouveau protocole OMS.

Ont également été évaluées par bras thérapeutique, la vitesse de disparition de la fièvre et de la parasitémie, la différence entre le taux d'hémoglobine à J0 et à J28 et l'incidence des effets indésirables. Les hypothèses ont été testées en utilisant comme différence de risque un intervalle de confiance à 95% et la valeur P. Une valeur  $P < 0,05$  était considérée comme significative.

Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité National d'éthique du Ministère de la Santé et du Planning Familial (N°007/SANPF/2007).

Parmi les 8 sites sentinelles, 8 363 patients suspects de paludisme ont été vus en consultation et 1 873 ont été confirmés positifs à *P. falciparum* (22,4%). Parmi ces patients, 1 434 ont été enrôlés dans l'étude soit entre février/juin 2006 soit entre mars/juillet 2007 (76,6%). Au total, 320 patients ont été traités par la CQ, 385 par l'AQ, 383 par la SP, et 346 par l'ASAQ. Les principales raisons concernant la non inclusion des patients infectés par *P. falciparum* étaient leur refus de participer à l'étude, leur incapacité à revenir aux consultations prévues ou la présence d'une infection concomitante. Le déroulement de l'étude est détaillé dans la figure 2.

Parmi les 1 434 sujets inclus, 1 347 (93,9%) ont été suivis et évalués à J28 : 92,5% dans le groupe AQ, 93,7% dans le groupe CQ, 94,2% dans le groupe SP et 95,4% dans le groupe ASAQ. Quatre vingt huit sujets ont été soit perdus de vue ( $n = 68$ ), soit exclus ou ont abandonné l'étude ( $n = 20$ ). Parmi ces sujets, 18 ont abandonné et 2 ont arrêté en raison d'effets secondaires.

Les caractéristiques des patients inclus étaient similaires entre les sites.

Les résultats sont détaillés dans les tableaux II et III. La figure 2 représente la courbe de survie de Kaplan-Meier des ET évalués à J28 après correction PCR (réinfections exclus) et la figure 4, la répartition des ET évalués à J28 après correction PCR, selon les traitements antipaludiques et les sites.

Tous les traitements évalués, à l'exception de la CQ, avaient un taux de guérison supérieurs à 97,6% à J14 et à 96,7% à J28 (correction PCR).

Parmi tous les sites, la fréquence des ET à la CQ était significativement plus élevée qu'avec les autres traitements aussi bien à J14 qu'à J28 (correction PCR ou non) ( $P < 0.0001$ ).

#### **Dans le bras CQ**

- la fréquence des ETP était faible, ne survenant que dans 10,6% des cas d'ET (14/132);

- la plupart des ET survenaient au cours de la 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> semaine après le traitement, le plus souvent avec réapparition des parasites mais en absence de fièvre (EPT = 63,6%);

- la fréquence des ET était significativement différente entre les sites allant de 19% à Ihosy jusqu'à 64% à Ejeda ( $P < 10^{-6}$ );

- le risque d'ET était 2 fois plus fréquent chez les enfants de moins de 5 ans par rapport aux enfants plus âgés (52,7% vs 37,3%, OR = 1,8; IC95%, 1,2-3,0;  $P = 0,004$ );

- la fréquence des ET évalués à J14 étaient significativement plus basse que la fréquence des ET évalués à J28 après correction PCR (32,0% vs 44,0%, différence de 12,0%, IC95% = 4,3%-19,5%,  $P = 0.003$ ).

#### **Dans le bras SP**

- la fréquence des ET était faible (3,3%), les ETP représentant plus d'1/3 des cas;

- la répartition de la fréquence des ET différait selon les sites et était plus élevée à Tsiroanomandidy (12,5%) et à Ejeda (6,0%).

#### **Dans les bras AQ et ASAQ**

- l'efficacité des 2 traitements était très élevée.

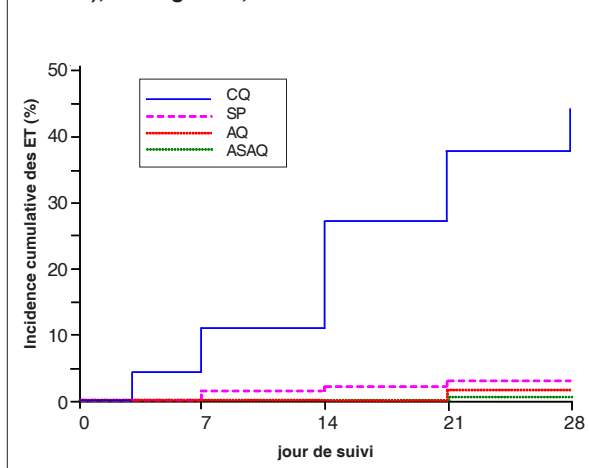
- la fréquence des ET était cependant plus importante dans les zones de faible transmission comme Ejeda (6,3% pour le bras AQ et 8,0% pour le bras ASAQ) ou Moramanga (2,8% pour le bras AQ et 5,3% pour le bras ASAQ).



Tableau II : Réponses aux traitements en fonction du traitement et de la durée du suivi, Madagascar, *in vivo* 2006/2007

Evaluation à	CQ		SP		AQ		ASAQ	
	Nb/Total (%)	[IC95%]	Nb/Total (%)	[IC95%]	Nb/Total (%)	[IC95%]	Nb/Total (%)	[IC95%]
<b>J14</b>								
Echec clinique	ETP	14/309 (4,5) [2,6-7,3]	4/368 (1,1) [0,3-2,6]	2/372 (0,5) [0,1-1,7]	0/335 (0)			
	ETT	29/309 (9,4) [6,5-13,0]	2/368 (0,5) [0,1-1,7]	0/372 (0)	0/335 (0)			
Echec parasitologique	ETP	56/309 (18,1) [14,1-22,7]	3/368 (0,8) [0,2-2,2]	0/372 (0)	0/335 (0)			
Echec thérapeutique		<b>99/309 (32,0) [27,0-37,4]</b>	<b>9/368 (2,4) [1,2-4,4]</b>	<b>2/372 (0,5) [0,1-1,7]</b>	<b>0/335 (0)</b>			
<b>J28 sans correction PCR</b>								
Echec clinique	ETP	14/300 (4,7) [2,7-7,5]	4/361 (1,1) [0,4-2,7]	2/356 (0,6) [0,1-1,8]	0/330 (0)			
	ETT	45/300 (15,0) [11,3-19,4]	4/361 (1,1) [0,4-2,7]	3/356 (0,8) [0,2-2,3]	4/330 (1,2) [0,4-2,9]			
Echec parasitologique	ETP	104/300 (34,7) [29,4-40,2]	8/361 (2,2) [1,0-4,2]	6/356 (1,7) [0,7-3,5]	8/330 (2,4) [1,1-4,6]			
Echec thérapeutique		163/300 (54,4) [48,7-59,9]	16/361 (4,4) [2,6-6,9]	11/356 (3,1) [1,6-5,3]	12/330 (3,6) [2,0-6,1]			
<b>J28 avec correction PCR</b>								
Echec clinique	ETP	14/300 (4,7) [2,7-7,5]	4/361 (1,1) [0,4-2,7]	2/356 (0,6) [0,1-1,8]	0/330 (0) [0,4-2,7]			
	ETT	34/300 (11,3) [8,1-15,3]	3/361 (0,8) [0,2-2,2]	1/356 (0,3) [0-1,4]	2/330 (0,6) [0,1-2,0]			
Echec parasitologique	ETP	84/300 (28,0) [23,1-33,3]	5/361 (1,4) [0,5-3,0]	3/356 (0,8) [0,2-2,3]	4/330 (1,2) [0,4-2,9]			
Echec thérapeutique		132/300 (44,0) [38,5-49,7]	12/361 (3,3) [1,8-5,6]	6/356 (1,7) [0,7-3,5]	6/330 (1,8) [0,7-3,7]			

Figure 2 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ET évalués à J28 après correction PCR (réinfections exclus), Madagascar, *in vivo* 2006/2007



## 1.2 Evaluations secondaires

Le délai d'élimination des parasites avant le jour 3 était plus court avec l'ASAQ qu'avec les autres traitements ( $P < 10^{-6}$ ). Le délai d'élimination de la fièvre était quant à lui significativement plus long chez les sujets traités par la CQ ou la SP que chez les sujets traités par l'AQ ou l'ASAQ.

La médiane mesurant l'augmentation du taux d'hémoglobine entre J0 et J28 n'était pas significativement différente entre les 4 bras thérapeutiques : CQ, 0,8 g/dl, -4,1 à 4,9; SP, 1,0 g/dl, -4,8 à 6,4; AQ, 1,0 g/dl, -4,4 à 8,3; ASAQ, 0,9 g/dl, -6,0 à 6,4.

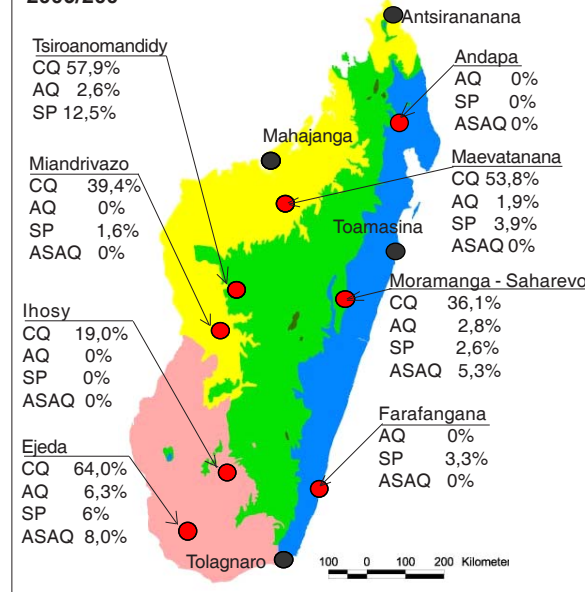
Aucun effet secondaire sévère n'a été enregistré. Des effets indésirables mineurs ont été observés entre J1 et J3 chez 17 sujets (1,26%) : 8 dans le bras AQ, 4 dans les bras CQ et SP et 1 dans le bras ASAQ.

En conclusion, les résultats de cette étude multicentrique montrent que la résistance des souches de *Plasmodium falciparum* demeure modérée à

Madagascar, à l'exception de la CQ, contrastant avec le niveau de résistance existant dans les autres pays endémiques de la région Océan Indien comme l'Archipel des Comores.

La prochaine étape de la surveillance visera à établir la fréquence des parasites mutants résistants à la CQ (Pfcr1) ou à la SP (Pf-dhfr or Pf-dhps) ou le niveau de réponse *in vitro* des parasites aux molécules pour lesquelles il n'existe pas de marqueur moléculaire parfaitement validé ou disponible (amodiaquine, dérivés de l'artémisinine, quinine). Ces informations complémentaires permettront d'améliorer la surveillance de la résistance, particulièrement de surveiller le risque d'introduction de souches résistantes des Comores vers Madagascar comme nous l'avons déjà été démontré.

Figure 3 : Répartition des ET évalués à J28 après correction PCR, selon les traitements antipaludiques et les sites, Madagascar, *in vivo* 2006/2007



Enfin, l'extension du RER au niveau régional est aussi nécessaire pour permettre aux différents pays endémiques de partager leurs expériences et leurs informations sur le niveau de résistance des souches de parasites circulant dans leur pays de façon à minimiser le délai de mise en place d'une nouvelle politique de lutte en matière de traitement.

### **1.3 Suivi sur 12 mois de l'évolution des marqueurs de résistance de *Plasmodium falciparum* associés à la résistance à la SP au cours du projet "Traitement Préventif Intermittent chez les enfants TPIe" dans 4 pays africains (Bénin, Mali, Sénégal, Madagascar)**

*I Sagara, A Djimé, A Dicko, B Faye, JL Ndiaye, O Gaye, D Gazard, J Hassan, L Rabarijaona, D Ménard, A De Sousa*

#### **Financement :**

UNICEF : 15 000 US\$

#### **• Présentation du projet et des objectifs**

L'UNICEF conduit actuellement un projet de recherche opérationnel sur le Traitement Préventif Intermittent (TPIe) chez les enfants en bas âge dans 4 pays africains. Le but de ce projet est de produire des données et de documenter l'impact de cette stratégie dans plusieurs pays. L'efficacité de cette stratégie sera déterminée en fonction de l'efficacité thérapeutique de la SP et sa tolérance. Cependant en raison de la large diffusion de la résistance des parasites à la SP, une évaluation de l'impact potentiel du TPIe avec le SP sur l'évolution de la résistance des parasites sera effectuée. Cette évaluation se fera par la comparaison de la fréquence des parasites résistants avant et après l'intervention au niveau des gènes *dhfr* (codons 108, 51 et 59) et *dhps* (codons 437 et 540).

#### **• Résultats**

Les analyses des 306 échantillons collectés avant la mise en place du projet est en cours. La collecte des prélèvements après mise en place du projet se fera au début du 1<sup>er</sup> semestre 2008.

### **1.4 Mise en place d'un contrôle de qualité international des tests de diagnostic rapide du paludisme (Projet " *Malaria Specimen Bank Collection Sites* ")**

*D Ménard, MA Ranaivojaona, E Fanomezantsoa, S Rabearimanana, R Raheinjafy, T Randriantsoa, T Andriamiandranoro, A Ratsimbasoa*

*Collaborations : R Peeling, J Joly (UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)), M Perkins, A Albertini, S Incardona (Foundation for Innovative New Diagnostics, FIND), D Bell*

*(Malaria diagnostics, Malaria, Vector-borne and other Parasitic Diseases World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific, Manila, Philippines), L Marts (CDC Atlanta)*

#### **Financements :**

UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) : 12 000 \$/an

#### **• Présentation du projet et des objectifs**

L'objectif de cette étude est de recueillir des souches de *Plasmodium sp* pour constituer une banque d'échantillons sanguins permettant d'effectuer le contrôle de qualité des tests de diagnostic rapide du paludisme (TDR).

La mission de l'unité de recherche et de développement sur le diagnostic (DRD) du programme spécial incluant l'UNICEF/UNDP/World Bank/WHO/TDR est de favoriser le développement, l'évaluation et l'application des outils diagnostiques pour le contrôle des maladies tropicales. Un des obstacles importants au développement et à l'évaluation des tests de diagnostic rapide du paludisme en Afrique est le manque d'accès aux documents de référence.

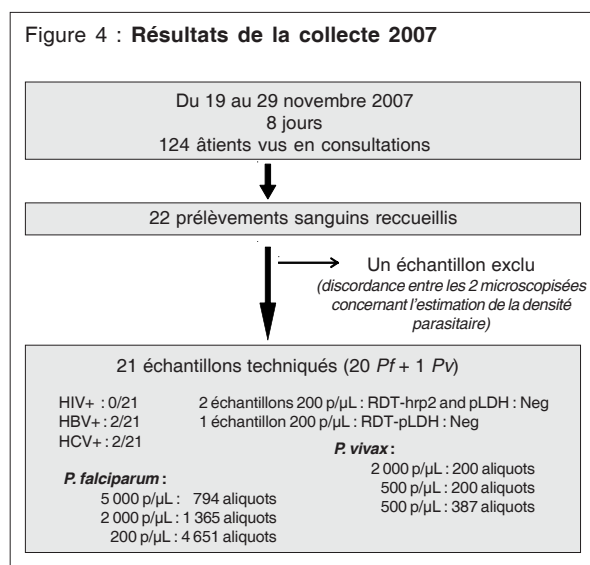
La constitution de banques d'échantillons sanguins contenant des parasites du paludisme permettra de fournir du matériel bien caractérisé et de faciliter le développement, l'évaluation et la garantie de la qualité des TDR. Lors d'une consultation récente organisée par l'OMS sur l'assurance qualité des tests de diagnostic rapide du paludisme, le consensus émanant du groupe d'experts était que les parasites du paludisme collectés et conservés dans les banques d'échantillon pourrait être utilisé pour assurer le contrôle de qualité des tests rapides de diagnostic soit après production, soit après vente des TDR par les fabricants. Les sites participant à la constitution d'une banque d'échantillons sanguins sont :

- **en Afrique :** la Tanzanie (Ifakara Health Research and Development Centre, Dar Es Salaam), La République Centrafricaine (Institut Pasteur de Bangui, Bangui), le Kenya (WPR/CCR Kenya Medical Research Institute, Kisumu), Le Nigéria (University of Lagos, Idiaraba, Lagos), Le Sénégal (Faculté de Médecine, Pharmacie et Odonto Stomatologie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar), L'Etiopie (Ethiopian Health and Nutrition Research Institute, ENRI, Addis Ababa), Madagascar (Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo);

- **en Asie :** Les Philippines (Research Institute of Tropical Medicine Filinvest Compound Alabang, Muntinlupa City), Le Myanmar (Department of Medical Research Experimental Medicine Research Division Department of Medical Research, Dagon), le Cambodge

(Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh);

- **en Amérique du Sud** : Pérou (Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt Universidad Peruana Cayetano Heredia)



### 1.5 Plasmodium falciparum isolés des placentas

*L Raharimalala, LA Ranarivelo, F Arie, M Randrianaivelosia*

#### Financement :

FSP/RAI pour la conduite de l'étude en 2001/2002 et IAEA pour le typage des isolats, 2001 à 2007

#### • Présentation des résultats

La détection de plasmodies dans le placenta a été effectuée en microscopie chez 197 femmes (moyenne âge  $25,4 \pm 6,7$  ans) qui ont accouché dans une structure de santé primaire d'Andapa, dans la partie nord de Madagascar en 2001/2002. Au total, *P. falciparum* a été trouvé dans 31 (15,7%) des placentas. Le tableau III montre la distribution des femmes aux placentas infectés en tenant compte de leurs réponses à la question sur la chimioprophylaxie par la chloroquine.

