

L'ÉPIDÉMIE DE GRIPPE DE TANANARIVE
(août-septembre 1974)
Étude virologique, sérologique et épidémiologique

par

F. CHABAUD (1) S. RATSIRAHOMANA (2), P. COULANGES (3)

collaboration technique : RAZAFIMAHATRATRA

PLAN

I. — INTRODUCTION.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

A. ISOLEMENT DU VIRUS GRIPPAL.

A.1. Technique de prélèvement.

A.2. Technique d'isolement.

A.2.1. Principales techniques.

A.2.2. Choix d'une technique.

A.2.3. Description de la technique d'isolement sur œuf.

A.3. Identification du virus isolé.

A.3.1. Avantages et inconvénients de diverses techniques.

- inhibition d'hémadsorption.
- neutralisation.
- fixation du complément.
- inhibition de l'hémagglutination.
- inhibition de la neuraminidase.

A.3.2. Choix d'une technique.

A.3.3. Description de la technique utilisée.

(1) Volontaire du Service national, Institut Pasteur, docteur en médecine, DEA Génétique

(2) Médecin-Chef OSTIE.

(3) Chef du Laboratoire de Virologie, médecin du Service de Santé des Armées, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1 274, Tananarive.

B. SÉROLOGIE.

- B.1. *Principales techniques.*
- B.2. *Choix d'une technique.*
- B.3. *Description de la technique utilisée.*

III. — RÉSULTATS.

A. DE L'ÉTUDE VIROLOGIQUE.

- A.1. *Isolements.*
- A.2. *Typages.*

B. DE LA SÉROLOGIE.

IV. — ÉTUDE CLINIQUE.

A. DONNÉES CLINIQUES : FORMES CLINIQUES — COMPLICATIONS.

B. ÉTUDE DES COMPLICATIONS DE LA GRIPPE DANS LE SERVICE DE PNEUMOLOGIE DE L'HOPITAL GÉNÉRAL DE BEFELATANANA.

- B.1. *Les associations morbides.*
- B.2. *Étude clinique de la mortalité.*

V. — DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR LA GRIPPE A TANANARIVE EN 1974.

A. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE SURMORBIDITÉ.

B. ESTIMATION DE L'INCIDENCE DANS LA POPULATION DE TANANARIVE.

- B.1. *Estimation globale.*
- B.2. *Influence de l'âge et du sexe.*
- B.3. *Influence du poste de travail.*
- B.4. *Rôle du contagé familial.*

C. ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA SURMORTALITÉ.

VI. — DISCUSSION.

RÉSUMÉ.

BIBLIOGRAPHIE.



I. — INTRODUCTION

La grippe a sévi à Tananarive pendant les mois froids de l'hiver austral 1974.

Madagascar semble avoir été touché par cette affection, sous forme épidémique avec forte mortalité, au moins en 1893, 1919, 1934, 1958.

A l'occasion de cette dernière épidémie P. SUREAU put réaliser une étude sérologique, portant sur 94 sérums avec 54 doubles prélèvements, qui montrait la responsabilité du virus A' Singapur 1/57. L'isolement de la souche ne put être pratiqué.

Dès qu'il fut évident qu'une épidémie de syndromes respiratoires sévères sévissait, nous en avons entrepris l'étude sur les plans virologiques, sérologiques et épidémiologiques. Ce travail a été possible grâce à la coopération de l'Organisation Sanitaire Tananarivienne Inter-Entreprises (OSTIE) qui nous a adressé ses malades et dont nous avons pu étudier les registres de consultation. Nous avons eu la possibilité de compléter notre étude, en ce qui concerne la mortalité, les complications, de cette épidémie dans le Service de pneumologie de l'Hôpital général de Befelatanana (*).

Nous avons pu ainsi isoler plusieurs souches du virus grippal responsable, montrer sa circulation dans la population à l'aide de la sérologie, étudier les modalités de l'épidémie.

Nous rapportons ici nos résultats et nos conclusions en insistant sur les techniques utilisées. En effet dans ce domaine en dehors des difficultés matérielles dues à l'éloignement géographique, nous nous sommes heurtés à deux obstacles particuliers : l'impossibilité d'importer dans l'Ile des cellules de rein de singe, l'inexistence d'œufs à coquille claire.

II. -- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. ISOLEMENT DU VIRUS GRIPPAL

A.1. *Technique de prélèvement*

Le virus grippal étant un virus thermolabile il est nécessaire de pratiquer les tentatives d'isolement aussitôt après le prélèvement ou, si cela n'est pas possible, de mettre le prélèvement dans un milieu de transport adéquat, puis de le congeler immédiatement. De plus, les chances d'isolement sont d'autant plus grandes que le prélèvement est effectué le plus tôt possible après le début de la maladie.

(*) Nous remercions de son accueil Mme le Docteur M. Schaffner-Razafindrala, Médecin Chef du Service de pneumologie.

Les malades que nous avons étudiés provenaient d'un organisme de médecins du travail, l'Organisation Sanitaire Tananarivienne Inter-Entreprises (OSTIE). Ils nous ont été envoyés, au mois de septembre 1973, lorsqu'ils présentaient un syndrome grippal et étaient à la phase aiguë de la maladie.

Chaque malade, accompagné d'une feuille de renseignements, subissait un écouvillonnage nasal, un prélèvement pharyngé par gargarisme et une prise de sang. Le malade était reconvoqué 15 jours plus tard pour un deuxième prélèvement de sang sur tube sec.

Les prélèvements nasaux et pharyngés étaient mis dans 2 millilitres de solution de Hanks additionnée d'antibiotiques et congelés aussitôt.

A.2. *Technique d'isolement*

A.2.1. Principales techniques

Le milieu le plus sensible pour l'isolement des virus du type A est l'œuf de poule embryonné de 10 à 13 jours (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8), inoculé par voie amniotique et incubé à une température de 33 à 35° C. La présence du virus est détectée par la mise en évidence du phénomène d'hémagglutination en présence d'hématies de cobaye ou de poussin.

Pour les virus du type B le milieu d'isolement le plus sensible est la culture primaire de cellules de rein de singe à 33-35° C, sans sérum (1, 2, 4, 3, 8).

C'est pourquoi pour l'isolement de virus grippal, on pratique généralement l'inoculation simultanée de cultures de cellules primaires de rein de singe et d'œuf embryonné (5). Cependant le virus grippal peut se multiplier également sur d'autres milieux : membrane chorio-allantoïde, poumon, foie, rein, d'embryons de poulet ; rein de veau. Tous seraient de bons milieux (8, page 549) tandis que les résultats seraient plus variables selon les techniques avec rein et poumon de porc, embryonnaire ou adulte, poumon d'embryons de veau ainsi qu'avec rein ou poumon de fœtus humain.