Pour les différents groupes, il n'y a pas de différence sur le nombre de consultation prénatale effectuée, ni sur la parité, ni sur le nombre de grossesse, ni sur l'âge. Ces résultats montrent que 29% des femmes ont pris la chloroquine à la dose prophylactique de 300 mg préconisée par la politique nationale en vigueur à l'époque. Néanmoins, 78% des femmes ont reconnu avoir pris de la chloroquine (avec ou sans prescription médicale). Un dosage de chloroquine dans le sang aurait permis de mieux conclure sur l'intérêt de la chimioprophylaxie par la chloroquine.

Vingt huit échantillons de placentas sur les 31 infectés ont été acheminés à l'Institut Pasteur de Madagascar. L'amplification par PCR de la région autour

du codon 76 de *pfprt* a été positive pour 26/28 isolats de *P. falciparum*. La présence de souches mutées *pfprt* K76T a été détectée chez 23% des isolats (IC95% : 8,9 - 43,6%). Une étude sur une cohorte plus importante est à faire certes; mais ces résultats sont en prendre en compte pour l'évaluation de l'impact de la mise en oeuvre de la nouvelle politique à Madagascar.

Tableau III : *P. falciparum* dans les placentas à Andapa (2001/2002)

Chloroquine en prise hebdomadaire (mg)	<i>P. falciparum</i> dans le placenta	
	Présence	Absence
0 (n=43)	8 (18,8%)	35
<300 (n=71)	10 (14%)	61
300 (n=67)	10 (17,5%)	57
>300 (n=16)	3 (18,8%)	16
<b>Total (n=197)</b>	<b>31 (15,7%)</b>	<b>166</b>

### 1.6 Connaissances et pratiques des femmes enceintes face au paludisme dans la capitale

*J Ravelonarivo, V Raharijaona, M Ratsitorahina, M Randrianaivelosia*

#### Financement :

Aucun, mars à décembre 2007

#### • Présentation des résultats

Cette étude a été réalisée en 2007 dans la ville d'Antananarivo pour cerner les connaissances et pratiques des femmes enceintes.

Tableau IV : Médicaments utilisés par les femmes enceintes dans le traitement du paludisme (tazomoka) au cours des douze derniers mois

Médicaments	En automédication (n=92)	Avec prescription médicale (n=312)
<b>Antipaludiques</b>		
Chloroquine :		
Chloroquine en vrac	65	213
Palustop	1	29
Ody Tazomoka	-	3
Quinine injectable	2	102
<b>Sulfadoxine-pyriméthamine :</b>		
Paludar	3	23
Fansidar	-	1
<b>Artemisinine et dérivés</b>		
Arsucam	1	0
Artesunate	-	1
<b>Antipyrétiques et anti-inflammatoires :</b>		
Paracetamol	62	183
Aspirine	5	12
Ibuprofen	-	1
<b>Antibiotiques</b>		
Cotrim	17	26
Amoxicilline	1	14
Ampicilline	-	7
Penicilline	-	3
Tétracycline	2	9
<b>Vitamine C</b>		
	-	8
<b>Médecine traditionnelle</b>		
Tisane	4	3
Inhalation	3	1
Massage	1	-
Café chaud	1	-

L'enquête a été effectuée à l'aide de questionnaires. Sur les 404 patientes qui ont participé à l'étude, l'âge variait de 16 à 45 ans, avec une moyenne de 25,9 ans (intervalle de confiance 95% : 25,3-26,5). Le nombre de grossesses rapporté était de 1 à 9, donnant une moyenne de 2,5 (IC95% : 2,3-2,7 grossesses). La majorité des patientes sont venues pour la première (55,7%), la deuxième (21,3%) et la troisième consultation prénatale (12,1%). Au total, 78,9% des femmes enceintes savaient que la piqûre de moustiques donne le paludisme; 59,4% dormaient sous moustiquaires; 57,9% associaient le paludisme et la fièvre; 30,7% utilisaient la chimioprophylaxie par chloroquine; 7,9% ont été exposés aux risques d'infections palustres du fait de déplacements en dehors de leurs districts de résidence; 77,2% allaient en consultation médicale en cas de fièvre et 56,9% connaissaient la prise en charge à domicile du paludisme chez les enfants par la chloroquine préemballée. Il y a nettement plus d'utilisation de chloroquine chez les femmes enceintes qui sont venues pour la deuxième consultation prénatale et plus (52,5%) que chez les femmes venues pour la première consultation prénatale (13,3%) ( $P < 10^{-5}$ ). A des fins curatives ou préventives, des personnels de la santé dans les centres de santé ont continué à prescrire la chloroquine (contraire à la nouvelle politique).

## **2- Laboratoire pour les Arbovirus et les virus responsables des Fièvres Hémorragiques : surveillance des arboviroses**

SF Andriamandimby, T Rakotojoelinandrasana, JP Ravalohery, J Razainirina, NS Andriamamonjy, JM Reynes

*Collaboration : Unité Epidémiologie de l'IPM, Services de la Lutte contre les Maladies Emergentes et Ré-émergentes, Service de la Surveillance Epidémiologique, Service de la Lutte anti-Paludique de la Direction des Urgences et de la Lutte contre les Maladies Transmissibles, Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale.*

Suite à l'épidémie de dengue (sérotypage 1) et de fièvre chikungunya en 2006 dans l'Est de Madagascar (province de Toamasina), nous avons initié la même année dans la capitale provinciale, en collaboration avec les autorités sanitaires locales, une surveillance sentinelle clinique et biologique des arboviroses. Elle était financée par la Direction Régionale de la Santé à Toamasina qui bénéficiait d'un fonds de soutien du Ministère Français des Affaires Etrangères.

Depuis mars 2007, grâce à un financement de la Banque Mondiale dans le cadre du projet Cresan-2 (Convention 02/07/SAN/IDA/BCP), en collaboration avec les services de la Direction des Urgences et de la Lutte contre les Maladies Transmissibles (Service de la

Lutte contre les Maladies Emergentes et Réémergentes, Service de la Surveillance Epidémiologique, Service de la Lutte contre le Paludisme), cette surveillance sentinelle a été poursuivie puis étendue à l'ensemble du pays. Elle est complémentaire à la surveillance épidémiologique (surveillance intégrée des maladies). Cette surveillance porte non seulement sur les arboviroses (syndrome dengue-like) mais plus généralement sur les syndromes fébriles dont le paludisme, la grippe et les arboviroses. Ce projet a permis un suivi en temps réel de l'évolution de ces syndromes dans 11 puis 13 sites sentinelles (CSB II de Tanambao à Toamasina, Tanambao à Antsiranana, Mahabibo à Mahajanga, SALFA Annexe II à Taolagnaro, Antsohihy, Maevatanana, Tsiroanomandidy, Moramanga, Tuléar, Morondava, Farafangana. Ihosy et Ejeda. Les 4 premiers sites, Toamasina, Mahajanga, Antsiranana et Taolagnaro sont aussi des sites sentinelles biologiques (envoi hebdomadaire vers l'IPM de prélèvements provenant des cas suspects).

Cette surveillance sentinelle a pour objectifs de disposer d'un système d'alerte précoce de situation épidémique, d'attester la réalité d'une épidémie et d'en confirmer l'origine afin d'assurer une riposte rapide.

Seuls les résultats de la surveillance biologique des arboviroses seront rapportés ci-dessous (les résultats de la surveillance sentinelle clinique sont présentés dans les travaux de l'unité d'épidémiologie qui gère ce volet avec le SLMER et le SSUREPI). Cette surveillance biologique a pour objectifs spécifiques de confirmer la présence d'un arbovirus lors d'épidémie de syndrome dengue-like ou hémorragique révélée par la surveillance sentinelle clinique ou par d'autres alertes, et de confirmer ou non l'endémicité de certains arbovirus épidémiques (virus de la fièvre Chikungunya et virus de la dengue).

### **2.1 Organisation de la surveillance**

#### **• Recueil des prélèvements**

Les médecins des 4 centres sentinelles cliniques et biologiques sont chargés de prélever 5 mL de sang par semaine chez au plus 5 patients suspects d'arbovirose, c'est-à-dire respectant des critères d'inclusion (température axillaire  $> 37,5^{\circ}\text{C}$ , et 2 des signes suivants : céphalées, myalgies, arthralgie, éruption cutanée, douleurs rétro-orbitaires, manifestations hémorragiques) et d'exclusion (absence de diarrhée, de signes respiratoires et d'infection par *Plasmodium sp.*). Une fiche de laboratoire documentant ces critères est complétée pour chaque patient prélevé.

Les patients sont convoqués 7 à 21 jours plus tard pour effectuer un deuxième prélèvement.

Les prélèvements de sang sont conditionnés par le



centre avec les équipements et les consommables fournis par le projet (centrifugeuse, pipettes, cryotubes, cônes, feutre, alcool, gants, tubes secs, aiguilles, porte-tube, boîte à déchets). Le sérum d'un patient après centrifugation du sang est aliquoté dans 2 cryotubes identifiés qui sont congelés dans un cryoconservateur d'azote à sec.

Une fois par semaine, les cryoconservateurs contenant les prélèvements et les fiches de laboratoire sont acheminés à l'IPM par voie terrestre par la société " Colis express " pour les centres d'Antsiranana et de Taolagnaro ou par voie aérienne par la société " Madcourrier express " pour ceux de Mahajanga et de Toamasina. Dans la même journée ou le lendemain, le cryoconservateur est renvoyé par le même système à chaque centre après avoir été rechargé en azote liquide.

Le laboratoire peut recevoir également, hors centres sentinelles biologiques, des prélèvements de patients effectués dans le cadre d'investigation de cas ou d'épidémie.

#### • Analyses de laboratoire

##### *Diagnostic direct*

La mise en évidence directe des virus se fait sur tous les prélèvements de patient dont la maladie évolue depuis au plus 5 jours.

Des tentatives d'isolement sont effectuées sur cellules AP61 ou Vero E6 (pour des cas très spécifiques, l'inoculation par voie cérébrale et/ou intra-péritonéale à des souriceaux nouveau-nés peut être utilisé). L'identification se fait par immunofluorescence indirecte (IFI) à l'aide d'anticorps monoclonaux ou d'ascites hyper-immunes sur les cellules 8 jours après leur inoculation (et éventuellement sur un squash de cerveau de souriceau devenu malade et sacrifié). Le protocole s'inspire de celui décrit par Digoutte *et al.* (*Res Virol* 1992; **143** : 417-422). En routine sont utilisés des ascites hyper-immunes de souris permettant de détecter 13 arbovirus (les 4 virus de la dengue (DENV), le virus Chikungunya (CHIKV), le virus West-Nile, le virus Babanki, le virus Bunyamwera, le virus Ngari, le virus Wesselsbron, le virus de la fièvre jaune, le virus Ilesha, le virus de la fièvre de la vallée du Rift) fournis pour les 5 dernières par l'Institut Pasteur à Dakar et 4 anticorps monoclonaux fournis par le CDC, Fort Collins, CO, USA, dirigés contre chacun des 4 sérotypes de la dengue (DENV-1 : D2-1F1-3, DENV-2 : 3H5-1-21, DENV-3 : D6-8A1-12, DENV-4 : 1H10-6-7). Il s'agit d'arbovirus pathogènes pour l'homme dont la plupart ont déjà été isolés à Madagascar. Un virus isolé (présence d'effet cytopathogène) mais non identifiable serait expédié à un centre collaborateur OMS pour identification.

La recherche de génome viral (ARN) de DENV et CHIKV est effectué par RT-PCR suivi d'une PCR nichée ou semi-nichée selon les techniques développées par Schuffenecker I *et al.* (*PLoS Med* 2006; **3** : e263) et Chien LJ *et al.* (*J Clin Microbiol* 2006; **44** : 1295-1304).

##### *Diagnostic indirect*

+ Ig totales pour les flavivirus DENV-1, DENV-2, DENV-3 et virus West-Nile, et les alphavirus CHIKV et Babanki par la technique de l'inhibition de l'hémagglutination ou IHA (méthode de Clarke et Casals adaptée aux microtechniques : *Am J Trop Med Hyg* 1958; **7** : 561-573).

+ Ig M pour les virus DENV, CHIKV, et West-Nile (technique ELISA modifiée d'après Lhuillier et Sarthou, *Ann Virol* 1983; **134 E** : 349-359).

La technique IgM ELISA est appliquée à tous les prélèvements quelle que soit la durée d'évolution de la maladie alors que la technique IHA n'est utilisée que pour les paires de sérums d'un même patient (si un seul sérum est disponible pour un patient, la technique n'est pas utilisée).

Pour répondre à un de nos objectifs de la surveillance, nous disposons également de techniques de diagnostic direct (RT-PCR) et indirect (IgM et IgG ELISA) d'infection par des virus responsables de fièvres hémorragiques comme les virus Ebola, Marburg, Lassa, Fièvre de la Vallée du Rift, Fièvre Jaune et Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo. Ces techniques ne sont pas pratiquées en routine mais pour les cas graves suspects de fièvre hémorragique. Ces réactifs ont été fournis par le Centre Collaborateur OMS pour les arbovirus de l'Institut Pasteur de Dakar (Sénégal) et par le CDC Special Pathogen Branch à Atlanta (USA).

#### • Elevage

Les antigènes et ascites hyperimmunes nécessaires pour ces analyses ont pu être produites grâce à un élevage de souris. L'effectif de souris OF1, qui était de 765 femelles et de 360 mâles au 1 janvier 2007, est passé à 1704 femelles et 635 mâles au 31 décembre 2007. 458 portées et 372 adultes ont été utilisées par le laboratoire. Les globules rouges d'oie nécessaires à l'IHA proviennent de l'élevage de l'IPM.

#### • Diffusion des résultats

Des éditions partielles puis totales des résultats individuels des analyses des prélèvements des patients sont envoyées aux centres sentinelles une fois par semaine avec le cryoconservateur. Les médecins se chargent de les donner aux patients. Le centre sentinelle reçoit chaque semaine un bilan récapitulatif des patients prélevés dont les prélèvements viennent d'être analysés

ou sont en cours d'analyse, avec les conclusions du laboratoire pour chaque patient quant à la présence ou non d'une infection par un arbovirus. Enfin il reçoit un bilan récapitulatif depuis le début de la surveillance qui fait état du dénombrement hebdomadaire des cas prélevés par centre et des conclusions du laboratoire pour ces cas. Ce bilan de la surveillance biologique est également envoyé par email aux partenaires de la surveillance (SLMER, SUREPI SLP et DULMT).

## 2.2 Résultats

### • Surveillance sentinelle

La mise en activité de chaque centre a été effectuée progressivement. Les centres sentinelles de Toamasina et d'Antsiranana ont débuté leurs activités de surveillance dès la troisième semaine du mois d'avril 2007 tandis que ceux de Mahajanga et de Taolagnaro ont commencé respectivement la deuxième semaine du mois de mai et la deuxième semaine du mois de juin. Une mission de mise en place et deux missions de supervision ont été organisées sur chaque centre pendant l'année. Elles ont permis d'améliorer certaines procédures pré-analytiques et de (in)former les médecins sur les arboviroses et leur diagnostic de laboratoire. Deux cent quarante cinq prélèvements ont été reçus au laboratoire. Ce nombre est 2,8 fois moins important que le nombre maximum attendu. La période de la surveillance en 2007 a coïncidé en fait avec la saison sèche (qui est vraisemblablement une période inter-épidémique). D'une manière générale, les critères d'exclusion et d'inclusion ont été respectés. Il y a eu plus de 80% de patients et de prélèvements conformes. Le point le plus délicat reste l'obtention du 2<sup>ème</sup> prélèvement : performance moyenne de 33,5% pour une performance attendue de 80% (tableau I). Cette performance s'est améliorée après deux visites de supervision des centres sentinelles.

La circulation de CHIKV a été mise en évidence dans les 4 sites de façon sporadique (tableau I) : à Toamasina de manière récurrente en avril, mai, juillet, août, et octobre, à Mahajanga en mai, à Antsiranana en avril et mai avec une alerte épidémique. Ce virus n'a pas été détecté à Taolagnaro mais il y a eu une preuve sérologique d'infection. Ces résultats, en particulier à Toamasina, sont en faveur d'une endémisation de CHIKV. Aucun autre arbovirus n'a été isolé mais des preuves sérologiques permettent de conclure à une circulation même à bas bruit de flavivirus et en particulier du virus de la dengue à Toamasina.

Le manque de seconds prélèvements fait que le nombre des statuts indéterminés (59,59%) est important. Il s'agit de cas où nous ne pouvons exclure l'absence d'infection par les virus testés.

Tableau I : Nombre de sérums reçus des 4 centres sentinelles et nombre de virus isolés (avril à décembre 2007)

Centre sentinelle	Prélèvements précoces	Prélèvements tardifs (%)	Virus détectés	Statut indéterminé (%)
Toamasina	149	67 (44,97)	9 CHIKV	54,36
Antsiranana	46	7 (15,22)	14 CHIKV	60,87
Mahajanga	38	5 (13,16)	5 CHIKV	73,68
Taolagnaro	12	3 (25,00)	0	75,00
<b>Total Patients</b>	<b>245</b>	<b>82 (33,47)</b>	<b>28 CHIKV</b>	<b>60,00</b>

### • Investigation d'épidémies

Plusieurs alertes ont été émises lors de la surveillance sentinelle clinique :

- une des alertes épidémiques a concerné les arboviroses (syndrome dengue-like) et a été émise lors de l'installation du site sentinelle biologique à Antsiranana en avril 2007. L'épidémie datait de 1 à 2 mois. La circulation de CHIKV a pu être montrée

- une autre alerte avait été émise en février 2007 hors sites sentinelles, dans la région Sava où les villes de Sambava, Antalaha et Andapa semblaient touchées par une épidémie de syndromes dengue-like. Nous avons pu détecter la circulation de CHIKV dans les villes d'Antalaha et Sambava.

## 2.2 Conclusion

Cette surveillance biologique a permis de rechercher en temps réel une étiologie arbovirale à certains syndromes fébriles. Elle conduit à suspecter l'endémicité du virus CHIKV dans la ville de Toamasina. L'essentiel de cette surveillance s'étant déroulé pendant la saison sèche, il est probable que ce virus va ré-émerger dans cette ville à l'occasion de la saison des pluies (mais de manière moins violente car une grande partie de la population est immunisée). En terme de riposte, des messages de sensibilisation ont été diffusés auprès de la population pour éliminer les gîtes larvaires à l'approche de la saison des pluies.

La mise en place de cette surveillance a constitué l'opportunité de relancer le laboratoire d'arbovirologie à l'IPM dont les activités étaient en sommeil depuis 5 ans faute de ressources humaines. Ce plateau technique de diagnostic est au service de la DULMT. Il n'a qu'un an de fonctionnement et les performances en matière de diagnostic devraient considérablement s'améliorer avec l'acquisition de nouvelles techniques et un éventail plus large de virus recherchés. La poursuite de cette surveillance sans rupture est indispensable. La période de pluie et de crue est une période importante où la surveillance doit être maintenue.



### 3- Appui au Ministère de la Santé pour la surveillance des maladies à potentiel épidémique

#### 3.1 Surveillance sentinelle des fièvres

Madagascar a connu comme le reste de l'océan indien l'émergence d'épidémies liées au virus CHIKV. Pour améliorer, la réactivité des autorités, il a été débuté en mars 2007 un projet de surveillance sentinelle incluant aujourd'hui treize sites de surveillance syndromique des fièvres dont quatre assurent également une surveillance virologique pour les arbovirus en effectuant des prélèvements sur des patients suspects d'arbovirose.

Ce travail permet d'aborder de façon expérimentale la surveillance en temps réel en s'appuyant sur les réseaux de téléphonies mobiles. Aujourd'hui, basé sur l'envoi de SMS, le projet est appelé à se développer avec l'élargissement des capacités de communication notamment l'accès internet sur téléphonie mobile.

Basée sur une surveillance syndromique en temps réel, la surveillance sentinelle clinique s'appuie sur des structures de santé périphérique dans des zones où des épidémies pourraient avoir un impact important sur les populations. Ce système est complémentaire de la surveillance épidémiologique de routine et ne vise pas à la remplacer. C'est un outil d'aide à la décision pour l'échelon central.

De plus ce projet permet de suivre l'évolution des arbovirus dans une partie de l'océan indien et de maintenir une expertise en matière d'investigation d'épidémies liées à ces virus.

Différentes alertes ont déjà été signalées par ce réseau et des investigations ont permis de mettre en évidence une épidémie liée au virus CHIKV à Antsiranana et des épidémies de grippe A/H1N1 à Farafangana et Tsiroanamandidy qui ont été investiguées.

Les premiers résultats de cette surveillance ont été présentés lors de la conférence sur les arboviroses qui s'est tenue à La Réunion en décembre dernier.

#### 3.2 Investigations d'épidémie

##### • Sambava : Arbovirose

La région de SAVA est constituée par 4 districts : Sambava, Antalaha, Vohémar et Andapa. Elle est située dans le Nord-Est de Madagascar. Le climat est chaud et humide pendant toute l'année en particulier entre septembre et avril. A la fin de l'année 2006, le nord de Madagascar a été touché par un cyclone tropical, notamment la région de SAVA.

La surveillance épidémiologique locale sur la base

des rapports hebdomadaires d'activités des centres de santé a montré une augmentation anormale du nombre de cas de fièvre dans le district de Sambava pendant la première semaine de l'année 2007. La courbe a montré que le seuil épidémique a été dépassé et les responsables régionaux de la santé ont déclaré une alerte le 8 janvier 2007. Le district d'Antalaha a déclaré une épidémie de même nature une semaine après Sambava.

Le tableau clinique des cas était caractérisé par la présence d'une fièvre (température axillaire supérieure à 38°C) d'apparition brutale associée au moins à deux des signes suivants : céphalée, douleur avec ou sans oedème articulaire, myalgie, douleur rétro-orbitaire et éruption cutanée.

Les prélèvements réalisés le 10 février 2007, constitués par des sérums précoces (évolution de la maladie moins de 5 jours) de 15 patients présentant une fièvre supérieure à 38°C accompagnée d'au moins 3 des signes suivants : céphalée, myalgie, arthralgie, éruption cutanée, douleur rétro orbitaire, manifestation hémorragique (purpura, épistaxis, gingivorragies, métorragie....) ont permis au laboratoire de virologie de l'IPM de détecter le virus CHIKV dont 5 cas sur 8 prélèvements de Sambava, 5 cas sur 5 prélèvements d'Antalaha et 0 cas sur 2 prélèvements d'Andapa.

##### • Antsiranana : Arbovirose

La surveillance sentinelle clinique mise en place au cours du 1<sup>er</sup> trimestre 2007 a permis de mettre en évidence à la mi-avril la survenue d'une épidémie d'arbovirose confirmée par la surveillance virologique avec la circulation du virus CHIKV à Antsiranana.

L'investigation menée à la suite de cette alerte a confirmée cette épidémie qui présentait des différences par rapport à celle de Toamasina en 2006 ou celle de Sambava- Antalaha début 2007. Pour ces dernières, une forte proportion de la population était touchée et la part des fièvres dans la consultation avait fortement augmentée avec plus de 70% des demandes de soins. A Antsiranana, la demande de soins n'a pas été modifiée par l'épidémie avec 20 à 30% des consultations pour fièvre comme en situation interépidémique, par contre plus de 80% des consultations de fièvres ont été rattachées à une suspicion d'arbovirose.

Ceci peut s'expliquer par une moindre transmission du virus liée à une moindre importance du vecteur pendant cette période, ce qui semble ressortir de l'investigation entomologique qui a été réalisée sur place. Mais une autre hypothèse doit également être envisagée : une forte proportion de la population a pu être déjà été en contact avec le virus dans le passé et la population susceptible ou naïve est donc moindre en

importance. Cette hypothèse s'appuie sur l'existence d'une importante épidémie en juillet 2005-2006 qui a marqué les esprits localement et dénommée " fièvre des 500 000 " et sur le constat d'une consultation pour fièvre d'une population jeune.

#### • **Andilamena - Andrebabe : Peste**

Madagascar reste un des foyers pesteux les plus actifs au monde. Une surveillance a été mise en place depuis quelques années sous la responsabilité de l'unité peste de l'IPM; l'Unité d'Epidémiologie appuie cette surveillance par la gestion des bases de donnée et par une participation active aux missions d'investigation d'épidémie. Cette année une mission a été menée à Andilamena et a permis de mettre en œuvre sur le terrain une investigation prenant en compte à la fois le volet humain, murin et entomologique. Cette surveillance permet de maintenir à niveau l'expertise en matière de peste.

#### • **Tsiroanomandidy : Grippe**

Une situation d'alerte a été détectée sur le site de Tsiroanomandidy concernant une élévation des cas de suspicion de grippe en septembre 2007. Une mission d'investigation a été menée sur le terrain et a permis de réaliser des prélèvements spécifiques. Les premiers résultats confirment la circulation de virus grippaux : A/H1N1 et B sous-type Shangai. Cependant la situation épidémiologique de ce site est restée stable et n'a pas vu se développer une situation épidémique.

#### • **Farafangana : Grippe**

Le système de surveillance sentinelle a permis d'évoquer une alerte épidémique liée à des syndromes pseudo-grippaux à Farafangana. Sur ce site sentinelle, la part moyenne des fièvres dans la consultation de juillet à décembre 2007 était de 9,3%, parmi ces dernières la part des syndromes grippaux de 60,3% (IC à 95% : 58,9 - 61,7). En semaine 51, la part des syndromes grippaux représentait 75% des cas de fièvres avec des tableaux cliniques comportant tous une fièvre et des signes respiratoires (toux, maux de gorge), touchant principalement des enfants (moins de 5 ans).

Il a été noté une augmentation des cas suspects de grippe à Farafangana qui a commencé le 03/12/2007 et qui s'est répandue dans la ville. La moyenne de l'incidence des cas au niveau des centres de santé était de 27,4% et il n'a pas été observé de cas graves ni de cas de décès. Les cas étaient à prédominance masculine et intéressaient surtout les enfants âgés de moins de 5 ans : 33,7% au niveau des centres de santé et 35,7% au niveau communautaire. La recherche de l'agent

pathogène a permis de rapporter cette épidémie au virus grippal A/H1N1.

## 4- Entomologie

### 4.1 Investigation entomologique autour des cas de syndrome dengue-like à Antsiranana - Madagascar

*J Ratovonjato, L Andrianaivolambo, R Razanampanjato  
Collaborations : Unité de Virologie - IPM, MinSan PFPS*

#### • **Contexte**

Depuis la déclaration des cas de syndrome dengue-like par le Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale en début de l'année 2006, parallèlement aux investigations virologiques et/ou épidémiologiques menées par l'IPM, des investigations entomologiques ayant pour objectif d'identifier les espèces de moustiques potentiellement vectrices des deux arbovirus (la fièvre Chikungunya et la Dengue) ont pu être réalisées dans les villes de Toamasina et de Mahajanga en 2006.

Afin de compléter les données issues de ces deux précédentes enquêtes, une autre investigation entomologique a été réalisée dans 4 sites (2 sites urbains, 1 site rural et 1 site péri-urbain) à Antsiranana (Diégo Suarez) en mai 2007.

Des collectes suivies d'identification des moustiques adultes qui se trouvent à l'intérieur et à proximité des maisons dans ces 4 sites où des malades présentant un syndrome dengue-like ont été notifiés. Des prospections des gîtes larvaires potentiels des moustiques du genre *Aedes* et des collectes de toutes les larves de moustiques présentes dans les gîtes larvaires et une évaluation de leur densité ont également été réalisées.

#### • **Résultats**

##### *Moustiques adultes collectés*

Au total, 393 moustiques adultes ont été collectés dont 63,1% (n=248) en milieu urbain, 17,3% (n=68) en milieu péri-urbain et 19,6% (n=77) en milieu rural. Au total, neuf espèces de moustiques ont pu être identifiées : *Culex quinquefasciatus* a été l'espèce de moustique la plus abondante et *Aedes albopictus* a été la seule espèce de moustiques potentiellement vectrice du virus Chikungunya connue et collectée à Antsiranana en 2007. L'élevage des larves de moustiques collectées dans les gîtes larvaires trouvés dans les quatre sites a permis d'obtenir 34 adultes d'*Aedes albopictus*.

### **Gîtes larvaires**

Pendant la période d'étude, les indicateurs de risque épidémique basés sur le calcul densité larvaires des moustiques du genre *Aedes* étaient largement inférieurs au seuil de risque épidémique défini par l'OMS.

#### **• Conclusion**

Cette investigation entomologique qui a fait l'objet d'un rapport technique adressé au Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale a permis de montrer que *Ae. albopictus* est présent dans la ville d'Antsiranana. Ces informations qui complètent les données collectées en 2006, montrent que *Aedes albopictus* serait l'espèce de moustique, responsable des épidémies de CHIKV et de Dengue survenues récemment à Madagascar.

### **4.2 Surveillance des vecteurs du Paludisme et évaluation du niveau de transmission de cette maladie dans les environs du site minier de Mandena, Taolagnaro**

Cette activité financée par International SOS, s'inscrit dans le cadre de la surveillance des vecteurs du Paludisme, mise en place depuis novembre 2006 dans 5 villages (Ampasy, Esana, Lafitsianana, Lohalovoka et Mangaiky) autour du site d'extraction d'ilménite dans le district de Tolagnaro, afin d'évaluer l'impact socio-sanitaire du projet d'exploitation d'ilménite dans cette région. En 2007, deux séries d'enquêtes entomologiques ont pu être réalisées dans les 5 villages. La première enquête a été réalisée en mars 2007 et la seconde en septembre 2007. Ces enquêtes consistent en la collecte, l'identification (morphologique et moléculaire) des moustiques et l'étude de l'infectivité des vecteurs collectés autour du site afin de disposer des informations sur la dynamique des espèces de moustiques vecteurs du *Plasmodium* humain, et celle de l'infectivité de ces espèces vectrices.

#### **• Résultats**

##### **Mars (001 DocTech - IPM /Entomo/2007)**

En mars 2007, 5 286 moustiques ont été capturés dans les cinq sites de surveillance dont 3,5% (n=188) étaient des vecteurs du *Plasmodium* humain. Parmi les trois espèces de moustiques vecteurs du Paludisme humain identifiées, 34 % (n=64) étaient des *Anopheles arabiensis*, 16,5% (n=31) était des *An. gambiae*, 36,7% (n=69) des *An. mascarensis*, les 12,7% restant n'ont pas pu être identifiés. Dans l'ensemble des 5 villages, 2,4% (2 positifs/82) des moustiques testés étaient infectés dont 1 *An. arabiensis* et 1 *An. mascarensis*.

##### **Septembre (003 DocTech - IPM /Entomo/2007)**

Dans l'ensemble des cinq villages, 990 moustiques ont été capturés dont 15,25% (n=151) étaient des vecteurs du *Plasmodium* humain. Les identifications morphologique et moléculaire ont montré que les moustiques vecteurs sont composés de 4 espèces: *An. arabiensis* 2,6% (n=4), *An. gambiae* 20,5% (n=31), *An. merus* 25,2% (n=38) et *An. mascarensis* 51,7% (n=78).

En septembre 2007, 0,7% (1/151 - *An. merus*) des moustiques était trouvés infectés.

### **4.3 Surveillance de la sensibilité des puces vectrices de Peste aux insecticides et recherche d'insecticides alternatifs à ceux actuellement utilisés par le Programme National de Lutte**

#### **• Contexte**

Dans le cadre de la surveillance de la sensibilité des puces vectrices de peste aux insecticides et de la recherche d'insecticides alternatifs à la deltaméthrine et au propoxur, qui sont des insecticides utilisés respectivement en milieu rural et en milieu urbain par le Service de lutte à Madagascar. En 2007, cinq insecticides appartenant à trois familles et qui n'ont pas fait l'objet d'étude récente d'efficacité vis-à-vis des puces vectrices de peste à Madagascar : Bendiocarbe 0,10% (carbamate), Cyfluthrine 0,15%, Etofenprox 0,50% (pyréthrinoides), Fénitrothion 1,00% et Malathion 5,00% (organophosphorés) ont été testés.

Au total, 480 *Xenopsylla cheopis* adultes collectées en milieu urbain et 300 puces de la même espèce; mais collectées en milieu rural ont été testées selon la méthodologie recommandée par l'OMS. Les puces testées étaient des puces résistantes au propoxur, pour les puces collectées en milieu urbain; tandis que les puces collectées en milieu rural sont des puces résistantes à la deltaméthrine.

#### **• Résultats**

##### **En milieu urbain (tableau I)**

Dans la ville d'Antananarivo, parmi les cinq insecticides testés, deux insecticides de la famille des organophosphorés : le malathion 5,00% et le fénitrothion 1,00% ont montré une bonne efficacité vis-à-vis de *X. cheopis*. Le seul cas de résistance au malathion 5,00% a été détecté chez *X. cheopis* collectée dans le quartier Andranomanalina.

Dans la ville de Mahajanga, les deux insecticides testés : le Bendiocarb 0,10% (carbamate), Etofenprox 0,50% (pyréthrinoides) étaient inefficaces vis-à-vis de *X. cheopis*.

### En milieu rural

Dans la ville d'Antananarivo, parmi les cinq insecticides testés, les insecticides de la famille des organophosphorés (malathion 5,00%, fénitrothion 1,00%) ont montré une bonne efficacité vis-à-vis de *X. cheopis*.

### Conclusion et perspectives

Dans la ville d'Antananarivo et en milieu rural dans

les districts de Manjakandriana et d'Ambositra : Malathion 5,00% et Fénitrothion 1,00% qui sont deux insecticides de la famille des organophosphorés peuvent être proposés comme étant des alternatives aux deux insecticides actuellement utilisés par le service de lutte contre la Peste.

L'étude de l'efficacité des organophosphorés vis-à-vis de *X. cheopis* collectées dans la ville de Mahajanga devra être réalisée.

Tableau I : Sensibilité aux insecticides de *Xenopsylla cheopis* collectée en milieu urbain

Familles	Produits	District	Localités	Nb testés	(% mort)	Conclusion
C	Bendiocarb 0,10%	Antananarivo*	Ambohimandra	40	(20)	résistant
		Mahajanga I	Abattoir	40	(12,5)	résistant
PY	Cyfluthrine 0,15%	Antananarivo*	Ambohimandra	40	(87,5)	tolérant
		Antananarivo*	Ambohimandra	40	(57,5)	résistant
	Mahajanga I	Andranomanalina	40	(0)	résistant	
		Abattoir	40	(10)	résistant	
		Tsararano Ambony	40	(2,5)	résistant	
OP	Fénitrothion 1%	Antananarivo*	Ambodirano Ampefiloha	40	(100)	sensible
			Ambohimandra	40	(100)	sensible
	Antananarivo*	Malathion 5%	Ambodirano Ampefiloha	40	(100)	sensible
			Ambohimandra	40	(100)	sensible
		Andranomanalina	40	(52,5)	résistant	

C=carbamates

PY = pyréthrinoïdes

OP = organophosphoré

\* = Antananarivo Renivohitra

Tableau II : Sensibilité aux insecticides de *Xenopsylla cheopis* collectée en milieu rural

Familles	Produits	District	Localités	Nb testés	(% mort)	Conclusion
C	Propoxur 0,10%	Manjakandriana	Andoharanofotsy Antsakambahiny	50	(34)	résistant
PY	Deltaméthrine 0,05%	Ambositra	larinoro Tsarasaotra	40	(87,5)	résistant
		Manjakandriana	Andoharanofotsy Antsakambahiny	50	(26)	tolérant
	Etofenprox 0,50%		Ambohipananina	40	(42,5)	résistant
OP	Fénitrothion 1,00%	Manjakandriana	Andoharanofotsy Antsakambahiny	50	(88)	résistant
			Ambohipananina	40	(100)	résistant
	Malathion 5,00%		Andoharanofotsy Antsakambahiny	50	(98)	sensible
			Ambohipananina	40	(100)	sensible
	Malathion 5,00%	Ambositra	larinoro Tsarasaotra	40	(100)	sensible

### 4.4 Investigation entomologique dans le cadre de la mission d'investigation des cas de peste dans la région d'Andrebabe (district d'Amparafaravola)

#### • Objectifs entomologiques

- Collecter et identifier les puces trouvées sur des micromammifères et les libres à l'intérieur des maisons.
- Evaluer les indicateurs entomologiques de risque épidémique.
- Détecter par la méthode PCR l'infection par *Yersinia pestis* des puces collectées.