Une étude comparative de HIGGINS et ELLIS, en 1972 (1), donne, pour l'isolement du virus de type A, et par ordre de sensibilité décroissante, les milieux suivants :

- Cavité amniotique d'œuf embryonné.
 - Culture primaire de trachée d'embryon de poulet.
 - Rein de singe.
 - Culture primaire de trachée humaine (peu sensible).
- et pour les virus du type B :
- Culture primaire de cellules embryonnaires humaines ciliées équivalentes au rein de singe.
 - Œuf — Trachée de poulet, de sensibilité moindre.

En cultures cellulaires, la présence de virus est détectée par le phénomène d'hémadsorption et d'héماغglutination des hématies humaines, de cobaye, ou de poussin. De plus le virus de type B donne un effet cytopathogène non caractéristique dans les cultures cellulaires.

Depuis quelques années certains auteurs emploient la technique d'immunofluorescence pour le diagnostic des infections à virus respiratoire et en particulier pour celui de la grippe. Cette technique d'immunofluorescence directe est répétable et rapide ainsi que spécifique pour le diagnostic de la grippe (9, 10, 11, 12, 13). Il semble possible, que bientôt, on puisse ainsi obtenir un diagnostic rhino-cytologique précoce de la grippe (9).

A.2.2. Choix d'une technique

Nous n'avons pas pu employer la technique standard d'isolement du virus grippal (5) la situation insulaire de Madagascar, son peuplement par des Lémuriens, interdisant l'importation de rein de singe.

Nous avons donc du nous limiter à l'isolement sur œuf embryonné en sachant que la sensibilité n'est pas excellente pour le virus de type B.

A.2.3. Description de la technique d'isolement du virus sur œufs

La technique utilisée a été celle, standardisée de l'OMS (2, 5) avec quelques modifications de détail.

Les prélèvements, préalablement centrifugés à 0°C, sont inoculés en cavité amniotique de 2 œufs embryonnés de 10 jours. Les inoculations sont pratiquées avec des seringues de 1 millilitre et des aiguilles calibre 22/3 cm.

Les œufs sont mirés avec un appareillage que nous avons dû mettre au point pour nous permettre d'éliminer les inconvénients de leurs coquilles brunes. La position de l'embryon est repérée. Après désinfection de la coquille on pratique, au niveau du gros bout de l'œuf, une ouverture punctiforme avec un poinçon et on enfonce l'aiguille de la seringue en direction de l'embryon. Dès que l'on est dans la cavité amniotique l'embryon suit les mouvements de l'aiguille. On injecte alors 0,2 ml de l'inoculum et on rebouche l'ouverture à la paraffine chaude.

Les œufs sont mis à incuber à 33°C pendant quarante-huit à soixante-douze heures en atmosphère humide. Les liquides amniotiques sont récoltés aseptiquement à la seringue au bout de ce temps. On ajoute des antibiotiques à ces fluides et on refait un passage sur œuf de 10 jours. On récolte de nouveau les liquides amniotiques et sur eux on recherche et on titre les hémagglutinines avec des hématies fraîches de cobaye en solution à 0,4 p. 100 dans du tampon PBS à pH : 7,2.

Si l'hémagglutination est positive à un taux supérieur ou égal à 1/8, on procède à l'identification. Si le taux de positivité est inférieur à 1/8, on refait un passage ; s'il n'y a pas d'hémagglutination, on considère que la recherche est négative.

Ultérieurement, pour entretenir la souche, il faut l'adapter à la cavité allantoïque des œufs de 10 jours : on mire des œufs, on repère la chambre à air et un emplacement sur le grand axe de l'œuf, à 1 centimètre de la limite de la chambre à air, libre de vaisseaux allantoïdiens. Après désinfection, un trou est percé au sommet de la chambre à air et un autre à l'endroit repéré. Puis on injecte, par ce deuxième trou, 0,2 ml d'inoculum à l'aide d'une aiguille de diamètre 26, à biseau court, de 1 centimètre de long, que l'on enfonce de 4 à 5 millimètres. Les trous sont rebouchés à la paraffine chaude et les œufs sont placés à 33°C pendant quarante-huit à soixante-douze heures. Les liquides allantoïdiens sont recueillis stérilement avec des pipettes à boule.

Toutes les opérations d'inoculation et de recueil des virus doivent se faire sous une hotte stérile, avec port d'un masque. les inoculats comme les liquides recueillis étant maintenus dans un bain-marie glacé.

La mise en évidence et le titrage des hémagglutinines se font sur microplaques en présence d'hématies de cobaye ou d'homme à 0,4 p. 100, ou de poussins à 0,5 p. 100 (2; 5). La lecture a lieu à la température de la pièce, dès que les hématies témoins ont sédimenté.

Le virus une fois isolé est conservé à -70°C dans les liquides amniotiques ou allantoïques fractionnés. A $+4^{\circ}\text{C}$. il doit être conservé en solution albumineuse pour garder un titre stable.

A. 3. *Identification des virus isolés*

Les virus isolés peuvent être identifiés par inhibition de l'hémagglutination ou de la neuraminidase, par fixation du complément, neutralisation, ou encore en cultures de tissus, par inhibition de l'hémadsorption.

A. 3. 1. Avantages et inconvénients des diverses techniques

a. *Inhibition de l'hémadsorption* : elle peut s'employer pour le typage des myxovirus isolés sur cultures cellulaires. Cependant cette technique est moins sensible que l'inhibition de l'hémagglutination et nécessite des anti-sérums de haut titre. On peut l'utiliser dans les cas où un titre hémagglutinant suffisant n'a pas été obtenu.

b. *Neutralisation* : c'est une technique assez lourde, ce qui en limite l'intérêt, de plus on retrouve certains des inconvénients de l'inhibition de l'hémagglutination : manque d'avidité pour les anticorps, présence d'inhibiteurs non spécifiques.

c. *Fixation du complément* : c'est une méthode d'autant plus intéressante qu'elle est souvent utilisée en virologie. Il existe 2 sortes de réaction suivant les antisérums employés :

— c. 1 : la réaction de fixation du complément spécifique du type. Elle ne permet qu'une identification grossière des virus.

Cependant, en cas d'apparition d'une nouvelle souche cette réaction peut être positive alors que l'inhibition de l'hémagglutination, plus spécifique, est négative. Dans ce cas, et s'il y a suspicion d'isolement, il peut être utile d'utiliser la fixation du complément, d'autant plus qu'elle n'a pas les mêmes inconvénients que l'inhibition de l'hémagglutination.