#### • Résultats - Conclusion

En tout, 8 puces étaient collectées : 7 puces sur les

rats capturés dans les habitations et 1 puce libre à l'intérieur de maison (Index pulicidien global = nombre moyen de puces par animal =  $7/26 = 0,27$ ; Indice de densité =  $0,03$ ).

Toutes les puces collectées sur les rats capturés dans les habitations étaient des *Synopsyllus fonquerniei* qui est une espèce de puce vectrice de peste connue à Madagascar. Aucune souche de *Y. pestis* n'a été isolée de ces puces, toutefois 3 sur 8 étaient positives en PCR. La Prévalence des puces porteuses de *Y. pestis* était de 28,6% (2 positifs/7). Cette investigation entomologique réalisée lors de cette épidémie de peste à Andrebabe a permis également d'évaluer la PCR pour détecter la présence de *Y. pestis* chez des puces sauvages.



## 5- Laboratoire d'Epidémiologie-Surveillance des pathologies de la crevette (LES)

*E Chungue, Dr Sc, HDR, chef de laboratoire de l'Institut Pasteur à Paris- directrice du LES*

*I Razanajatovo, PhD, Université de Tokyo, stagiaire post-doctorale*

*J Botorafa, technicien supérieur de laboratoire*

*H Solomampionona, technicienne supérieure de laboratoire*

### • Introduction

L'Institut Pasteur de Madagascar a été identifié comme partenaire pour développer une compétence en épidémiologie-surveillance des pathologies de la crevette afin de répondre notamment à la réglementation internationale en matière de contrôle et de surveillance des maladies à déclaration obligatoire listées à l'Office International des Epizooties (OIE). Ces dernières, d'origine virale pour la plupart, sont la cause d'épizooties entraînant de très lourdes pertes économiques dans les grands pays producteurs de crevettes d'aquaculture d'Asie et d'Amérique alors que Madagascar en est encore indemne. Or la filière crevette représente une des premières ressources en devises du Pays. Le Laboratoire d'Epidémiologie-Surveillance (LES) s'intègre dans le projet de mise en place d'un dispositif de contrôle zoosanitaire de la filière " crevettes " de Madagascar avec le concours financier de l'Agence Française de Développement (AFD). L'IPM y contribue par la mise à disposition de locaux bruts, de ses structures techniques et logistiques et de son environnement scientifique.

La création du LES répond à une demande forte de l'Etat malgache et du Groupement des Aquaculteurs Pêcheurs de Crevettes de Madagascar (GAPCM) pour :

- un outil de gestion des maladies en élevage (diagnostic et surveillance)

- un appui technique et analytique à l'Autorité Sanitaire Halieutique (ASH) pour se conformer au règlement de l'Union Européenne de novembre 2006 relative au volet santé animale en matière de contrôle et de surveillance de la filière crevette. Le LES sera nommé Laboratoire national de référence. En l'absence d'un tel laboratoire, l'Etat malgache ne pourra délivrer de certificat zoosanitaire pour ses exportations en Europe ce qui mettrait en péril la filière

- un appui à la formation des partenaires (personnel de l'autorité compétente notamment).

La plateforme de diagnostic, mise en place progressivement depuis avril 2007 selon les normes, lignes directrices et recommandations de l'OIE, permettra :

- la confirmation d'épidémies et/ou recherche de l'étiologie des phénomènes anormaux (de mortalité)

- la surveillance zoosanitaire au profit des opérateurs privés

- la réalisation du programme officiel de contrôle et de surveillance zoosanitaire de la filière crevette de Madagascar

- l'établissement du statut zoosanitaire du pays vis-à-vis des maladies de la liste de l'OIE.

Les travaux d'aménagement général ont débuté en juillet 2006. Les locaux ont été réceptionnés en novembre 2006 sous réserve de finitions achevées en avril 2007. Dans le même temps, les gros équipements de laboratoire ont été installés. Le LES a été inauguré le 16 avril 2007.

L'année 2007 a été consacrée, au plan inter-partenarial (ASH/AFD/IPM), à la mise en place du comité de pilotage du projet (au minimum : 2 réunions par an), aux visites de reconnaissance des sites aquacoles et à la participation à des ateliers intéressant la filière (WWF : Principes et critères pour la certification des fermes d'aquaculture de crevettes *P. monodon* à Madagascar ; GAPCM : atelier sur les maladies listées à l'OIE et les maladies émergentes et sur le plan national de biosécurité). Au plan du fonctionnement du laboratoire, les activités ont été centrées sur la réalisation de notre programme d'optimisation, de validation des différentes techniques de diagnostic (en histologie, bactériologie, biologie moléculaire) et de formation-habilitation du personnel aux analyses.

### • Activités d'expertise et d'analyses

Parallèlement à l'installation du LES, nous avons répondu à une demande d'expertise d'un opérateur aux prises avec des épisodes de mortalité d'étiologie non identifiée. A titre de " prestations pilotes ", nous avons effectué 2 missions sur site, la première en période de post-épidémie en collaboration avec leur consultant extérieur (février 2007) et la seconde à l'acmé d'une nouvelle épidémie (mai 2007).

Les analyses bactériologiques ont été réalisées par le LES tandis que les analyses virologiques ont été confiées à un laboratoire étranger, ces dernières n'étant pas encore en place au LES. Les analyses histopathologiques ont été réalisées dans les deux laboratoires.

Le traitement des prélèvements effectués par le LES, mis en culture sur place, a été poursuivi à l'IPM. En dehors de ces missions d'expertise, certains échantillons nous ont été transmis sous forme de culture sur gélose. L'identification par PCR des vibrios a été réalisée au LES.

Les analyses bactériologiques ciblaient la flore *Vibrionaceae*. Les résultats obtenus à partir de culture d'hémolymphe d'animaux apparemment sains prélevés

hors période épidémique ont montré la présence d'une flore *Vibrionaceae* à très faible concentration chez un petit nombre d'animaux.

Par contre, les cultures obtenues à partir d'animaux moribonds prélevés en période épidémique présentent une charge bactérienne importante avec prédominance de *Vibrios spp* et de vibrios communs (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*) sur identification phénotypique. Antibiogramme et CMI ont été réalisés pour les souches majoritairement retrouvées.

Les lésions observées au niveau de divers tissus provenant d'animaux moribonds aux côtés de la présence de bactéries Gram négatif, suggèrent une vibriose systémique. La recherche des virus White Spot Syndrome Virus (WSSV), Yellow Head Virus (YHV), Taura Syndrome Virus (TSV) a été négative.

Compte-tenu des informations clinico-épidémiologiques et de ces résultats, nous avons fait l'hypothèse de la présence *V. nigripulchritudo*, bactérie associée à des phénomènes de mortalité dans les bassins d'élevage de crevettes *Litopenaeus stylirostris* de Nouvelle-Calédonie. Les techniques mises en œuvre lors de notre 2<sup>ème</sup> mission ont permis de détecter sa présence chez une crevette moribonde. Son identification a été faite par la recherche de ses caractères phénotypiques et par caractérisation moléculaire au LES. On notera que c'est la première description de *V. nigripulchritudo* à Madagascar et chez *P. monodon*. D'autres espèces de vibrios sont présentes au milieu d'une charge bactérienne importante comparativement à la crevette saine chez qui nous n'avons pas isolé de *V. nigripulchritudo*. D'autres souches de *V. nigripulchritudo* ont été isolées tout au long de la période épidémique. La virulence intrinsèque de ces souches sera étudiée avec la collaboration de l'Unité de Plasticité du Génome à l'Institut Pasteur à Paris (UGP : D Mazel & F Leroux) et du Laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (C. Goarant). Un premier positionnement de ces souches dans l'arbre

phylogénétique des *V. nigripulchritudo* a été réalisé à l'UGP. Des études ultérieures de ces souches de *V. nigripulchritudo* mais aussi des souches prédominantes isolées également chez des crevettes moribondes, seront menées pour établir plus précisément l'étiologie de cette maladie compte-tenu de la diversité génétique de ce germe et du processus pathogénique associé.

L'hypothèse d'une infection latente ou de co-infection virale (non WSSV, non YHV, non TSV) n'est toutefois pas rejetée. Ces analyses doivent être complétées par un programme de suivi microbiologique et épidémiologique comprenant des analyses en microscopie ultra-structurale.

#### • Activités de formation

En matière de formation au profit des agents de l'ASH, deux sessions d'introduction aux maladies des crevettes et aux modalités de prélèvement de crevettes pour analyses, avec remise à niveau en bactériologie et virologie ont été réalisées (juin et septembre 2007).

#### • Perspectives

Le comité de pilotage du 18 décembre 2007 a pris acte de la programmation des activités de surveillance nationale pour 2008 par l'Autorité Compétente sous-tendues à la mise en place effective de la réglementation malgache. Le LES est d'ores et déjà opérationnel pour effectuer une grande partie des analyses en pathologie des crevettes. Une liste des prestations a été fournie aux opérateurs et aux membres du comité de pilotage. Les années 2008-2009 s'inscriront dans la perspective de la finalisation du système qualité du LES. Les problèmes rencontrés mettent en exergue les besoins de recherche dans le domaine des pathologies bactériennes et virales qu'il conviendra de combler par l'établissement de collaborations, l'accueil d'étudiants et la recherche de financement spécifique.



---

---

# **ACTIVITES DE FORMATION**

---

---

---

---

# ACTIVITES DE FORMATION

---

---

## ***Considérations générales***

*Les activités de formation représentent l'une des quatre missions traditionnelles des Instituts Pasteur du Réseau International. L'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) est fidèle à cette mission et ses scientifiques sont très souvent sollicités.*

*A Madagascar, la formation concerne la formation continue du personnel de l'Institut et également l'enseignement et l'accueil en stages de personnes extérieures.*

*L'IPM participe à deux enseignements majeurs à Madagascar : l'internat qualifiant en biologie médicale, et la formation des techniciens de laboratoire pour laquelle il a été désigné maître d'œuvre par le Ministère de la Santé et du Planning Familial.*

*L'IPM continue d'accueillir de nombreux stagiaires malgaches et étrangers, et de susciter autour de ses activités la possibilité de travaux de thèses d'exercice, DEA et thèses d'université.*

*Un effort tout particulier a été fait ces dernières années pour promouvoir la formation continue du personnel et pour favoriser les thèses en cotuelles entre l'Université d'Antananarivo et une université française. Une ligne budgétaire spécifique a été créée pour cela.*

# Formations

## 1- Formation continue d'agents de l'IPM

### 1.1 A Madagascar

- **Personnels cadres de l'IPM et plus particulièrement de l'unité d'épidémiologie.** Formation interne en statistique et épidémiologie (VENDREPI) (tous les vendredi pendant un semestre), IPM Antananarivo. Organisateur : IPM; Financement : IPM.

- **Andriamamonjy S, Andriamandimby SF, Andrianaivoarimanana V, Andrianaivolambo L, Andrianantara L, Botorafy J, Corradi E, Hustache H, Lalahaivony C, Rabemanantsoa S, Rahalison L, Raharimanga V, Raharinivo LZ, Raharison H, Rahelinirina S, Rajaomiarisoa E, Rajerison FH, Rajerison M, Rakotoarivo AT, Rakotomalala E, Rakotomalala H, Rakotomalala S, Rakotomanana F, Rakotondrainy S, Rakotoniaina JC, Ramalahanoharana H, Ramanitriniony MV, Ramarosata F, Rambolantiana Rahasana E, Ramiadantsoa B, Ramiandrasoa R, Ramiandrasoa V, Ranaivo G, Randriaharilantsoa FE, Randriamanantena A, Randrianasolo L, Randrianirina F, Randrianja S, Ranjalahy M, Rasolonavalona T, Rasoamalala G, Rasoamalala L, Rasolofo S, Rasolofo V, Rason MA, Ratovonjato J, Ratsima E, Ratsimbasoa A, Ravaoalimalala V, Ravaonindrina N, Raveloniaina D, Ravojarahison A, Ravololonandrianina P, Ravoniarimbina P, Razafindralambo F, Razafindrambola H, Razafitrimo G, Razainirina J, Razanadrasoa FB, Razanakoto LM, Razanampanjato R, Razanatsiorimalala S, Vaillant L, Vololonirina EJ.** Cours d'Anglais, IPM Antananarivo (Août 2007 - Mars 2008). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

### 1.2 A l'extérieur de Madagascar

- **Rakotosamimanana N** : Stage Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle. *Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule*, Institut Pasteur Paris (8 janvier au 20 février). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

- **Rakotosamimanana N** : Stage Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle. *Etude de la virulence de Mycobacterium tuberculosis* (pour thèse de Sciences en cotutelle). Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur,

Paris (21 février au 30 juin). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

- **Ratsimbasoa A** : Diplôme Universitaire. *Lutte Antipaludique*. Faculté de Médecine de Marseille (avril). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

- **Gouali M** : Participation au Cours International de Sécurité Alimentaire. *Microbiologie des aliments : boissons, végétaux et produits de la mer - viandes et produits carnés*. Institut Pasteur de Lille (14 mai au 08 juin). Organisateur : IP Paris; Financement : IP Paris.

- **Rahelinirina S** : Stage sur la génétique des populations de rongeurs (microsatellites) des rongeurs au CBGP-IRD de Montpellier (21 mai au 11 Août). Organisateur : IPM; Financement : Bourse IPM.

- **Rason MA** : Stage en radioprotection. *Personne compétente en radioprotection - sources non scellées hors INB*. CEA/Saclay, Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires (02 au 14 juin). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

- **Andriantsoanirina LV** : Stage Thèse de Sciences. Laboratoire de parasitologie, Hôpital Avicenne Bobigny (02 août au 02 novembre); Stage Plateforme Génopôle, Institut Pasteur de Paris. Organisateur : IPM; Financement : IPM/SCAC.

- **Randremanana RV** : Formation Master 2 Recherche. *Méthodes de Recherche sur l'Environnement et la Santé*. Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble. (23 septembre 2007 au 23 janvier 2008). Organisateur : IPM (Bourse EGIDE); Financement : IPM/SCAC.

- **Ravaoarisoa E** : Stage sur « Production de fragments d'anticorps stabilisés pour la détection du paludisme ». Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites, Institut Pasteur Paris. (30 septembre 2007 au 03 mars 2008). Organisateur : IPM (Bourse EGIDE); Financement : IPM/DAI.

- **Ranjalahy M** : Formation continue expérimentation animale niveau II et visite d'observation en Animalerie. Centre de Formation Professionnel et de Pro-

motion Agricoles (CFPPA) à Areines Vendôme (Formation technicien animalier Habilitation II) (19 novembre 2007 au 23 novembre 2007); Institut Pasteur Paris (Stage d'observation à l'Animalerie Centrale) (26 novembre au 04 décembre). Organisateur : IPM (Bourse SCAC); Financement : IPM/SCAC/IRD Montpellier.

- **Andriamandimby SF** : Formation par correspondance pour Diplôme Universitaire. *Méthodes et Pratiques en Epidémiologie*. Université Bordeaux 2 (2006-2007). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

- **Raholiarimalala Annie** : Formation continue à distance. *Cours de première année en Droit par téléenseignement*, CNTEMAD Antananarivo. (2007-2008). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

- **Rakotondrainy S** : Formation continue à distance. *RNCP niveau II - Concepteur architecte informatique - option réseaux et systèmes*, CNAM Réunion. (2007-2008). Organisateur : IPM; Financement : IPM.

## 2- Formations ou stages en cours à l'IPM

### 2.1 Thèses de sciences

- **Andriantsoanirina V** : Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Unité Paludisme. *Apport des nouveaux outils de biologie moléculaire dans l'évaluation et la surveillance de la résistance de P. falciparum aux principaux antipaludiques utilisés à Madagascar*. Faculté des Sciences, Université de Paris 13 et Université d'Antananarivo.

- **Barnadas C** : Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Unité Paludisme. *Epidémiologie moléculaire et résistances de Plasmodium vivax aux antipaludiques à Madagascar*. Institut des Sciences Pharmaceutique et Biologique, ISPB Lyon.

- **Barnadas C** : Doctorat en Pharmacie. Unité Paludisme. *Efficacité de la chloroquine face au paludisme causé par Plasmodium malariae à Madagascar*. Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologique - ISPB Lyon.

- **Thonier V** : Master 2. Unité Paludisme. *Fréquence et distribution ethnique de la drépanocytose à Madagascar : une hémoglobinopathie impliquée dans l'épidémiologie*

*du paludisme*. " Neurosciences et Parasitologie Tropicales ", Université de Limoges.

- **Nijssen E** : Master 2. Unité Peste. *Techniques de prolifération cellulaire après stimulation par l'AgF1 dans le modèle rat*. Université de Leiden et de Delft, Pays-Bas.