— c. 2 : la réaction de fixation du complément spécifique de souche. Elle est intéressante car aussi fine que l'inhibition de l'hémagglutination dont elle n'a pas les inconvénients. Mais la préparation des réactifs est difficile et onéreuse. (Car les anti-sérums doivent être préparés contre des antigènes V de surface, libres de tout antigène S, soluble, ou antigène nucléo-protéique).

d. *Inhibition de l'hémagglutination* : c'est une réaction simple qui permet de mettre en évidence l'hémagglutinine virale. Elle autorise des comparaisons immédiates du virus isolé avec les souches antérieurement connues et la détermination des sous-types grâce aux réactions d'inhibition croisées.

Ses inconvénients sont : la variation selon les souches de l'importance de l'hémagglutination, le degré d'affinité faible pour les anticorps (non-avidité), la présence d'inhibiteurs non spécifiques que l'on trouve dans les sérums normaux, obligeant à un traitement préalable des sérums ce qui pourrait réduire le titre des anticorps.

e. *Inhibition de la neuraminidase* : il s'agit d'une technique récente (17) qui semble aussi sensible que les 2 précédentes.

A.3.2. Choix d'une technique

Nous avons travaillé en inhibition de l'hémagglutination pour l'identification des virus par souci de simplicité, car nous avons décidé de l'utiliser pour les études sérologiques. En cas de doute, nous nous proposons de contrôler nos résultats par la fixation du complément spécifique de type.

A.3.3. Description de la technique d'inhibition de l'hémagglutination pour identification du virus

Nous avons procédé selon la méthode standard de l'OMS, sur microplaques (5, 6, 2) avec une seule modification : notre

solution d'hématies n'était pas standardisée selon une courbe étalon au spectrophotomètre. Nous réalisons une dilution aussi précise que possible de notre solution d'hématies de cobaye, à 0,4 p. 100 dans le tampon PBS.

B. SÉROLOGIE

B.1. Principales techniques

- La première technique découverte a été l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ou réaction de Hirst, qui met en évidence les anticorps contre l'hémagglutinine virale (16).

Cette réaction est spécifique de souche; aussi faut-il disposer, comme antigènes, de virus étroitement liés antigéniquement aux virus couramment en cause. Cependant, si l'on dispose du virus de l'épidémie en cours, le diagnostic sérologique est plus facile.

De plus, comme nous l'avons déjà vu, il est nécessaire de traiter préalablement les sérums afin d'éliminer les inhibiteurs non spécifiques.

Des modifications de la technique initiale ont permis de l'adapter en microtechnique, plutôt que sur tube, avec la même sensibilité et en économisant les réactifs (2, 5, 21).

- La technique de fixation du complément, spécifique de type (utilisant l'antigène S viral), est également très employée car utilisée largement pour le diagnostic d'autres maladies à virus. Elle a été standardisée et adaptée aux microméthodes (2, 5, 22).

- La technique d'inhibition de la neuraminidase est moins souvent employée.

- Il existe aussi différentes techniques qualitatives de double-diffusion en gel (18, 19, 20), et une technique quantitative récente (1972) d'immuno diffusion simple où seul l'anticorps migre (15). Cette réaction a l'avantage de titrer les anticorps à la fois contre les hémagglutinines et les neuraminidases, cependant il faut pour pouvoir la réaliser produire des quantités d'antigène hautement purifiées et concentrées.

B.2. *Choix d'une technique*

Nous avons surtout le choix entre deux techniques pour lesquelles nous disposons des réactifs nécessaires (*), chacune d'elles ayant ses avantages et ses inconvénients.

— La réaction de fixation du complément n'est influencée ni par les changements antigéniques du virus, ni par les inhibiteurs non spécifiques des sérums. Par contre la mise au point, au départ est plus délicate (établissement de la courbe étalon pour le point d'hémolyse 50 p. 100, titrage du complément, etc.), les anticorps apparaissent et disparaissent précocément, la technique est peu sensible chez les jeunes enfants.

— La réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est influencée par les changements antigéniques du virus, mais, si on peut utiliser la souche épidémique elle est très sensible. Elle est aussi sensible aux inhibiteurs non spécifiques. Mais la technique est simple, les anticorps apparaissent et disparaissent tardivement, enfin elle est sensible chez les jeunes enfants.

Nous avons choisi la technique d'inhibition de l'hémagglutination en particulier pour avoir une idée de l'état d'immunité pré-épidémique de la population testée.

B.3. *Description de la technique d'inhibition de l'hémagglutination*

Nous avons utilisé la technique standardisée, en microplaques, de l'OMS (5) avec comme seule modification le fait que les hématies de cobaye employées n'étaient pas dosées exactement par leur teneur en hémoglobine pour obtenir la solution à 0, 4 p. 100. Cependant cela ne nous a pas semblé important pour le résultat des réactions.

III. RÉSULTATS

A. DE L'ÉTUDE VIROLOGIQUE

A.1. *Isolements*

Nous avons utilisé pour les inoculations 86 prélèvements de 43 malades, 15 d'entre eux ont été perdus en cours de manipulation.

(*) Nous remercions le Docteur ASSAAD, et le Docteur CHAS COCKBURN de l'OMS, qui nous ont aidé dans ce travail en nous procurant sérums et antigènes de référence.

Les 71 prélèvements restants, pour 41 malades, se répartissent ainsi :

- 30 doubles prélèvements ;
- 10 prélèvements de nez isolés ;
- 1 prélèvement pharyngé.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I

(Résultats des isolements de virus *Influenza* sur 71 prélèvements de 41 malades)

Nature du prélèvement	Total inoculés	Positifs	Pourcentage de positifs
Pharyngé.....	31	11	35,5 p. 100
Nasal.....	40	13	32,5 p. 100
TOTAL.....	71	24	33,8 p. 100

Pour les 30 doubles prélèvements étudiés, les résultats positifs se répartissent comme suit :

- Pharynx +, nez + 6
- Pharynx +, nez — 5
- Pharynx —, nez + 3
- Pharynx —, nez — 16

Nous avons donc isolé 24 souches de virus *Influenza* sur 71 prélèvements (33,8 p. 100) et pour 41 malades nous avons isolé 18 fois le virus (44 p. 100).

Les isolements ont été d'autant plus fréquents qu'il s'agissait d'enfants et de prélèvements faits au début de la maladie.

A.2. Typage

Il pouvait être effectué dès que le titre d'hémagglutinine était supérieur à 1/8, ce qui fut le cas dans 14 isolements sur 24.

Il a été réalisé à ce jour sur 9 souches différentes. Aucune n'a réagi avec le sérum anti B/Hong Kong/5/72 ; alors que, contre le sérum anti A/England/42/72, les 9 souches étaient

positives : 1 à un taux limite de 1/20, 6 au taux limite de 1/40, et 2 au taux limite de 1/80.

L'identification complète de 5 souches (Tan 5/74, 13/74, 18/74, 23/74, 28/74) lyophilisées a été réalisée au Centre national de la Grippe, à l'Institut Pasteur de Paris par le Dr THIBON. Il s'agissait pour les 5 souches du variant intra-sous-typique A2/Port-Chalmers (*) 1973.

B. DE LA SÉROLOGIE

Nous avons constaté une ascension du titre des anticorps dans 41 cas sur 68 ; cette ascension était significative dans 32 cas (47 p. 100).

Chez 37 malades pour lesquels on a réalisé à la fois isolement et sérologie le diagnostic de grippe a pu être porté 26 fois (70,4 p. 100) par l'une ou l'autre méthode (Tableau II).

TABLEAU II

(Résultats de l'isolement et de la sérologie chez 37 malades)

		Sérologies		
		+	-	Total
Isolements	+	12	4	16
	-	10	11	21
TOTAL		22	15	37

On remarque que pour 4 malades l'isolement a été positif et la sérologie négative. Il s'agissait d'une ascension insuffisante (3 cas) ou inexistante (1 cas) du titre des anticorps entre les 2 prélèvements.

Enfin il faut souligner que 49 des 68 sérums précoces testés avaient un titre d'anticorps nul. Mais on n'a pas pu mettre en évidence, sur ce faible échantillon, de corrélation entre le titre précoce des sérums et l'âge des malades.

(*) Port-Chalmers est une localité de la côte Sud-Est, de l'île sud de la Nouvelle-Zélande.

IV. ÉTUDE CLINIQUE

A. FORMES CLINIQUES, COMPLICATIONS

Les signes cliniques étaient assez stéréotypés. Le début était brutal avec fièvre élevée, céphalées, asthénie, courbatures, toux sèche, rhinorrhée. La durée de la phase d'état était de 2 à 5 jours avant la défervescence brutale. Il subsistait souvent une asthénie et une toux résiduelle.

Les formes atypiques étaient surtout des formes frustes : simple courbature fébrile avec asthénie ; atteinte des voies respiratoires supérieures (rhinopharyngite, laryngite). Mais il y a eu également des formes compliquées avec bronchites, broncho-pneumopathies, épistaxis.

Pour avoir une idée plus précise des formes cliniques nous avons relevé les données concernant les consultations du Médecin-Chef de l'OSTIE pour la période de juin à octobre 1974 (tableau III).

Pendant la période épidémique (août-septembre) nous voyons que les bronchites sont presque aussi fréquentes que les gripes et qu'il existe, également, une augmentation importante du pourcentage d'atteintes des voies respiratoires supérieures. De plus, près de 5 p. 100 des consultations respiratoires n'ont pas été suivies par un diagnostic au mois de septembre.

L'étude des dossiers des malades nous a permis d'étudier la fréquence des formes cliniques en fonction des âges (tableau IV).

On voit que la fréquence des bronchites décroît quand l'âge augmente, alors que, inversement, celle des localisations respiratoires supérieures et des gripes typiques s'élève. On observe 3 complications pour 85 cas de grippe dans la classe d'âge de 0 à 15 ans.

B. ÉTUDE DES COMPLICATIONS DE LA GRIPPE DANS LE SERVICE DE PNEUMOLOGIE DE L'HOPITAL GÉNÉRAL DE BEFELATANANA (*).

Nous avons relevé des renseignements concernant les malades hospitalisés dans le Service de pneumologie et entrés au cours du mois de septembre 1974 (mois où la morbidité était maximum à Tananarive).

La répartition des diagnostics pour 154 malades est rapportée dans le tableau V.

TABLEAU III

(Type des affections respiratoires dans une consultation de l'OSTIE, pendant la période juin-octobre 1974)

Type d'affections respiratoires	Juin		Juillet		Août		Septembre		Octobre		Total juin-octobre	
	Total*	p. 100	Total	p. 100	Total	p. 100	Total	p. 100	Total	p. 100	Total	p. 100
Atteinte voies respiratoires supérieures	148	16,9	162	22,5	272	19,5	330	22,3	122	15,9	1 034	19,7
Bronchites	297	34,0	228	31,6	519	37,2	585	35,5	240	31,3	1 809	34,5
« Grippe »	398	45,5	298	41,3	576	41,3	552	37,3	394	51,4	2 218	42,4
Divers	30	3,4	32	4,4	26	1,8	71	4,8	10	1,3	169	3,2
TOTAL	873		720		1 393		1 478		766		5 230	

(*) Consultations.

TABLEAU IV

(Fréquence des formes cliniques de grippe
en fonction des âges des malades)

Classes d'âge	Atteinte voies respi- ratoires supérieures	Grippes typiques	Bronchites	Complica- tions	Total
0-5.....	9	26	47	3	85
6-15.....	17	26	41	1	85
Adultes.....	7 (*)	37	22	-	66
TOTAL.....	33	89	110	4	236

(*) Ce nombre est probablement sous-estimé, car les adultes ne consultent pas constamment en cas de rhino-pharyngites simples.

TABLEAU V

(Répartition suivant les diagnostics de 154 malades
hospitalisés en pneumologie, au mois de septembre 1974. —
Certains malades ont eu plusieurs diagnostics)

Diagnostic	Nombre de cas	Pourcentage des diagnostics
Bronchite grippale.....	36	23,3 p. 100
Pneumopathie aiguë.....	42	27,2 p. 100
Asthme.....	23	14,9 p. 100
Bronchite chronique.....	16	10,3 p. 100
Tuberculose pulmonaire.....	20	12,9 p. 100
Hémoptysie.....	5	3,2 p. 100
Divers.....	7	4,4 p. 100
Pas de diagnostic.....	7	4,4 p. 100
TOTAL diagnostics.....	156	100 p. 100

(*) Nous remercions Mme le Docteur M. SCHAFFNER-RAZAFINDRAHABA, Chef de Service, grâce à laquelle cette partie de notre travail a été possible.

Donc 23 p. 100 des malades étaient sûrement hospitalisés en raison de la grippe, et une grande partie de ceux hospitalisés pour pneumopathie aiguë (27 p. 100) avaient en réalité des formes compliquées de grippe. On peut dire qu'au cours du mois de septembre 25 à 50 p. 100 des entrées ont été dues à la grippe.