- **Raharimanga V** : Master de recherche en Santé publique. Unité d'épidémiologie. *VHA: séro-prévalence et facteurs de risque dans la population des 2 - 24 ans d'Antananarivo*. Institut National de Santé Publique et Communautaire, Antananarivo.

- **Rahelinirina S** : Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Unité Peste. *Suivi des déplacements de réservoirs - structuration génétique des populations et risque pesteux en zone d'endémie à Madagascar*. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

- **Rakotomanana F** : Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Unité Epidémiologie. *Apport d'un Système d'Information Géographique et de la télédétection dans la prévention du risque de survenue d'épidémie de paludisme sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar*. Spécialité : Sciences de l'Information Géographique. Ecole Doctorale Information, Communication, Modélisation et Simulation, Université Paris-Est, Marne-La-Vallée.

- **Rakotosamimanana N** : Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Unité des Mycobactéries. *Marqueurs immunologiques et génétiques de l'immunité anti-tuberculeuse*. Thèse en cotutelle de l'Université d'Antananarivo et de l'Université de Paris 6.

- **Randremanana RV** : Unité Epidémiologie. *Modélisation du risque de tuberculose pulmonaire dans la ville d'Antananarivo, Madagascar*. Spécialité : Méthodes de recherche en Environnement et Santé. Université Joseph Fourier - Grenoble 1.

- **Saïd Tohir AHO** : Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Unité des Mycobactéries. *Outils diagnostiques de la tuberculose*. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

- **Tollenaere C** : Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Unité Peste. *Evolution de la résistance à la peste chez R. rattus à Madagascar*. Université de Montpellier II.

### 2.2 DEA

- **Andriamihantsoa L** : Unité des Mycobactéries.

*Application de la PCR en temps réel pour l'étude de l'expression de gènes de l'apoptose dans l'immunité anti-tuberculeuse.* Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

- **Rabemiarana J** : Unité des Mycobactéries. *Evolution des souches de M. tuberculosis de 1994 - 2006.* Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

- **Ramanoelina MA** : Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement. *Etude de la fréquence de portage du niveau de contamination et de la résistance aux antibiotiques des flores pathogènes présents sur les poulets de chair au stade de l'abattage.* Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

- **Razanakoto L** : Unité Peste. *Evaluation d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de la peste.* Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

### 2.3 Doctorat en Médecine

- **Andriamiarisoa MP.** Unité d'Epidémiologie. *La démographie canine et les facteurs de risque de rage dans la Commune Urbaine d'Antananarivo (étude réalisée dans le quatrième arrondissement).* Faculté de Médecine, département vétérinaire, Université d'Antananarivo.

- **Fanazava L.** Unité Paludisme. *Evaluation des caractéristiques techniques de 2 tests de diagnostic rapide du paludisme (SD Bioline Malaria Ag Pf cat. 05FK50 et SD Bioline Malaria Ag Pf/Pan cat. 05FK60) en terme de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative (VPP, VPN).* Faculté de Médecine, Université de Mahajanga.

- **Faniriko M.** Unité Paludisme. *Implications de la pression médicamenteuse et des migrations humaines dans la résistance des souches de Plasmodium falciparum à Madagascar.* Faculté de Médecine, Université de Mahajanga.

- **Herindrainy P.** Unité Paludisme. *Estimation du poids du paludisme à Madagascar.* Faculté de Médecine, Université de Mahajanga.

- **Raharimanana S.** Unité d'Epidémiologie. *La démographie canine et les risques d'épidémie de rage dans la Commune Urbaine d'Antananarivo (étude réalisée dans le quatrième arrondissement).* Faculté de Médecine, département vétérinaire, Université d'Antananarivo.

- **Rakalomanana FA.** Unité d'Epidémiologie. *La démographie canine et son importance pour la transmission de la rage dans le deuxième et le troisième arrondissement.* Faculté de Médecine, département vétérinaire, Université d'Antananarivo.

- **Rakotonandrasana H.** Unité d'Epidémiologie. *Chiens et risques de la rage dans la commune Urbaine d'Antananarivo (premier et sixième arrondissements).* Faculté de Médecine, département vétérinaire, Université d'Antananarivo.

- **Ramalanjaona L.** Unité Paludisme. *Caractéristiques épidémiologiques du paludisme dans la ville d'Antananarivo.* Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo.

- **Ratovoson RCH.** Unité d'Epidémiologie. *L'intradermoréaction à la tuberculine dans la lutte contre la tuberculose.* Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo.

- **Ravelonarivo J.** Unité Paludisme. *sConnaissances et pratiques des femmes enceintes face au paludisme dans la capitale.* Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo.

### 2.4 DES

- **Rakotoarivelo RA.** Unité Paludisme. Mémoire de Diplôme d'Etude en Formation Spécialisée (DEFS) en Médecine Interne. *Paludisme en milieu hospitalier observé au Centre Hospitalier Universitaire d'Antananarivo.* Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo.

- **Rakotoarivony M.** Unité Paludisme. *Le paludisme dans la commune urbaine d'Antsirananana.* Institut National de Santé Publique et Communautaire.

### 2.5 Stages techniques et professionnels

- **Allain Launay C** : Unité Epidémiologie. Stage d'été en géographie de la santé. *Etude du profil socio-économique des quartiers d'Antananarivo.*

- **Caillet C** : Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement. Stage de 5<sup>ème</sup> année en Pharmacie. *Etude du profil socio-économique des quartiers d'Antananarivo.*

- **Chomel de Varagnes S** : Unité des Mycobacté-

ries. Stage de 5<sup>ème</sup> année hospitalo-universitaire. *Détection de la résistance de M. leprae à la rifampicine à l'aide de deux techniques de PCR, à partir de sérums fixés sur lame.* Faculté de Pharmacie, Université de Lyon 1.

- **Marceau G** : Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement. *Stage pratique sur les techniques d'analyses microbiologiques des produits alimentaires et de l'eau.* ESTBA de Paris.

- **Mariette N** : Unité Paludisme. *Etude du polymorphisme des protéines de Plasmodium falciparum et Plasmodium vivax impliquées dans les tests de diagnostic rapide du paludisme utilisés à Madagascar.* Stage fondation Pierre Ledoux - Jeunesse Internationale, 14<sup>ème</sup> appel d'offres.

- **Randriamampianina O** : Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement. *Stage pratique sur les techniques d'analyses microbiologiques des*

*produits alimentaires et de l'eau.* Ecole supérieure Agronomique Antananarivo.

- **Ramsamy V, Lan Keng L** : Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement. *Stage pratique sur les techniques d'analyses microbiologiques des produits alimentaires et de l'eau.* Laboratoire Central de Candos (Ile Maurice).

- **Vaillant L** : Unité d'Epidémiologie. *Stage pratique sur l'infection nosocomiale.* Université de Lyon.

- **21 étudiants en 4ème année de médecine** : Laboratoire Central de la Bilharziose. *Stage pratique sur la connaissance des schistosomes et les méthodes de diagnostic.* Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo.

- **4 élèves du Collège de France d'Ambohitovo et 3 du Lycée Français d'Androhibe** : *Séquence d'observation en milieu professionnel à l'IPM.* ¶

## Enseignements

Les cadres scientifiques de l'IPM participent activement aux enseignements théoriques et pratiques donnés dans le cadre de plusieurs enseignements :

### 1- Atelier Paludisme

(<http://www.pasteur.mg/Atelier-Palu/>)

Organisateur :

Groupe de Recherche sur le Paludisme - IPM

Coordination :

O Domarle, D Menard, C Moustache, S Rakotomalala, M Randrianariveolosia, E Rakotomalala, L Rasolofoharinoro

Financement :

IP Paris/DAI, Impact Malaria/Sanofi Aventis, Fondation Mérieux, Natixis, OMS /Roll Back Malaria Bureau Océan Indien : 70 000 €

L'atelier paludisme 2007, cinquième session, a été organisé à l'Institut Pasteur de Madagascar sous le haut patronage du Ministre de Santé et du Planning Familial de Madagascar. Il a réuni des apprenants autour du paludisme sur les thèmes de la santé publique et de la recherche. Durant six semaines de formation, les apprenants ont eu à préparer eux-mêmes leurs conférences sur des sujets des plus généraux aux plus spécialisées pour approfondir leurs connaissances. Ils ont été assistés par des facilitateurs venus de l'étranger, des chercheurs réputés, qui leur ont fait partager leurs expériences et leur savoir-faire. Toute la formation est

basée sur l'Apprentissage par Problème qui consiste à mettre les apprenants en situation. Plutôt que de donner les informations dans des cours magistraux. Les apprenants sont mis dans un processus actif de recherche d'informations qu'ils doivent collecter, comprendre, synthétiser, reformuler pour correspondre au thème qui leur a été imposé, et enfin soutenir devant un jury. Dans une perspective à long terme, ce principe de formation permet aux bénéficiaires d'acquérir un outil d'autoformation renforcé par un esprit critique inculqué par les facilitateurs. En cela, le rôle des facilitateurs est capital pour transférer aux apprenants les bases fondamentales de la recherche et de la lutte contre le paludisme, et comprendre les grands mouvements stratégiques qui rallient ou opposent les spécialistes.

In fine, les apprenants renforcent leurs qualités d'experts. La session 2007 a accueilli 16 apprenants dont 4 Malgaches, 1 du Gabon, 1 de Mauritanie, 1 du Burkina Faso, 2 du Mali, 1 de RDC, 1 de Côte d'Ivoire, 1 du Niger, 1 du Sénégal, 1 de Mayotte et 2 de l'Union des Comores. Le nombre de pays représentés est en



constante augmentation depuis 2003. Ces apprenants ont été sélectionnés parmi 35 dossiers de candidatures. Pour les encadrer, 13 facilitateurs sont venus en renfort de l'étranger: d'Amérique du Nord, d'Asie, d'Europe et d'Afrique.

L'Atelier Paludisme totalise aujourd'hui 76 apprenants formés. Les anciens apprenants des sessions 2003 à 2006 ont fait l'objet d'une enquête par questionnaire pour évaluer l'impact de l'Atelier sur leurs activités professionnelles: 68% des anciens apprenants ont répondu à l'enquête de suivi, 88% d'entre eux déclarent être mieux aptes à assumer leurs fonctions depuis l'Atelier, 73% ont présenté des conférences et 80% d'entre eux ont dispensé des formations, et 63% des répondants estiment que l'Atelier leur a été bénéfique pour les démarches de recherche de financements. Enfin, ce document présente les résultats du rapport d'audit externe de la formation et les innovations de la session 2007 avec en particulier le scénario imaginé par les facilitateurs pour mettre les apprenants en situation d'élaboration de programme national de lutte.

## 2- Internat Qualifiant en Biologie Médicale

*Organisateur : Faculté de Médecine,  
Université d'Antananarivo*  
*Coordination : JF Carod*  
*Financement : Faculté de Médecine,  
Université d'Antananarivo*

4 internes en médecine suivent à tour de rôle une formation dans les disciplines pratiquées au CBC avec une formation complémentaire dans différents services de recherche auxquels nous sommes reliés (paludisme, virologie, parasitologie...).

Ils se répartissent dans toutes les spécialités du CBC en suivant le planning organisé par la Faculté d'Antananarivo pour des périodes allant de 2 à 4 mois selon la spécialité.

Sur le plan pratique, un biologiste est systématiquement présent à la paillasse et contribue ainsi directement à la formation pratique des internes.

## 3- Atelier de formation rage

*Organisateur : IPM*  
*Coordination : M Ratsitorahina, V Richard*  
*Financement : DAI/IP Paris*

La formation proposée correspondait à un besoin réel lors d'un changement dans les pratiques. Il faut souligner l'importance pour la population malgache de disposer de vaccins antirabiques modernes, efficaces et sûrs, et dont l'utilisation est moins contraignante.

## 4- Formation des techniciens du CBC

*Organisateur / Coordination : JF Carod*  
*Financement : IPM*

La formation est basée sur une méthode interactive par présentation de cas clinico-biologiques, la partie pré-analytique est renforcée et une démarche critique face aux méthodes et aux résultats est sollicitée. Les cours, sauf exceptions, sont réalisés par les techniciens pour les techniciens à raison d'une séance tous les 15 jours. Chaque intervenant bénéficie de l'appui systématique d'un biologiste.

## 5- Formation initiale d'élèves techniciens de laboratoire

*Organisateur : Ecole de techniciens de laboratoire de Madagascar (ETLM)*  
*Coordination : ETLM, JF Carod*  
*Financement : ETLM*

La participation du CBC consiste à réaliser les commandes de matériels et réactifs pour l'école des techniciens. Le CBC a aussi un appui pédagogique en fournissant les échantillons pour les TP de microscopies et de culture bactériologique. Il a aussi réalisé un CD-ROM éducatif de microscopie utile pour les séances de révisions. Enfin, le CBC a organisé et encadré des TP de mycologie, bactériologie et organisé au sein de l'IPM des séances de révisions avant l'évaluation finale. Le chef de service a été impliqué dans la notation finale après la mise en situation professionnelle sur site. Depuis fin 2006, le CBC accueille en continu les élèves techniciens de laboratoire, au même titre que les internes en biologie médicales, comme stagiaires en continue par tronçons de 5 semaines. Le CBC s'inscrit ainsi comme 3<sup>ème</sup> site de stage permanent sur la capitale pour les étudiants en 2<sup>ème</sup> année.

## 6- Cours URSIDA II

*Organisateurs : JF Carod, F Randrianirina, E Ratsima*  
*Collaboration : JF Carod, F Randrianirina, E Ratsima, V Rasolofo, H Ramarokoto, JM Reynes, E Coradi*  
*Financement : Coopération Française*

Ce cours régional de la zone de l'Océan Indien sur la "Prise en charge au laboratoire des patients vivants avec le VIH/SIDA" a accueilli 14 stagiaires du 03 au 14 décembre 2007 soit une durée d'enseignement de 10 jours ouvrables.

La formation s'est composée de :

- une partie théorique avec des cours magistraux sous forme de présentation Power Point le petit effectif des candidats permettant une forte interactivité.

---

---

# **ACTIVITES DE SERVICE**

---

---

---

---

# ACTIVITES DE SERVICE

---

---

## ***Considérations générales***

*L'IPM met à la disposition de la population, des organismes publics et privés, et des entreprises, un certain nombre de services pour lesquels il assure souvent, de fait ou sur titre, un rôle de référence.*

*Certains de ces services sont totalement gratuits, c'est le cas de la mise à disposition du vaccin antirabique sur l'ensemble du territoire malgache.*

*D'autres sont payants, comme les analyses médicales, les contrôles bactériologiques alimentaires ou les services du Centre international de vaccination. Dans ces cas, il existe toujours au sein de l'unité une activité de santé publique ou de formation qui prolonge l'activité de service.*

*Les activités payantes, selon un tarif modulé en fonction des catégories sociales et des possibilités de prise en charge par des organismes ou entreprises, contribuent aux ressources propres de l'IPM, totalement réinvesties dans le soutien des interventions et recherches en Santé Publique.*

# Centre de Biologie Clinique

- **JF Carod** : pharmacien biologiste, chef de service - laboratoire d'analyses biomédicales
- **EH Ratsima** : médecin biologiste, adjoint au chef de service - laboratoire d'analyses biomédicales
- **F Randrianirina** : médecin biologiste, adjoint au chef de service - laboratoire d'analyses biomédicales
- **C Raharisolo Vololonantenaina** : médecin, responsable du laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques
- **JB Chrétien** : pharmacien biologiste, volontaire international (jusqu'au 30 avril)
- **E Corradi** : pharmacien biologiste, volontaire international (à partir du 1<sup>er</sup> mai)

## Laboratoire d'analyses biomédicales (LABM)

• *L'IPM, centre de recherche biomédicale met ses compétences et ses capacités techniques au service du public en lui offrant le plus large éventail possible d'analyses médicales réalisées au Centre de Biologie Clinique (CBC) dans les meilleures conditions de fiabilité, de rapidité et de coût.*

• *Les moyens techniques et les compétences du CBC sont aussi mis au service de divers protocoles de recherche de l'IPM ou de l'extérieur. Par ailleurs, au sein du CBC, se développent des programmes spécifiques et multicentriques de recherche opérationnelle au sein du Réseau International grâce notamment à l'embauche de deux médecins biologistes malgaches.*

• *Par son recrutement et ses techniques de référence, le CBC joue un rôle important dans la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et la réponse rapide aux épidémies. Le CBC associé au LHAÉ est Centre National de Référence pour *Vibrio cholerae*, *Salmonella* et *Shigella*.*

• *Enfin, le CBC tient un rôle majeur en participant à la formation théorique et pratique des médecins biologistes et techniciens de laboratoire à Madagascar.*

## 1- Principales ressources en matériels

### 1.1 Matériels informatiques

- 1 Unité centrale : UNIX Escala E250 (4.5MgB)
- 22 micro-ordinateurs servant d'écrans à l'unité centrale
- 16 imprimantes dont 2 code barre pour l'accueil
- 1 logiciel GALAXY II de la société Hexaflux.

### 1.2 Automates de laboratoire

- *Biochimie* :
  - 1 VITROS 250 (avec connexion bidirectionnelle, identification code barre)
  - 1 VITROS 350 (avec connexion bidirectionnelle,

identification code barre)

- 1 Générateur d'électrophorèse Helena (intégrateur inclus)

- 1 Automate d'HbA1c DIASTAT Biorad.

• *Hormono/Immuno* :

- 1 Mini VIDAS Biomérieux

- 2 VIDAS Biomérieux en connexion mono-directionnelle

- 2 AxSYM ABBOTT (automates multiparamétriques avec lecteur code barre, connexion bidirectionnelle).

• *Hématologie* :

- 1 Start 4 Stago

- 1 centrifugeuse Carte gel Groupe RAI BIORAD

- 1 centrifugeuse Carte gel Groupe DIAMED

- installation de 2 Automates Sysmex ® : XT2000i et XT1800i

• *Bactériologie* :

- 1 OSIRIS BIORAD (reçu dans le cadre du projet FSP/résistance)

- 1 Inoculateur pour CMI (reçu dans le cadre du projet FSP/résistance).