B.1. Les associations morbides

Les associations morbides observées ont été les suivantes :

- Bronchite grippale + hémoptysie (1 cas)
- Bronchite grippale + éthyliste
- Bronchite grippale + bronchite chronique
- Bronchite grippale + asthme
- Bronchite grippale + dilatation des bronches
- Bronchite grippale + cardiopathie
- Pneumopathie aiguë + hémoptysie (2 cas)
- Pneumopathie aiguë + insuffisance cardiaque
- Pneumopathie aiguë + dilatation des bronches.

Comme il est classique de l'observer un bon nombre de complications grippales sont survenues sur des terrains affaiblis.

La répartition des complications selon le sexe et l'âge moyen de ces malades est présentée dans le tableau VI.

TABLEAU VI

(Répartition des complications grippales et autres maladies des voies respiratoires selon le sexe. Age moyen des complications grippales et autres maladies respiratoires)

Aspects cliniques	1 Hommes	2 Femmes	3 Hommes + femmes	Pourcentage femmes (2/3)	Age moyen des malades
Pneumopathies aiguës	27	15	42	35,7 p. 100	40
Bronchites	23	13	36	36,1 p. 100	37
Autres maladies des voies respiratoires	44	32	76	42,1 p. 100	53
TOTAL	94	60	154	38,9 p. 100	

Il semble donc exister un excès de complications chez les hommes compte tenu du fait qu'ils représentent une plus grande part des hospitalisés. De plus il apparaît que les malades hospitalisés pour des complications grippales sont, en moyenne, plus jeunes que ceux hospitalisés pour d'autres raisons.

La répartition des complications selon les âges, nous est donnée dans le tableau VII.

TABLEAU VII

(Répartition des complications en fonction des classes d'âge)

Classes d'âge	Bronchite	Pneumopathies aiguës	Total
0-15(*).....	3	6	9
16-25.....	9	5	14
26-35.....	5	5	10
36-45.....	7	6	13
46-55.....	4	11	15
56-65.....	7	5	12
65 et plus.....	1	4	5

(*) Les nombres de complications relevées dans cette classe d'âge sont sous-estimés, puisque les données viennent d'un Service de pneumologie d'adultes.

On voit que, en ce qui concerne les complications, les bronchites grippales semblent assez bien réparties entre les différentes classes d'âge, alors que les pneumopathies aiguës donnent un pic net pour les sujets de 46 à 55 ans.

B.2. Etude clinique de la mortalité dans le Service de pneumologie au mois de septembre 1974

Au mois de septembre 1974 on a relevé 24 décès survenus avec les diagnostics suivants : bronchite grippale (2 cas), pneumopathie aiguë (5 cas), tuberculose pulmonaire (5 cas), bronchite chronique (5 cas), bronchopneumopathie chronique (2 cas), asystolie (4 cas), cœur pulmonaire chronique (4 cas).

La grippe peut donc être considérée comme directement responsable des décès dans 7 cas sur 24 (29 p. 100). En fait, en comparant ces chiffres avec ceux de la mortalité des années précédentes, il est probable qu'elle est intervenue comme facteur déterminant dans le décès d'autres malades.

Nous donnons, ci-dessous, le détail du diagnostic pour les malades présumés décédés de complications grippales :

- bronchite aiguë, 49 ans ;
- bronchopneumopathie, 98 ans ;
- pneumopathie aiguë, 74 ans ;
- bronchopneumopathie avec insuffisance cardiaque, 85 ans ;
- pneumopathie aiguë et asystolie, 34 ans ;
- bronchite grippale et bronchite chronique, 70 ans ;
- pneumopathie aiguë et tuberculose pulmonaire, 35 ans.

L'âge moyen de ces sujets décédés de complications grippales est de 64 ans, alors qu'il est de 50 ans pour l'ensemble des autres malades décédés au mois de septembre. Ceci souligne encore le rôle de facteur aggravant constitué par l'âge élevé des malades. Les complications de la grippe ne sont pas plus fréquentes chez les malades âgés (l'âge moyen des hospitalisés au mois de septembre pour pneumopathie aiguë ou bronchite aiguë est de 39 ans, alors qu'il est de 53 ans pour les autres hospitalisés), mais, si ces complications surviennent chez des malades âgés, elles sont souvent graves.

On remarque enfin le rôle comme facteur de gravité des tares pulmonaires ou cardiaques associées à la grippe.

I. DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR LA GRIPPE A TANANARIVE EN 1974

A. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE SURMORBIDITÉ

En comparant les chiffres globaux des consultations à FOSTIE (dans les 3 dispensaires de Tananarive) pendant la période juin-octobre 1974 avec ceux des moyennes des périodes correspondantes des 4 années précédentes (à nombre d'inscrits égal) nous voyons apparaître une surmorbidité importante due aux maladies des voies respiratoires avec un total de 19 942 consultations de plus pour les 5 mois étudiés (tableau VIII).

TABLEAU VIII

(Nombre de consultations, dans les 3 dispensaires de l'OSTIE pendant les mois de juin à octobre 1974. Différences par rapport au nombre moyen de consultations de la période juin-octobre 1969-1970 1971-1972. Chiffres corrigés : nombre de consultations à nombre d'inscrits égal)

Années	Nombre de consultations					
	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Total
1973 (*) (1).....	12 455	15 446	14 746	15 292	17 346	75 282
1974 (2).....	11 844	14 446	16 287	17 522	15 982	76 081
Moyenne (3) 1969 à 1972 ..	10 378	12 252	10 004	11 716	11 789	56 139
Différence 2-3...	1 466	2 194	6 283	5 806	4 193	19 942

(*) L'année 1973 n'a pas été retenue comme année de référence en raison de nombre élevé de consultations

D'après ces données, en 1974, à Tananarive, le pic de l'épidémie se situe en août et septembre. On note aussi un nombre de surconsultations presque aussi important en 1973, avec un pic en octobre.

B. ESTIMATION DE L'INCIDENCE DANS LA POPULATION DE TANANARIVE

B.1. Estimation globale

Nous avons entrepris une étude sur les dossiers médicaux des familles de travailleurs inscrits à l'OSTIE, de trois entreprises différentes de la région de Tananarive, en ne gardant pour ce travail que les dossiers des consultants de l'année. A partir d'eux, nous avons ainsi calculé les fréquences d'affections grippales dont nous avons déduit un nombre estimé de gripes pour l'ensemble des membres des familles étudiées (tableau IX).