## 2- Activités mensuelles comparées du LABM (2006-2007)

Tableau I : Activités exprimées en "B"

Mois	2006	2007	Différence
Janvier	891 469	921 482	+ 30 013
Février	870 403	994 067	+ 123 664
Mars	948 316	927 911	- 20 405
Avril	828 426	913 837	+ 85 411
Mai	885 891	905 280	+ 19 389
Juin	724 201	737 875	+ 13 674
Juillet	764 661	922 644	+ 157 983
Août	809 549	887 495	+ 77 946
Septembre	820 636	895 628	+ 74 992
Octobre	804 112	1 069 944	+ 265 832
Novembre	785 793	1 009 106	+ 223 313
Décembre	591 880	793 172	+ 201 292
<b>Totaux</b>	<b>9 725 337</b>	<b>10 978 441</b>	<b>+ 1 253 104</b>
<b>Evolution</b>	<b>+ 13% sur les 12 mois</b>		

### 3- Activités annuelles comparées du LABM (2006-2007)

Tableau II : Répartition par " Correspondants "

Correspondant	2006	2007	Différence
<b>A (Tarif de base)</b>	26 803	30 630	14%
<b>B (Tiers payant)</b>	7 045	6 094	-13%
<b>C (Tarif normal)</b>	3 290	3 697	12%
<b>D (Administration)</b>	9 597	11 302	18%
<b>E (Extérieurs payants)</b>	4 341	6 335	46%
<b>G (Gratuit)</b>	360	491	36%
<b>Divers (Recherche...)</b>	2 543	1 252	-51%

### 4- Activités de service en biologie médicale

Parmi les 59 802 dossiers traités par le laboratoire, près de 13 % concernent des enfants :

de 0 à 1 an : 1 241 dossiers

de 1 à 5 ans : 2 572 dossiers

de 5 à 15 ans : 3 976 dossiers

Prélèvements reçus de l'extérieur : 7 539 dossiers - 34% par rapport à l'année 2006 (les patients ont tendance à se faire prélever directement au laboratoire).

La liste des examens réalisables au CBC est consultable sur le site Internet de l'IPM.

Le panel d'examens proposé est :

- Biochimie sanguine 42 paramètres différents
- Biochimie urinaire 21
- Biochimie divers 2
- Hormonologie 17
- Marqueurs tumoraux 4
- Hématologie 16
- Sérologie bactérienne 7
- Sérologie virale 11
- Sérologie parasitaire 7
- Bactériologie 17
- Mycobactériologie 4
- Parasitologie 12
- Immunologie 5
- Biologie reproduction 2
- Virologie 1
- Anatomopathologie 8

Les examens les plus demandés en 2007 ont été :

- Numération Formule 21 743
- Glycémie 15 160
- V.S. 14 533

- Créatinine 14 041
- Cholestérol 11 590
- Triglycérides 10 785
- K/Na/Cl 9 834
- Transaminases 9 127
- Urée 8 526
- Sérologie Cysticercose : 6 490

#### La qualité au CBC

- La généralisation des contrats de maintenance pour les automates.

- La structuration de la cellule qualité du CBC : 2 techniciens correspondants qualité et un responsable hygiène et sécurité, 4 biologistes vérificateurs.

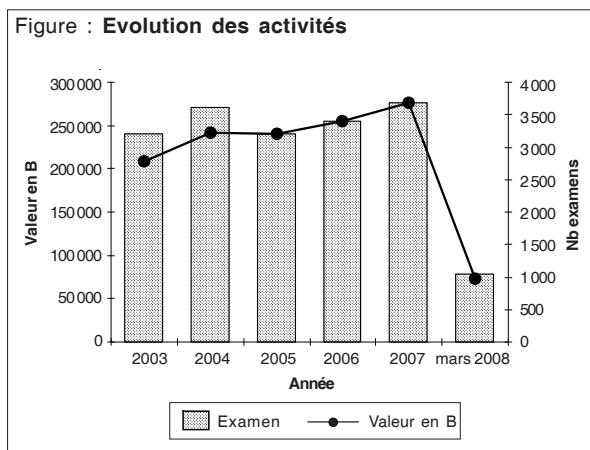
- La standardisation de présentation des Modes Opérateurs et Procédures a été poursuivie (utilisation du modèle de procédure de l'IPM), objectif : clôture de l'ensemble des MO et procédures analytiques.

- La poursuite du programme de contrôle de Qualité interne et externe a été poursuivi au cours de l'année 2007 avec mise en place complète de :

- contrôle interne quotidien pour la biochimie sanguine PROBIOQUAL
- contrôle interne quotidien pour l'hématologie cytologie EUROCELL DIAGNOSTIC
- contrôle interne quotidien pour l'hématologie coagulation PROBIOQUAL
- contrôle interne pour les CD4/CD8 HYCELL
- contrôle interne quotidien pour vitesse de sédimentation EUROCELL DIAGNOSTIC
- contrôle interne pour réticulocytes EUROCELL DIAGNOSTIC
- contrôle interne antibiogramme régulier Bactériologie (Souche ATCC).
- contrôle interne mensuel hormonologie - marqueurs PROBIOQUAL PBQ Interne
- contrôle externe hebdomadaire biochimie sanguine PROBIOQUAL
- contrôle externe mensuel pour la biochimie urinaire PROBIOQUAL
- participation au contrôle Français AFSSAPS biochimie, bactériologie, parasitologie, hormonologie-groupe sanguin
- participation au contrôle de " Office of Medical Services Laboratory Proficiency Testing Program ", Ambassade USA
- inscription au programme medecinim@ge : cytologie, hématologie, parasitologie, mycologie.

## Laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques

Globalement, les activités du laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques représentent 276 520 B, Elles correspondent à 3 686 demandes d'examen dont 70% sont des frottis cervicaux pour un examen de dépistage. L'évolution des activités depuis l'année 2003 est représentée par le graphique (figure).



Depuis l'année 2005, il existe une augmentation progressive du nombre des demande et du nombre de B, par conséquent une augmentation des chiffres d'affaire. Par rapport à l'année 2006, l'augmentation du nombre de B est de 10,5% et celle des chiffres d'affaire de 5,40%. La répartition selon les types d'examen est représentée par le tableau.

Tableau : Répartition des activités en 2007

Examen	Nb demandes	Valeur en B	%
Histopathologique	829	92 360	33,4
Cytologie cervico-utérine	2 573	154 380	55,8
Cytologie liquidienne	245	24 500	8,9
Cytoponction	33	3 960	1,4
Cytologie hormonale	6	1 320	0,5
<b>Total</b>	<b>3 686</b>	<b>276 520</b>	<b>100</b>

## Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement

- **M Gay** : ingénieur en microbiologie alimentaire et assurance qualité, chef de service (jusqu'au 31 août)
- **N Ravaonindrina** : médecin, adjoint au chef de service
- **M Gouali** : pharmacienne microbiologiste, responsable qualité
- **F Razafindralambo** : surveillante du laboratoire
- **YL Tam Teon** : conseiller qualité en entreprises
- **R Rasolomandimby** : correspondant qualité

Le projet d'accréditation du laboratoire par le COFRAC (comité français d'accréditation) pour le programme 59 (analyses microbiologiques des produits agro-alimentaires) a été atteint le 1<sup>er</sup> juillet 2007 après trois années de sensibilisation et de formation à la qualité qui ont permis de mettre en place un système de management de la qualité au laboratoire et un système documentaire comportant environ 350 documents qualité.

Le laboratoire est enregistré par le COFRAC sous le numéro I-1872. La liste des essais accrédités est consultable sur le site du cofrac ([www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)).

### ACTIVITES DE SERVICE

#### I- Analyses microbiologiques

##### 1- Résultats généraux

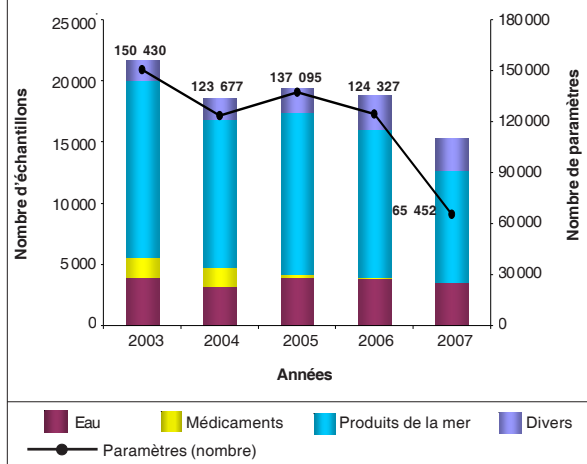
La baisse significative du nombre d'échantillons parvenant au laboratoire, toutes catégories confondues constatée en 2006 se poursuit en 2007, en effet le nombre d'analyse a chuté de 18% (18 755 échantillons

analysés en 2006 contre 15 301 en 2007), cette baisse significative de l'activité technique du laboratoire se répartit comme suit en fonction de la catégorie d'échantillons :

- . Produits de la mer : -25% (9 052 échantillons analysés)
- . Eaux : -10% (3 487 échantillons analysés)
- . Divers : -1% (2 663 échantillons analysés)
- . Médicaments : -13% (99 échantillons analysés)



Figure 1 : Evolution de l'activité du laboratoire (2003-2007)



## 2- Analyse des résultats par catégorie de produit

### • Produits de la mer (PDM)

La diminution globale des analyses des produits de la mer qui représentent 77,3% de l'activité du laboratoire s'explique essentiellement par :

- Le fait que l'autorité sanitaire halieutique (ASH) chargé du contrôle vétérinaire des produits de la mer à Madagascar a revu à la baisse ses plans d'échantillonnage pour les contrôles officiels.

L'amélioration de la qualité de ces produits au fil des années du fait des exigences de l'Union Européenne, de l'OAV (Office Alimentaire Vétérinaire), de la mise en place d'une démarche HACCP, voire d'une certification ISO 9001 au sein de certaines structures spécialisées dans l'aquaculture a permis cette révision des plans d'échantillonnage.

- La sortie le 15 mars 2007 d'un arrêté de l'ASH revoyant également à la baisse le nombre de paramètres microbiologiques à contrôler par échantillon, c'est ainsi que le dénombrement des microorganismes à 30°C, des coliformes thermotolérants, des staphylocoques à coagulase positive et des anaérobies sulfito-réducteurs a été supprimé pour les échantillons de crevettes.

Quant à la qualité de ces produits, celle-ci est en très faible baisse puisque l'on note 0,8% d'échantillons non-conformes en 2007 contre 0,6% en 2006.

### • Produits divers

La qualité microbiologique des produits agro-alimentaires autres que les produits de la mer est, quant à elle loin d'être satisfaisante et ce, quel que soit la catégorie de produit. Les pourcentages d'échantillons non-conformes se répartissent comme suit :

- Produits carnés : 34% contre 63,8% en 2006

- Produits laitiers et dérivés : 28% contre 7,6% en 2006

- Plats cuisinés : 25% contre 23,2% en 2006

- Conserves : 14,2%

- Autres : 12,7%

Ces résultats non satisfaisants s'expliquent par le fait que :

- il n'y a aucune exigence réglementaire et/ou nationale en matière de salubrité et sécurité des denrées alimentaires à Madagascar

- aucun texte réglementaire n'oblige une structure de restauration collective ou une entreprise agro-alimentaire à contrôler la qualité de ses produits finis

- le personnel exerçant dans ces structures n'est pas sensibilisé ni formé aux règles d'hygiène et ce, quel que soit sa fonction (personnel cadre ou ouvrier).

Bien que le laboratoire accompagne depuis déjà quelques années des structures de restauration collective, la qualité des produits au niveau de ces structures est très variable et très fluctuante et l'analyse microbiologique du produit fini ne semble pas suffisamment pertinente ni efficace pour alerter les responsables de ces structures sur les dangers liés à la non maîtrise de l'hygiène.

Aussi, depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2007, le laboratoire a revu sa façon de travailler avec ses clients et a mis en place de nouvelles dispositions qui permettront de répondre aux mieux à leurs besoins et d'améliorer la qualité des produits.

### • Eaux

#### - Eaux de baignade

Ces analyses concernent les eaux des piscines de la zone urbaine et suburbaine d'Antananarivo (Hôtels et centres de loisirs). On note une légère amélioration de la qualité globale de ces eaux, 19% de résultats non conformes en 2006 contre 21,5% en 2007.

#### - Eaux de boisson

*Les eaux brutes et les eaux de surface non traitées* continuent d'être un problème en santé publique à Madagascar, ces eaux sont consommées par la population et sont fortement contaminées par une flore d'origine fécale.

C'est ainsi que 15% des eaux de source, 36,8% des eaux de surface et 100% des eaux de puits et de forage sont non-conformes du fait de la présence d'*Escherichia coli* et/ou de streptocoques fécaux, témoins d'une contamination fécale.

### -Eaux d'adduction

Distribuées dans la capitale et les principales villes malgaches par la JIRAMA, Société d'Exploitation Industrielle de l'Eau et de l'Electricité, l'amélioration de la qualité de l'eau n'est pas significative par rapport à l'année 2006.

L'analyse des 86 sites de prélèvements situés sur tout le territoire national montre que 3,9% des échantillons d'eau prélevés sont non-conformes contre 4,1% en 2006.

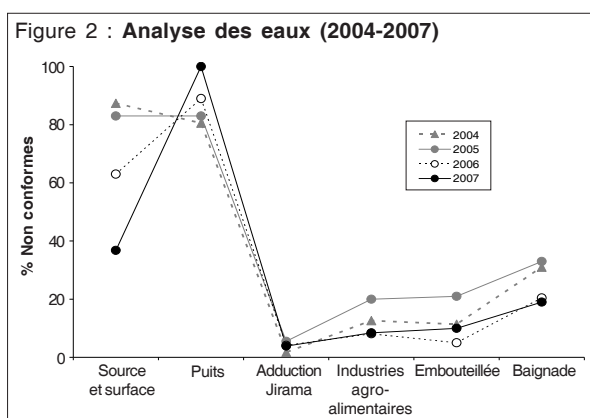
Il est à noter, que respectivement 7% et 5,9% des échantillons d'eau des provinces d'Antsiranana et de Toamasina sont de qualité bactériologique non satisfaisante.

### - Eaux des industries agro-alimentaires

La qualité de ce type d'eau est en légère diminution cette année, 8,4% de non-conformités contre 8,1 en 2006.

### - Eaux embouteillées

La qualité de ce type d'eau est passée de 5% d'échantillons non-conformes l'année dernière à 10% en 2007.



### • Produits pharmaceutiques et cosmétiques

L'activité de contrôle des médicaments a cessé totalement avec la fermeture de la paillasse d'analyses des endotoxines bactériennes dans les solutés massifs suite à l'arrêt de la production nationale au début de l'année 2005. Cependant le laboratoire a reçu 99 échantillons de produits cosmétiques dont 14,7% sont de qualité bactériologique non satisfaisante.

Cette activité de contrôle au laboratoire bien que stable connaît une diversification de sa clientèle et des catégories de produits à analyser. Le laboratoire a pour projet de développer cette activité (voir perspectives du laboratoire).

## II- Sérotypage des salmonelles

Dans le cadre des activités du CNR des Vibrions, Salmonelles et Shigelles en partenariat avec le

laboratoire de biologie clinique de l'IPM, le laboratoire a assuré le sérotypage de l'ensemble des souches de Salmonelles isolées à l'IPM selon la répartition suivante :

Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement		Centre de biologie clinique	
Sérovars	Nb Aliments incriminés	Sérovars	Nb Source
Othmarshen	1 Poisson	Enteritidis	5 coproculture
Enteritidis	1 Eau de rivière	Enteritidis	4 hémoculture
		Enteritidis	2 pus
		Enteritidis	1 LP
		Typhi	1 hémoculture
		Munster	2 hémoculture
		Braendrup	1 coproculture
		Virginia	1 coproculture

## ACTIVITES D'EXPERTISE

Un cas d'intoxication alimentaire collective a été enregistré au laboratoire :

- Il a touché 5 personnes ayant consommé du poisson fumé acheté dans une grande surface à Antsirabe. L'analyse d'échantillons a permis d'isoler une souche de Salmonelle (*Salmonella Othmarsden*).

## PERSPECTIVES

L'accréditation du laboratoire obtenue le 1<sup>er</sup> juillet 2007 est un acquis important qui permettra au laboratoire d'étendre ses activités et de proposer ses services à d'autres filières agro-alimentaires que la filière halieutique ainsi qu'à d'autres pays de l'Océan Indien et de la région dans le cadre des marchés régionaux de libre échange tels que la SADC, la COMESA ou la COI.

La direction du laboratoire souhaite également promouvoir ses activités et ses compétences surtout en matière d'audits, de formation en HACCP et hygiène alimentaire. Pour cela, le laboratoire a, dès septembre 2007, réalisé deux nouvelles plaquettes de présentation des activités du laboratoire et rencontré tous ses clients d'Antananarivo spécialisés dans la restauration collective pour leur proposer des audits d'hygiène et des formations en plus des analyses microbiologiques des produits finis, qui bien que nécessaires, sont insuffisantes pour améliorer la qualité. L'ensemble des clients rencontrés a donné son accord pour que les conventions les liant au laboratoire soient révisées en tenant compte de nos propositions.

Par ailleurs, le laboratoire compte envoyer en formation en mars 2008, une technicienne s'occupant actuellement des prélèvements d'échantillons alimentaires sur site et des comptes rendus dans un laboratoire d'hygiène des aliments accrédité (Institut Pasteur de La Gua-

deloupe) afin qu'elle se perfectionne aux techniques d'audits d'hygiène et de formation à l'HACCP. A son retour, cette personne pourra être complètement autonome et remplir pleinement ses fonctions de conseillère qualité en entreprise.

Enfin, consciente que le laboratoire ne pourra pas toujours compter sur la filière halieutique pour conserver son activité, la direction du laboratoire compte promouvoir davantage ses activités en allant à la rencontre des clients potentiels. La mise en place d'un catalogue d'analyses du laboratoire comprenant également les autres activités (prélèvements, contrôle de l'air, des sur-

faces, formations à l'hygiène, à l'HACCP, accompagnement à la certification...) ainsi que l'informatisation du laboratoire prévue pour juin 2008 permettront d'augmenter la rapidité, l'efficacité et la réactivité du laboratoire pour répondre aux besoins de ses clients.

Dans le domaine du contrôle microbiologique des produits cosmétiques, le laboratoire a acquis en novembre 2007, les normes ISO concernant ce type de contrôle. La mise en place de ces méthodes normalisées permettra de promouvoir et de développer cette nouvelle activité de service.

## Centre International de Vaccination

### R Ramiandrasoa

*Ce service est à la disposition du public pour effectuer l'ensemble de vaccinations éventuellement recommandées à Madagascar ou exigées pour les voyages internationaux.*

#### 1- Vaccination internationale

2 765 vaccinations anti-amariles donnant suite à la délivrance d'un certificat de vaccination internationale ont été réalisées (vaccins utilisés : STAMARIL® et VACCINAMARIL STABILILSE) (+100 % par rapport à l'année précédente).

#### 2- Autres vaccins

15 718 doses de vaccins de différentes natures ont été administrées (+ 110 % par rapport à l'année précédente). Par ailleurs, 713 IDR à la tuberculine ont été pratiquées.

Tableau I : Nombre des différents vaccins administrés

Nature du vaccin	Nombre de vaccination	Pourcentage
Act Hib	1 550	10,15
Avaxim	460	3,01
Tetract hib	89	0,58
Imovax Polio	63	0,41
Typhim Vi	865	5,66
Engerix B Adulte	1 850	12,11
Euvox B Pédiatrique	567	3,71
Meningo A+C	465	3,04
Euvox B Adulte	1 726	11,30
Pentaxim	758	4,96
Pneumo 23	70	0,46
ROR	1 036	6,78
Stamaril	2 765	18,10
Tétavax	239	1,56
Verorab	256	1,68
Dultavax	996	6,52
Vaxigrip	1 520	9,95

## Centre de Traitement Antirabique

### W Rakotomalala, M Ratsitorahina

#### Analyse de la base de données du centre antirabique de l'IPM, année 2007

##### Données patients

Durant l'année 2007, 4 175 nouveaux consultants (prise en charge initiale) ont été enregistrés dans le fichier du centre antirabique de l'IPM, 49 patients sont venus pour une reprise de traitement après abandon et 6 pour poursuite de traitement après transfert d'un autre centre antirabique.

Une analyse descriptive des 4 175 patients nouveaux consultants nous donne :

Le sex-ratio H/F était égal à 1,12, l'âge moyen des patients de 24,2 ans avec un âge médian égal à 20 ans et des extrêmes de 1 an et 97 ans.

La majorité des patients, soit 91,6% des exposés (3 824 / 4 175), habitaient le Grand Tana (Antananarivo Renivohitra, Atsimondrano, Avaradrano et Ambohidratrimo).

Parmi eux, 2 229 (53,4%) venaient d'Antananarivo Renivohitra, 688 (16,5%) d'Antananarivo Atsimondrano, 455 (10,7%) d'Antananarivo Avaradrano, et 452 (10,8%) d'Ambohidratrimo. Les lieux d'exposition des victimes ne différaient que très exceptionnellement de leur arrondissement de résidence. Concernant Antananarivo Renivohitra les 6 arrondissements ont été concernés avec 300 sujets exposés au 1<sup>er</sup> arrondissement, 370 au 2<sup>ème</sup> arrondissement, 331 au 3<sup>ème</sup> arrondissement, 376 au 4<sup>ème</sup> arrondissement, 679 au 5<sup>ème</sup> arrondissement et 173 au 6<sup>ème</sup> arrondissement.

En moyenne le délai entre l'exposition et la consultation était de 2 jours (allant de 0 à 58 jours), mais la médiane était de 1 jour.

La plupart des patients (96,2% soit 4 017 / 4 175) ont bénéficié d'une prise en charge vaccinale avec le vaccin sur culture cellulaire Vero "Verorab®" selon le Protocole de la Thai Red Cross (TRC) et 54 patients soit 1,3% le protocole (payant) 2-1-1 de l'OMS. Dans 2,5% des cas, les conclusions de la consultation n'ont pas justifié la mise en œuvre de traitement antirabique.

La chronologie à J3 du protocole initial n'a pas été respectée pour 228 patients (5,7%), et 347 personnes sur les 3 789 prises en charge à J0 et J3 n'ont pas fait la vaccination à J7 (9,2%). Au total, l'observance du traitement selon le Protocole de la Thai Red Cross défini par le médecin lors de la prise en charge initiale a été effective jusqu'au J7 pour 85,7% des patients (3 441 / 4 107).

Sur les 4 107 patients traités avec le protocole TRC, 1 284 devront obligatoirement poursuivre la vaccination à J28, les 2 733 autres patients le feront selon la conclusion du vétérinaire à l'issue de la mise en observation de l'animal. Les 3 visites de suivi demandées ont été effectivement réalisées par 1 700 propriétaires d'animaux (62,2%) (avec certification vétérinaire). Dans 1 663 cas, les vétérinaires ont exclu la rage. Les 1 070 (2 733 - 1 663) restants devaient continuer la vaccination à J28.

Le taux de participation à J28 en 2007 est de 53% [1 248 / (1 284 + 1 070)].

### Données animales

L'exposition a été dominée par l'agression ou contact avec un chien, elle représente 90,9% (3 797 / 4 175) des expositions. Les autres principales sources d'expositions sont par ordre décroissant le chat dans 6,7% des cas (281 / 4 175), les autres (lémuriens, rats, fosa...) dans 2,3% des cas.

Le tableau suivant présente une caractérisation des animaux selon les déclarations des patients (tableau I).

Tableau I : Répartition des caractéristiques des principales espèces animales

(selon les caractéristiques décrites lors de la consultation initiale)

Caractéristique de l'animal	Chien	Chat	Lémurien	Total
Errant disparu	772	38	60	870
Errant vivant (propriétaire inconnu)	84	6	6	96
Domestique (propriétaire connu)	2 676	148	23	2 847
Domestique disparu	24	16	1	41
Domestique abattu	75	25	1	101
Domestique mort "de maladie"	166	48	6	220
<b>Total</b>	<b>3 797</b>	<b>281</b>	<b>97</b>	<b>4 175</b>

Les données disponibles concernant la vaccination antirabique des chiens reposent sur la notion de réalisation d'au moins un vaccin antirabique au cours de la vie de l'animal. Elles sont présentées par zone géographique sur le tableau ci-après (tableau II).

Tableau II : Taux de vaccination estimatif des chiens dans le grand Tana, observé dans le fichier du centre antirabique de l'Institut Pasteur de Madagascar en 2007

Site d'exposition	Nombre de chien en cause	Nombre de chien "vaccinés"	%
Antananarivo renivohitra	1 449	317	21,7
Antananarivo atsimondrano	450	100	22,2
Antananarivo avaradrano	306	59	19,3
Ambohidratrimo	321	76	23,7

### Discussions et suggestions

Le délai entre l'exposition et la consultation qui est relativement faible nous montre que l'activité antirabique de l'IPM est aisément accessible à la population d'Antananarivo ou du Grand Tana. Le nouveau protocole vaccinal est apparemment adapté à la population nous n'avons que 15% de perdus de vue jusqu'à J7. Cependant, le taux de perdus de vue important à J28 mérite une réflexion.

Une estimation de la couverture vaccinale des chiens à Madagascar sera une étude intéressante pour améliorer la lutte contre la rage à Madagascar.

L'année 2007 a été marquée aussi par la mise en place de la nouvelle organisation des centres anti-rabiques par le Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale avec la collaboration technique de l'unité épidémiologique de l'IPM. Dans le cadre de ce projet, un atelier de formation a été réalisé pour 12 centres en plus de celui de l'IPM, une extension est en cours de préparation en 2008. Il est convenu pendant les réunions techniques que le ministère identifiera les nouveaux centres anti-rabiques et les responsables du centre.

---

---

**Publications, Communications,  
Thèses, Mémoires, Missions scientifiques,  
Ateliers, Conférences, Visiteurs**

---

---

# Publications

## Maladies virales

- **Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM, Faure C, Georges-Courbot MC, Rousset D, Reynes JM.** Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2007; **13** : 159-161.
- **Rakoto Andrianarivelo M, Guillot S, Iber J, Balanant J, Blondel B, Riquet F, Martin J, Kew O, Randriamanalina B, Razafinimpiasa L, Rousset D, Delpeyroux F.** Co-circulation and evolution of polioviruses and species C enteroviruses in a District of Madagascar. *PLoS Pathog* 2007; **14** : e191.
- **Ramarokoto C, Rakotomanana F, Ratsitorahina M, Raharimanga V, Razafindratsimandresy R, Randremanana R, Rakoto Andrianarivelo M, Rousset D, Andrianaja V, Richard V, Soares JL, Rabarijaona LP.** Seroprevalence of hepatitis C and associated risk factors in urban areas of Antananarivo, Madagascar. *BMC Infect Dis* 2007; **8** : 25.
- **Razafindratsimandresy R, Dubot A, Ramarokoto CE, Iehlé C, Soares JL, Rousset D.** Hepatitis C virus infection and genotypes in Antananarivo, Madagascar. *J Med Virol* 2007; **79** : 1082-1088.
- **Razafindratsimandresy R, Hollanda J, Soares JL, Rousset D, Chetty AP, Reynes JM.** HIV type 1 diversity in the Seychelles. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; **23** : 761-763.

## Mycobactéries

- **Raharisolo Vololonantenaina CR, Koubaa Mahjoub W, Rakotondrasoa H, Razanakotomalala V, Ratrimoarivony C, Grossin M, Rasolofo V.** Clinical, bacteriological and histopathological correlation in leprosy. Symposium of the international society of dermatopathology. *Abstract Book XXVIII* 2007 : p 83.
- **Ramarokoto H, Rasolonavalona T, Ratsimba L, Andrianasolo D, Ratsitorahina M, Rasolofo Razanamparany V.** Evaluation of a rapid culture method on liquid Bio fm (BIO-RAD) medium for the isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007 ; **11** : 898-903.
- **Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martin A, Portaels F, Ramarokoto H, Rasolofo Razanamparany V.** Evaluation of resazurin assay for detection of multidrug-resistance *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; **11** : 683-688.

## Paludisme

- **Barnadas C, Ratsimbaoa A, Ranaivosoa H, Ralaizandry D, Raveloariseheno D, Rabekotonorina V, Picot S, Ménard D.** Short report : prevalence and chloroquine sensitivity of *Plasmodium malariae* in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **77** : 1039-1042.
- **Barnes KI, Lindegardh N, Ogundahunsi O, Olliaro P, Plowe CV, Randrianariveლოსია M, Gbotosho GO, Watkins WM, Sibley CH, White NJ.** World Antimalarial Resistance Network (WARN) IV : clinical pharmacology. *Malar J* 2007; **6** : 122.
- **Domarle O, Randrianariveლოსია M, Duchemin JB, Robert V, Ariey F, Hommel M.** Formation francophone sud/sud : l'Atelier Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar. *Med Trop* 2007; **67** : 505-512.
- **Duval L, Robert V, Csorba G, Hassanin A, Randrianariveლოსია M, Walston J, Nhim T, Goodman SM, Ariey F.** Multiple host-switching of Haemosporidia parasites in bats. *Malar J* 2007; **6** : 157.
- **Ekala MT, Khim N, Legrand E, Randrianariveლოსია M, Jambou R, Fandeur T, Ménard D, Assi SB, Henry MC, Rogier C, Bouchier C, Mercereau-Puijalon O.** Sequence analysis of *Plasmodium falciparum* cytochrome b in multiple geographic sites. *Malar J* 2007; **17** : 164.
- **Ibrahim LM, Gay-Andrieu F, Adehossi E, Lacroix V, Randriariveლოსია M, Duchemin JB.** Field-based evidence for the linkage of *pfprt* and *pfdhfr* drug-resistant malaria genotypes and clinical profiles of severe malaria in Niger. *Microbes Infect* 2007; **9** : 599-604.
- **Ménard D, Andrianina NN, Ramiandrasoa Z, Randriamanantena A, Rasoarilalao N, Jahevitra M, Ratsimbaoa A, Tuseo L, Raveloson A.** Randomized clinical trial of artemisinin *versus* non-artemisinin combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in Madagascar. *Malar J* 2007; **22** : 65.
- **Ménard D, Randrianarivo-Solofoniaina AE, Ahmed BS, Jahevitra M, Andriantsoanirina V, Rasolofomanana JR, Rabarijaona LP.** Drug-resistant malaria parasites introduced into Madagascar from Comoros Islands. *Emerg Infect Dis* 2007; **13** : 1759-1762.



- **Penali L, Mulholland DA, Tano KD, Cheplogoi PK, Randrianariveლოსია M.** Low antiplasmodial activity of alkaloids and amides from the stem bark of *Zanthoxylum rubescens* (Rutaceae). *Parasite* 2007; **14** : 161-164.
- **Rakotomanana F, Randremanana RV, Rabarijaona LP, Duchemin Jb, Ratovonjato J, Arie F, Rudant JP, Jeanne I.** Determining areas that require indoor insecticide spraying using Multi Criteria Evaluation, a decision-support tool for malaria vector control programmes in the Central Highlands of Madagascar. *Intern J Health Geographics* 2007 ; **6** : 2.
- **Randriamanantena A, Randrianasolo L, Vonimpaisomihanta JA, Tafangy PB, Bayant Z, Randrianariveლოსია M.** Efficacité thérapeutique de l'amodiaquine dans le traitement du paludisme à Madagascar. *Cahiers Santé* 2007 ; **17** : 75-78.
- **Randrianasolo L, Tafangy PB, Raharimalala LA, Ratsimbasoa A, Randriamanantena A, Randrianariveლოსია M.** Utilisation du test de diagnostic rapide du paludisme à Madagascar : étude préliminaire en 2003. *Cahiers Santé* 2007 ; **17** : 69-73.
- **Rason MA, Andrianantenaina HB, Arie F, Raveloson A, Domarle A, Randrianariveლოსია M.** Prevalent pfmdr1 N86Y mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar despite absence of *pfcr1* mutant strains. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **76** : 1079-1083.
- **Ratsimbasoa A, Randriamanantena A, Raheinjafy R, Rasoarilalao N, Ménard D.** Which malaria rapid test for Madagascar? Field and laboratory evaluation of three tests and expert microscopy of samples from suspected malaria patients in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **76** : 481-485.
- **Silai R, Moussa M, Abdalli Mari M, Astafieva-Djaza M, Hafidhou M, Oumadi A, Randrianariveლოსია M, Said Ankili A, Said Ahmed B, Gayibor AH, Arie F, Ringwald P.** Surveillance de la chimiosensibilité du paludisme à *Plasmodium falciparum* dans l'Union des Comores. *Bull Soc Path Exot* 2007; **100** : 6-9.
- **Tall A, Rabarijaona LP, Robert V, Bedja SA, Arie F, Randrianariveლოსია M.** Efficacy of artesunate plus amodiaquine, artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine, and chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* in the Comoros Union. *Acta Tropica* 2007; **102** : 176- 181.

---

## Peste

---

- **Bianucci R, Rahalison L, Ferroglio E, Massa ER, Signoli M.** A rapid diagnostic test for plague detects *Yersinia pestis* F1 antigen in ancient human remains. *C R Biol* 2007; **330** : 747-754.
- **Gilbert A, Loiseau A, Duplantier JM, Rahelinirina S, Rahalison L, Chanteau S, Brouat C.** Genetic structure of black rat populations in a rural plague focus in Madagascar. *Canadian J Zool* 2007; **85** : 965-972.
- **Prentice M, Rahalison L.** Plague. *Lancet* 2007; **369** : 1196-1207.
- **Stenseth NC, Aikimbayev A, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, Kenneth L, Gage Leirs H, Rahalison L.** Plague : past, present and future. *PLoS Med* 2007; **15** : e3.
- **Timothy J, Welch W, Fricke F, Rosso ML, Rasko DA, Mammel M, Eppinger M, Rosovitz MJ, White DG, McDermott PF, Wagner D, Rahalison L, Le Clerc JE, Hinshaw JM, Lindler LE, Cebula TA, Carniel E, Ravel J.** Multiple antimicrobial resistance in plague : an emerging risk. *PloS One* 2007; **2** : e309.
- **Tomaso H, Thullier P, Seibold E, Guglielmo V, Buckendahl A, Rahalison L, Neubauer H, Scholz HC, Splettstoesser WD.** Comparison of hand-held test kits, immunofluorescence microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, and flow cytometric analysis for rapid presumptive identification of *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* 2007; **45** : 3404-3407.

---

## Divers

---

- **Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, Anthony Hart C.** Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004-2005. *Emerg Infect Dis* 2007; **13** : 908-911.
- **Randrianirina F, Soares JL, Carod JF, Ratsima E, Thonnier V, Combe P, Grosjean P, Talarmin A.** Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar. *J Antimicrobial Chemoth* 2007; **59** : 309-312.
- **Randrianirina F, Soares JL, Ratsima E, Carod JF, Combe P, Grosjean P, Richard V, Talarmin A.** *In vitro* activities of 18 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from the Institut Pasteur of Madagascar. *An Clin Microbio Antimicrobials* 2007; **6** : 5.