D'après l'étude de 976 dossiers de 142 familles complètes et de 5 célibataires (dont 221 dossiers éliminés au départ) nous obtenons une fréquence globale de la grippe de 28,5-34,7 p. 100.

TABLEAU IX

(Estimation d'un pourcentage de grippés à partir de l'étude de 976 dossiers de 142 familles et 5 célibataires pris parmi des travailleurs inscrits à l'OSTIE de 3 entreprises de la région de Tananarive)

Catégorie	Total dossiers	Nombre estimé de grippés	Limite de confiance de la fréquence estimée
Enfants	687	22	28,1-36,3 p. 100
Hommes	146	37	15,9-30,2 p. 100
Femmes	143	50	23,7-41,5 p. 100
TOTAL	976	312	28,5-34,7 p. 100

Cette fréquence estimée ne peut pas être extrapolée sans réserves à l'ensemble de la population de Tananarive puisque un des adultes au moins de chaque famille travaille dans le secteur privé et a moins de 60 ans.

B.2. Influence de l'âge et du sexe

Avec les données de l'OSTIE nous avons pu étudier les fréquences des cas de grippe en fonction de l'âge et du sexe ; pour cela nous avons dû étudier des dossiers supplémentaires pour compléter les classes d'âge 36-45 et « 46 et plus » pour lesquelles les effectifs étaient insuffisants. (tableau X).

Le tableau X nous montre qu'il existe une grande fréquence des atteintes grippales chez le nourrisson de 0 à 2 ans, due probablement à leur fragilité particulière mais aussi, peut-être, à une surestimation du nombre de cas du fait que le diagnostic est plus incertain à cet âge (pas de notions de céphalées ou de courbatures, formes atypiques nombreuses).

Chez les enfants, les garçons sont plus touchés que les filles dans toutes les classes d'âge (sauf de 6 à 10 ans). Ceci est particulièrement net pour la classe d'âge de 3 à 5 ans. A partir de 10 ans les garçons semblent atteints à peu près dans les mêmes proportions que les hommes. Par contre, les filles à partir de 5 ans restent constamment à un pourcentage bien inférieur à celui trouvé chez les femmes.

Chez les adultes, les femmes sont plus touchées que les hommes, quelle que soit la classe d'âge considérée. Les fréquences des atteintes grippales semblent stables de 15 à 45 ans, puis elles décroissent pour la dernière classe d'âge (adultes nés avant 1928).

TABLEAU X

(Influence de l'âge et du sexe sur la fréquence de la grippe. D'après une étude sur dossiers des travailleurs inscrits à l'OSTIE et de leurs familles. Les résultats sont présentés sous 2 tableaux différents car les adultes étudiés travaillaient dans d'autres entreprises que celles ayant permis l'étude familiale)

Classes d'âge	Hommes		Filles		Total	
	Total	P. 100 grippés	Total	P. 100 grippés	Total	P. 100 grippés
ENFANTS						
0-2	33	68,4	39	56,4	77	62,3
3-5	61	47,5	54	25,9	115	37,4
6-10	92	25,0	83	27,2	180	26,1
11-15	68	33,8	50	20,0	118	27,9
TOTAL ...	259	33,9	231	30,3	490	34,8
Intervalle de confiance.....		30-44,8		22,5-35,2		29,4-38,8
ADULTES						
15-25	86	29,0	177	41,2	263	37,2
26-35	70	31,4	72	40,3	142	35,9
36-45	71	29,5	47	44,6	118	35,6
46 et plus	70	24,2	42	33,3	112	27,6
TOTAL ...	297		338		635	
Intervalle de confiance.....		23,6-34,2		37-46		29,9-38,8

B.3. Influence des postes de travail sur la fréquence de la grippe

Nous avons trouvé des fréquences de grippés variables suivant les entreprises, surtout chez les femmes (tableau XI).

Cette variabilité ne peut être analysée plus précisément en l'absence de renseignements précis sur les postes de travail des employés des entreprises, les causes en sont sûrement multiples et intriquées.

TABLEAU XI

(Variation des pourcentages de grippés, suivant le sexe et les entreprises)

Travailleurs	Entreprise n° 1		Entreprise n° 2		Entreprise n° 3		Total	
	Effectif	P. 100 grippés	Effectif	P. 100 grippés	Effectif	P. 100 grippés	Total	P. 100 grippés
Hommes	33	33,3	108	33,3	73	26,0	214	30,8
Femmes	61	44,2	29	24,1	218	42,2	308	40,9

B.4. Rôle du contagé familial

Le tableau XII nous donne les pourcentages de grippe chez les hommes, les femmes et les enfants de trois entreprises X, Y, Z.

TABLEAU XII

(Relation entre la fréquence de la grippe, chez les mères et leurs enfants, dans 3 entreprises)

Catégorie	Entreprise n° X		Entreprise n° Y		Entreprise n° Z	
	Total	P. 100 grippés	Total	P. 100 grippés	Total	P. 100 grippés
Enfants	299	33,6	227	37,5	122	24,6
Femmes	64	45,9	50	32,4	29	19
Hommes	67	31,0	50	15,5	29	26,1

On voit nettement que, dans l'entreprise « Z » toutes les fréquences de grippés sont basses, y compris celles des enfants. La plus grande fréquence de grippés chez les enfants de l'entreprise « Y » par rapport à ceux de l'entreprise « X » peut s'expliquer

par le fait que les travailleurs de l'entreprise « Y » étaient plus jeunes, en moyenne, que ceux de l'entreprise « X », et, donc, que leurs enfants étaient plus jeunes et plus réceptifs.

Nous avons également noté que, dans l'entreprise « X » (majorité de travailleurs féminins), il n'y avait pas de grippe chez 6 travailleurs sans enfants alors qu'elle avait frappé 38 des 88 travailleurs avec enfants. Ce fait suggère un contage intra-familial important dont nous avons essayé de préciser la part, par rapport au contage professionnel, en étudiant les dossiers des familles. Pour chaque famille nous avons relevé la, ou les dates de début de la grippe et nous avons émis l'hypothèse que lorsque deux membres d'une même famille contractent la grippe à quelques jours d'intervalle (dans la même quinzaine) il y a eu contage intra-familial. Nous avons ainsi obtenu les résultats rapportés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

(Estimation maximum du contage intrafamilial au sein de 41 familles d'après les concordances des dates d'apparition des signes cliniques de grippe dans chaque famille)

	Enfants	Parents	
		Femmes	Hommes
Total examinés	161	41	41
Total grippés	77	13	6
Total contages intra-familiaux maximum relevés	23	4	0
P. 100 maximum de grippés à contage intra-familial	30 p. 100	30 p. 100	0

Nous avons donc, au maximum, 30 p. 100 des femmes et des enfants qui ont contracté la grippe par contagion intra-familiale ; au contraire, chez les hommes travailleurs, aucun des 6 grippés n'a subi ce type de contage.

Si, dans chaque famille, un seul de ses membres avait transmis la maladie aux autres, pour 41 familles il aurait théoriquement pu y avoir 55 contages intra-familiaux au maximum. Nous

en avons trouvé 27 sur 55 soit près de 50 p. 100 des possibilités qui se sont réalisées (*).

Nous retiendrons de ceci la grande importance du contagage intra-familial pour les femmes et les enfants et l'influence plus faible pour les hommes.

C. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE SURMORTALITÉ
PENDANT LA PÉRIODE ÉPIDÉMIQUE

Grâce à l'obligeance de Mme le Docteur M. SCHAFFNER-RAZAFINDRAHABA, chef du Service de pneumologie de l'Hôpital général de Befelatanàna, nous avons obtenu les données suivantes sur la mortalité dans le Service de pneumologie pendant la période de juin à octobre (tableau XIV).

TABLEAU XIV

(Mortalité dans le Service de pneumologie de l'Hôpital de Befelatanàna pendant trois années consécutives)

Mois	1972	1973	1974
Juin	10	12	8
Juillet	8	10	9
Août	11	12	13
Septembre	8	8	24
Octobre (16 jours)	1	2	5

On remarque une surmortalité nette en septembre et octobre par rapport aux années précédentes et, également le décalage de cette surmortalité par rapport au pic épidémique d'août-septembre.

(*) NB. Le nombre des contagages théoriques maximum pour l'ensemble de « p » familles comprenant « i » enfants et parents grippés ($i = i_a, \dots, i_p$) est donné par la formule :

$$C_m = \sum_{i = i_a}^{i = i_p} i - 1$$

VI. — DISCUSSION

Nous avons réalisé en septembre 1971 l'étude virologique et sérologique d'une épidémie de grippe, à Tananarive. Un virus *Influenza* identifié comme A.2/Port-Chalmers/1973 a été isolé chez 18 malades sur 41. La sérologie a été positive dans 41 cas sur 68. Chez 37 malades pour lesquels nous avons pratiqué isolement et sérologie le diagnostic a pu être porté 26 fois, c'est-à-dire dans 70 p. 100 des cas.

Pour 9 sérums sur 68 l'ascension du taux des anticorps n'était pas significative : on peut penser que, dans ces cas, les deuxièmes prélèvements étaient effectués trop rapidement après les premiers (15 jours) ; ou bien la réponse immunitaire de certains malades était faible. Notre échantillon était trop faible pour vérifier s'il existe une relation entre l'importance de la montée des anticorps et la sévérité clinique.

D'autre part on a pu noter que 49 des 68 sérums précoces testés n'avaient pas d'anticorps contre le virus de l'épidémie. Ceci peut vouloir dire que ces malades n'avaient pas encore été en contact avec un virus grippal A2 proche de celui de l'épidémie. Cependant, comme la réaction d'inhibition de l'hémagglutination est spécifique de souche, il est néanmoins possible que ces sujets aient eu des anticorps contre des souches différentes du virus épidémique, non-détectés par l'IHA. Nous ignorons d'ailleurs le niveau d'immunité de la population non-grippée. Toutefois, étant donné que l'incidence de la grippe, à Tananarive, était importante (de l'ordre de 30 p. 100) et comme, d'autre part, il n'y a pas de hiatus net entre les fréquences de gripes selon les classes d'âge (excepté entre nourrissons et enfants plus âgés, mais les statistiques de l'OSTIE nous ont montré qu'il n'y avait pas eu d'épidémie de grippe depuis 1969) on peut supposer que la population de Tananarive, dans son ensemble, était peu protégée contre le virus A2 (sauf, peut-être, pour la classe d'âge née antérieurement à 1928). Une étude sérologique supplémentaire aurait été nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

D'un point de vue épidémiologique, les statistiques de morbidité globale de l'OSTIE, pour la période 1969-1974 (tableau VIII), ainsi que celles de mortalité du Service de pneumologie

de l'Hôpital Befelatanàna nous permettent de préciser les points suivants :

— Il n'y a pas eu d'épidémies de grippe, à Tananarive, de 1969 à 1972.

— En 1973 il a existé une surmorbidity importante, due aux maladies respiratoires, d'origine très probablement virale. Mais elle ne s'est pas accompagnée de surmortalité ce qui permet d'éliminer le rôle de virus *Influenza*, de type A, épidémique.

— En 1974, la grippe vraie s'est manifestée par une surmorbidity et par une surmortalité.

— La ville de Tananarive a été atteinte par l'épidémie pendant les mois de juillet-août-septembre-octobre 1974, avec un pic de morbidité en août et septembre et un pic de mortalité important et retardé en septembre et octobre. L'épidémie ne nous a pas paru présenter de caractères particuliers dans son déroulement, le fait qu'elle ait été assez étalée dans le temps peut être lié à la structure urbaine, lâche, étendue de Tananarive.

La répartition des cas de grippe en fonction de l'âge et du sexe pose quelques problèmes : parmi les enfants, les garçons ont été plus touchés que les filles et, parmi les adultes, les femmes plus que les hommes. La résistance aux infections est connue pour être inférieure chez le sexe masculin ce qui pourrait expliquer le premier résultat, à moins que les conditions de contagion ne soient différentes chez les garçons et chez les filles. Le fait que, pour les adultes, les femmes soient les plus touchées se traduit, chez les travailleuses de différentes entreprises, par un pourcentage de gripes de 37 à 46 p. 100 contre 23 à 34 p. 100 chez les hommes et 29 à 38 p. 100 chez les enfants. Il faut voir là le rôle du contagion familial ajouté au contagion professionnel et peut-être aussi l'influence du poste de travail particulièrement favorable à la contagion des ouvrières. En effet notre estimation du pourcentage global de gripes à partir des dossiers des familles pour lesquelles la majorité des femmes ne travaillaient pas nous donne un pourcentage beaucoup plus faible de 28,5 à 34,7 p. 100. Ceci souligne les difficultés d'estimation de l'incidence de la grippe dans l'ensemble d'une population à partir de résultats obtenus sur un échantillon sélectionné.

Dans l'ensemble ce travail suggère une plus grande résistance à la grippe dans le sexe féminin et il souligne le phénomène

du contagé intra-familial qui concerne préférentiellement femmes et enfants (tableau XIII). Les parts relatives du contagé familial et professionnel varient évidemment beaucoup selon les échantillons.