## Sous presse

- **Randrianirina F, Carod JF, Ratsima E, Chrétien JB, Richard V, Talarmin A.** Evaluation of the performance of four rapid tests for the detection of Hepatitis B surface antigen in Antananarivo, Madagascar. *J Virol Methods*.
  - **Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes JM, Zeller H, Raelina Y, Talarmin A, Richard V, Soares JL.** Outbreak of Dengue and Chikungunya fever in Toamasina, Madagascar 2006. *Emerg Infect Dis*.
  - **Bianucci R, Rahalison L, Massa ER, Peluso A, Ferroglio E, Signoli M.** Technical note : a rapid diagnostic test detects plague in ancient human remains : an example of the interaction between archeological and biological approaches (southeastern France, 16th-18th centuries). *Am J Phys Anthropol*.
  - **Loiseau A, Rahelinirina S, Rahalison L, Konecny A, Duplantier JM, Brouat C.** Isolation and characterization of microsatellites in *Rattus rattus*. *Molecular Ecology Notes*.
  - **Tollenaere C, Rahalison L, Ranjalahy M, Rahelinirina S, Duplantier JM, Brouat C.** CCR5 polymorphism and plague resistance in natural populations of black rat in Madagascar. *Infect Gen Evolution*.
-

# Communications

## Anatomie pathologique

### Orales

- **Raharisolo Vololonantenaina CR, Copie-Berman C, Rakotosamimanana J, Rakouth A, Randrian-jafisamindrakotroka NS, Gaulard P.** *A case of Large B-cell Lymphoma expressing intracytoplasmic ALK-Kinase.* 1<sup>st</sup> Western Indian Ocean Pathologists. Antananarivo, 15-18 August.
- **Raharisolo Vololonantenaina CR.** *A case of primary ovarian small cell carcinoma, hypercalcemic type diagnosed at the pathologic laboratory of HJRA.* Antananarivo, 15-18 août.

## Maladies virales

### Orales

- **Recordon-Pinson P, Ayouba A, Chaix ML, Descamps D, Marcelin AG, Marechal V, Masquelier B, Nary Ly, Neriennet E, Reynes JM, Rousset D, Lien TX, Costagliola D, Barre-Sinoussi F, Fleury HJ.** *Contrôle Qualité du séquençage du VIH-1 et de l'interprétation des mutations de résistance selon l'algorithme de l'ANRS au sein du réseau international des Instituts Pasteur et de 4 laboratoires CHU français de Virologie.* 4<sup>ème</sup> conférence francophone VIH/SIDA, Paris, 29-31 mars.
- **Rakoto Andrianarivelo M.** *Devenir des connaissances autochtones : exemple de la médecine traditionnelle à Madagascar.* Colloque Scientifique de l'INSPC. Antananarivo, 7-8 novembre.

### Affichées

- **Andriaholinirina VN.** *Contribution à la révision systématique de deux genres d'Indriidae (Avahi, Jordan 1834 et Propithecus, Bennett 1832) de la côte Est de Madagascar.* Journée des thèses francophones et franco-malgaches. Antananarivo, 14 décembre.
- **Harisoa J, Ratsitorahina M, Raelina Y, Randrianasolo L, Rakotojoelinandrasana T, Ratovonjato J, Zeller H, Reynes JM, Soares J.** *Epidé-*

*mie de fièvre dengue-like à Toamasina au cours du 1er trimestre 2006.* Colloque Chikungunya et autres arboviroses émergentes en milieu tropical. Saint-Pierre, la Réunion, 3-4 décembre.

- **Raelina Y, Randriamanantsoa R, Randrianasolo L, Andriamandimby SF, Ratsitorahina M, Razainirina J, Rakotojoelinandrasana T, Ramajanto R, Richard V, Reynes JM.** *Surveillance sentinelle des arboviroses à Madagascar.* Colloque Chikungunya et autres arboviroses émergentes en milieu tropical. Saint-Pierre, la Réunion, 3-4 décembre.

## Mycobactéries

### Orales

- **Rakotosamimanana N.** *Recherche de marqueurs immunologiques et génétiques de protection contre la tuberculose.* Journée des thèses francophones et franco-malgaches. Antananarivo, 14 décembre.
- **Rasolofo V, Raharimanga, Andriamandimby SF, Ratsitorahina M, Ramarokoto H, Soares JL, V Richard.** *Infection par Mycobacterium tuberculosis des proches contacts de patients tuberculeux pulmonaires à Antananarivo (Madagascar).* Journée du Département Infection & Epidémiologie. Institut Pasteur Paris, 6 juin.
- **Rakotosamimanana N, Andriamihantsoa L, Raharimanga, Andriamandimby SF, Ratsitorahina M, Soares JL, V Richard, Rasolofo V.** *Expression de marqueurs moléculaires de l'immunité anti-tuberculeuse.* Journée du Département Infection & Epidémiologie. Institut Pasteur Paris, 8-9 octobre.

### Affichées

- **Ramarokoto H, Ranjalahy G, Rarivoson B, Ratsirahonana O, Ravaosolo J, Ranaivohajaina S, Rakotoarisaonina A, Rasolofo V, Soares LJ.** *Enquête nationale sur la résistance primaire aux antituberculeux à Madagascar, 2005-2006 : résultats partiels.* 38<sup>ème</sup> conférence internationale sur la tuberculose et les maladies respiratoires. Paris, 7-12 novembre.

---

## Paludisme

---

### Orales

- **Ménard D.** *Plasmodium migrants dans l'Océan Indien : un risque à Madagascar ?* Staff du Département des Maladies Infectieuses, Parasitaires, Tropicales et Santé Publique. Groupe Hospitalier Pitié - Salpêtrière, Paris, 8 février.
- **Ménard D.** *Programme de surveillance de la résistance aux antipaludiques.* Restitution de la Table Ronde "Résistance aux Anti Infectieux". Antananarivo, Solimotel, 11 mai.
- **Randrianariveლოსია M.** *Création d'un réseau international pour la surveillance de résistances des microorganismes aux Anti-Infectieux. Composante 2 : Surveillance de la résistance des plasmodies aux antipaludiques.* Restitution de la Table Ronde "Résistance aux Anti Infectieux". Antananarivo, Solimotel, 11 mai.
- **Randrianariveლოსია M, Randrianasolo L, Ratsimbao A, Same-Ekobo A, Ama Moor V, Kuete T, Brasseur P, Agnamey P, Ndiaye JL, Faye B, Gaye O, Sagara I, Traore A, Dicko Y.** *Multinational, randomised comparative study to assess the tolerability and efficacy of Coarsucam® (fixed dose combination of artesunate plus amodiaquine) once or twice daily versus Coartem® (fixed dose combination of artemether plus lumefantrine) for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.* 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health. Amsterdam, The Netherlands. May 24-28.
- **Randrianariveლოსია M.** *Médecine traditionnelle : décryptage critique en référence aux plantes dites antipaludiques.* Académie Nationale des Arts, des Lettres et des Sciences. Antananarivo, 28 juin.
- **Karpe P et Randrianariveლოსია M.** *Devenir des connaissances autochtones : exemple de la médecine traditionnelle à Madagascar.* Colloque scientifique de l'INSPC. Antananarivo, 7-8 novembre.
- **Ménard D, Raharimalala L.** *Efficacité des principaux antipaludiques préconisés par le PNLP à Madagascar : données du Réseau d'Etude de la Résistance (RER) 2006- 2007.* Journée Nationale de Lutte contre le Paludisme. Toliara, 10 novembre.

- **Rakotomanana F.** *Apport du Système d'Information Géographique dans la prévention du risque de survenue d'épidémie de paludisme sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar.* Journée des thèses francophones et franco-malgaches. Antananarivo, 14 décembre.
- **Rakotomanana F, Jolivet L, Randremanana RV, Rudiant JP.** *Remote sensing and urban malaria : radar Envisat contribution for the determination of potential anopheles breeding site in Antananarivo (Madagascar).* Envisat symposium, Montreux, Suisse, 23-27 avril.
- **Ratsimbao A.** *Présentation de l'évaluation de la mise en œuvre de la prise en charge à domicile (PECADOM) de la fièvre des enfants de moins de 5 ans par la chloroquine préemballée à Madagascar exemple des communes de Lakato et d'Ambohibary en 2005 (District de Moramanga).* Colloque Scientifique de l'INSPC. Antananarivo, 7-8 novembre.

### Affichées

- **Andriantsoanirina V.** *Apport de nouveaux outils de biologie moléculaire dans l'évaluation et la surveillance de la résistance de Plasmodium falciparum aux principaux antipaludiques utilisés à Madagascar.* Journée des thèses francophones et franco-malgaches. Antananarivo, 14 décembre.

---

## Peste

---

### Orales

- **Rahalison L.** *La peste à Madagascar.* Rencontre avec des Géographes français. Antananarivo, 22 avril.
- **Rahalison L.** *Surveillance de l'antibiorésistance de Y. pestis et isolement d'une souche de peste multi-résistante à Madagascar.* Journée scientifique consacrée à la résistance aux anti-infectieux. Antananarivo, 11 mai.
- **Rahalison L.** *Persistence of humoral and memory T-cell responses to the Y. pestis F1 antigen during a natural plague infection in human.* Conférencier invité à la Medical B Defense Conference. Munich 17-18 octobre.

- **Rahelinirina S, Ranjalahy M, Rahalison L.** *Le risque pesteux dans un exemple de foyer rural de peste du Vakinankaratra : dynamique et déplacement des rats l'échelle de l'habitat.* Colloque Scientifique de l'INSPC. Antananarivo, 7-8 novembre.

- **Rahelinirina S.** *La diffusion de la peste à Madagascar : importance des déplacements des rats de l'échelle de l'habitat celle du paysage ; détermination des facteurs de risque.* Journée des thèses francophones et franco-malgaches. Antananarivo, 14 décembre.

#### **Affichées**

- **Tomaso H, Thullier P, Seibold E, Guglielmo V, Buckendahl A, Rahalison L, Neubauer H, Scholz HC, Splettstoesser WD.** *In vitro evaluation of hand-held test kits, immunofluorescence microscopy, ELISA, and flow cytometric analysis for the rapid presumptive identification of Yersinia pestis.* 17th ECCMID, Munich, 31 March - 3 April.

---

## **Divers**

---

#### **Orales**

- **Rakotomanana F.** *Apport du Système d'Information Géographique dans la prévention du risque de survenue d'épidémie de paludisme sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar.* Journée des thèses francophones et franco-malgaches. Antananarivo, 14 décembre.

- **Randrianirina F.** *Les infections nosocomiales et les bactéries multirésistantes.* Colloque Scientifique de l'INSPC. Antananarivo, 7-8 novembre.

#### **Affichées**

- **Rakotomanana F.** *Application of meteorological and hydrological services.* Second meeting of the task force on socio-economic. organisé par l'OMS, Genève, Suisse, 11-13 juillet.

## Thèses et Mémoires

- **Randriamboavonjy JAR.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Etude comparative randomisée de l'efficacité des antipaludiques sur l'accès palustre simple à Plasmodium falciparum.* Soutenue le 19 février.
  - **Harimanana AN.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Comparaison de l'efficacité thérapeutique de deux traitements antipaludiques combinés à Madagascar.* Soutenue le 22 février.
  - **Ramiandrasoa AZ.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Evaluation des antipaludiques pour le traitement du paludisme à Plasmodium falciparum non compliqué à Moramanga.* Soutenue le 22 février.
  - **Herindrainy BP.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Poids réel du paludisme en 2006 à Madagascar.* Soutenue le 30 mars.
  - **Rakotonaivo MJ.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Evaluations des antipaludiques pour le traitement du paludisme à Plasmodium falciparum à Miandrivazo.* Soutenue le 9 mai.
  - **Andrianaivoarimanana V.** Mémoire Master 2, Spécialité Interactions Hôtes Agents Infectieux, Université de Versailles Saint-Quentin. « Réponse anticorps et prolifération de cellules T après stimulation par l'antigène F1 au cours et décours de l'infection pesteuse chez des sujets malgaches ». Soutenu juin.
  - **Rakotonirina HHC.** Mémoire de DEA de Biochimie appliquée aux sciences médicales. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo - *Développement de la technique PCR en temps réel pour le diagnostic d'espèces du genre Plasmodium.* Soutenu le 17 juillet.
  - **Faniriko MBA.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Evaluation des facteurs de risque impliqués dans l'émergence et la diffusion de la résistance aux antipaludiques à Madagascar.* Soutenue le 19 juillet.
  - **Razafinratsimandresy R.** Thèse de Doctorat de Sciences, Biochimie Fondamentale et Appliquée. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo - *Caractérisation moléculaire de VHC, variabilité génétique et génotypage de VIH-A circulant à Madagascar.* Soutenue le 2 novembre.
  - **Ratovoson R.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Test Intradermo-réaction à la tuberculine dans la lutte contre la tuberculose.* Soutenue le 20 décembre.
  - **Ravelonarivo JA.** Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo - *Femmes enceintes face au paludisme : connaissances et pratiques (à travers une étude réalisée en 2007 à Antananarivo, capitale de Madagascar).* Soutenue le 20 décembre.
-



## *Missions scientifiques, ateliers et conférences*

- **Andrianaivoarimanana V.** Soutenance mémoire de Master 2. Université de Versailles Saint Quentin (23 au 29 juin).
  - **Rakotosamimanana N.** Journée du Département Infection et Epidémiologie. IP Paris (06 au 12 octobre).
  - **Rahalison L.** Recyclage membres du réseau régional de réponse rapide aux épidémies. Harare, Zimbabwe (27 au 30 juin).
  - **Carod JF.** Journées Internationales de Biologie. Paris (1<sup>er</sup> au 11 novembre).
-

## *Visites*

- 16 janvier : Inauguration du Laboratoire de Formation Polyvalente  
**Son Excellence Monsieur Tadaharu CHICHI**, Ambassadeur du Japon  
**Monsieur Robinson JEAN LOUIS**, Ministre de la Santé et du Planning Familial
- 8 mars : Visite des laboratoires Bilharziose, Tuberculose, Peste et Centre de Biologie Clinique  
**Dr Richard ROACH**, accompagné par des étudiants américains du Michigan State University/USA - Internal Medicine Department Kalamazoo Center for Medical Studies
- 12 mars : Visite des laboratoires Centre de Biologie Clinique, Virologie et LHAE  
**Association Tana-Accueil**
- 16 au 17 avril : Inauguration du Laboratoire Epidémiologie-Surveillance  
**Mme Alice DAUTRY**, Directeur Général de l'Institut Pasteur à Paris  
**Mme Michèle BOCCOZ**, Directrice des Affaires Internationales, Institut Pasteur à Paris  
**Dr Marius RATOLOJANAHARY**, Ministre de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche  
**Mr Alain LE ROY**, Ambassadeur de France à Madagascar  
**Mr Denis CASTAING**, Directeur de l'AFD à Madagascar  
**Dr Milaso MOSA**, Représentant du Ministre de la Santé et du Planning Familial  
**Dr Louis Heriniaina RAMASOMANANA**, Directeur de l'ACSQDA  
**Dr Adrien RANDRIANASOLO**, Chargé du Suivi des Projets, Cabinet Vice Ministre de la Santé et du Planning Familial
- 11 juin : Visite d'évaluation du laboratoire de référence Grippe aviaire  
**Dr Terry G. BESSELAAR**, **Dr Ali AHMED Y**, NHLS  
**Dr CELIA WOODFILL**, OMS AFRO
- 11 au 15 juin : Accréditation du laboratoire OMS polio  
**Dr Charles BYABAMAZIMA**, coordinateur du réseau des labos polio pour l'Afrique de l'Est et Australe
- 14 novembre : dans le cadre de la collaboration avec la Faculté de Médecine d'Antananarivo  
**Pr Bernhard FLEISCHER**, Directeur de l'Institut Bernhard Nocht (BNI) Hambourg Allemagne
- 26 au 28 novembre : Evaluation scientifique de l'IPM  
**Mr Jacques TRIEU-CUOT**, Institut Pasteur à Paris  
**Mr Jacques LOUIS**, Institut Pasteur à Paris  
**Mr Robert COLEBUNDERS**, Institut Prince Leopold, Anvers
- 3-5 décembre : dans le cadre du projet sur la susceptibilité génétique aux infections mycobactériennes  
**Laurent ABEL**, Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, INSERM, Hôpital Necker Paris  
**Roland BROSCHE**, Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne, Institut Pasteur à Paris
- 5-6 décembre : Membre du conseil de perfectionnement  
**Dr Paul Richard RALAINIRINA**, Secrétaire Général du Ministère de la Santé et du Planning Familial  
**Dr Fanja RAJOELISOLO**, Représentante de la Présidence de la République de Madagascar  
**Dr Yves CHARPAK**, Directeur des Affaires Internationales de l'Institut Pasteur à Paris  
**Mr Christian OQUET**, Chef du Service de Coopération et d'Action Culturelle, Représentant du Ministère français des Affaires Etrangères  
**Mr Lala Aimé RAZAFINJARA**, Directeur de la Recherche, Représentant du Ministre de l'Education Nationale et de la Recherche Scientifique  
**Mme Esther Christy RASOAVOLOLONA**, Représentant du Ministre des Finances et du Budget  
**Dr RAYMOND**, Représentant du Directeur de la Santé Animale et du Phytosanitaire du Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche  
**Pr Marcel RAZAMPARANY**, Représentant de l'Académie Nationale des Arts, des Lettres et des Sciences  
**Pr Jean de Dieu RAKOTOMANGA**, Représentant du Doyen de la faculté de Médecine d'Antananarivo  
**Mme Lala Sahondra RAVELOSON**, Chef du Département d'Entomologie, Représentant du Doyen de la Faculté des Sciences d'Antananarivo  
**Dr Antoine TALARMIN**, Directeur de l'Institut Pasteur de Madagascar