En ce qui concerne les complications de la grippe, nous avons trouvé plus de formes compliquées chez les jeunes enfants que chez les adultes et, pour les malades hospitalisés, plus de bronchites et de pneumopathies aiguës chez les hommes que chez les femmes. En septembre 1974, plus de 50 p. 100 des malades du Service de pneumologie de l'Hôpital de Befelatanàna étaient hospitalisés pour des complications de grippe. La mortalité a concerné préférentiellement les sujets les plus âgés (*).

RÉSUMÉ

Les auteurs rapportent les résultats d'une étude virologique, sérologique et épidémiologique d'une épidémie de grippe survenue à Tananarive, Madagascar, pendant les mois froids de l'hiver austral. Il a été isolé plusieurs souches de virus A2/Port-Chalmers/1973, les premières obtenues dans la Grande Ile — Sérologie et virologie ont ensemble permis un diagnostic dans 70 p. 100 des cas étudiés — Une enquête épidémiologique approfondie a été menée à partir des données fournies par la consultation du Service de médecine du Travail inter-entreprises, et par l'étude des malades hospitalisés dans le Service de pneumologie de l'Hôpital général — Elle a mis en évidence l'absence

(*) Nous avons pu réaliser récemment une étude statistique de la mortalité à Tananarive pendant cette période, à partir des données qui nous ont été fournies par le Dr RANDRIANARIVO, Médecin-Chef du Bureau municipal d'hygiène.

Ce travail, qui fera l'objet d'une publication ultérieure, nous a permis de montrer, pour la période juillet-octobre 1974 une surmortalité respiratoire de 47 p. 100 et une surmortalité globale de 16,2 p. 100 par rapport à la période correspondante de 1971 à 1973.

De plus en partant de l'estimation de morbidité de 28,5 à 24,7 p. 100 et du chiffre de la population de Tananarive (387 000 habitants en 1974) nous avons pu calculer la fréquence de morbidité qui se situe entre 1,24 et 1,25 p. 1000. Il a été montré également que la surmortalité globale, très importante par rapport à d'autres études, était due, en partie, à la surmortalité chez les malades cardio-vasculaires.

Ces chiffres élevés de morbidité et de mortalité d'origine grippale sont probablement à mettre en relation avec l'absence d'épidémie grippale récente à virus A2 (au moins depuis 1969) sur cette Ile de l'Océan Indien et, ils posent le problème de l'intérêt de la vaccination des catégories d'individus les plus menacés.

de caractères propres à la grippe pendant l'hiver austral, dans une Ile de la zone tropicale de l'Océan Indien, à l'échelon d'une grande ville de 500 000 habitants située sur les hauts plateaux à une altitude de 1 300-1 400 mètres.

BIBLIOGRAPHIE

1. HIGGINS (P.-G.), ELLIS (E.-M.), 1972. — The isolation of Influenza Viruses. *J. clin. Path.*, **25** : 521-24.
2. LENNETTE (E.-H.), SCHMIDT (N.-J.) 1969. — Diagnostic Procedure for viral and rickettsial infections, chapter XI : 419.
3. HIGGINS (P.-G.), ELLIS (E.-M.), WEOLLEY (D.-A.) 1969. — A comparative study of standard methods and organ cultures for the isolation of respiratory viruses. *J. med. Microb.*, **2**, 2.
4. BRICOUT (F.), HURAU (J.-M.) 1973. — Méthode d'isolement du virus grippal et Méthode de diagnostic sérologique et immunologique. *Rev. du Prat.*, **23** : 477.
5. Laboratory Methods in Respiratory Virus infections. Course 8240C, 1974. Cours de l'US Department of Health Education and Welfare Center for Disease Control. Atlanta, Georgia, 30, 333.
6. Cours de l'OMS de l'Institut Pasteur de Dakar, 1969.
7. BRICOUT (F.) JOUBET (L.) HURAU (J.-M.) 1974. — Diagnostic séro-immunologique des viroses animales et humaines. Librairie Maloine.
8. LEPINE, 1964. — Techniques de Laboratoire en Virologie humaine Librairie Masson.
9. HERS (J.-F.) KERIP (L.-V.-D.), MASUREL (N.) 1971. — Rapid diagnosis of respiratory virus infection in infected tissue cultures. *Ann. New York. Ac. Sc.*, 177. 0022-0621.
10. LIEU (C.) 1956. — Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluoresceinated antibody. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **92** : 883.
11. EBISAWA (I.-T.), TARKUCHI (X.) MAKINO (M.) 1968. — Immunocytologic and serologic diagnosis of influenza A2. *Jap. J. exp. Med.*, **38** : 225.
12. DOBARDZIC (R.), BOUDREAU (A.), PAVILANIS (V.) 1973. — L'identification du virus de l'influenza à l'aide de l'immunoperoxydase. *Canad. J. Microbiol.*, **19** : 147.
13. MINUTI (R.), ROCCHI (G.), ARANGIO-RUIZ (G.), GIANNINI (V.), ARCHETTI (I.) 1972. — Diagnosi rapida di virosi Respiratorie Mediante immunofluorescenza su colture cellulari infetti. *Annali S. Clano*, **14**, 2 : 159.

14. SCHILD (G.-C.) 1972. — Serological diagnosis of human influenza infections by immunodiffusion technique. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **45** : 465.
15. SCHILD (G.-C.), AYMARD (M.-H.), PEREIRA (H.-G.) 1972. — A quantitative single radial diffusion test for immunological studies with influenza virus *J. gen. Virol.*, **16** : 231.
16. HIRST (G.-K.) 1942. — The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. exp. Med.*, **75**, 47.
17. ADA (G.-L.), LIND (P.-E.), LAVER (W.-G.) 1963. — An immunological study of avian viral and bacterial neuraminidase based on specific inhibition of enzyme by antibody. *J. gen. Microbiol.*, **32**, 225.
18. STYK (B.), HANA (L.) 1966. — Immunodiffusion studies on the reaction of influenza virus with specific antibody and non specific serum beta inhibitor. *Acta Virol.*, **10**, 281.
19. SCHILD (G.-C.), PEREIRA (H.-G.) 1969. — Characterisation of the ribonucleoprotein and neuraminidase of influenza A virus by immunodiffusion. *J. Virol.*, **4**, 355.
20. MANCINI (G.) and al. 1965. — Immunochemical quantitation of antigen by simple radial immunodiffusion. *Immuno Chemistry*, **2**, 235.
21. SEVER (J.-L.) 1962. — Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunology*, vol. **88** : 320.
22. 1965. — Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. *Public Health Monography*, n° 74.