



ETUDE DE LA SENSIBILITE DE PLASMODIUM FALCIPARUM A LA CHLOROQUINE PAR LES EPREUVES IN VIVO,
DANS UNE ZONE DE SAVANE ARBUSTIVE DE HAUTE-VOLTA A PALUDISME HYPERENDEMIQUE - FIABILITE
DE L'EPREUVE IN VIVO DE 28 JOURS EN ZONE DE TRANSMISSION CONTINUE

par

D. Baudon,¹ J. Roux,² F. Benthein,³ P. Carnevale⁴ et J. F. Molez⁵

Table des matières

	<u>Pages</u>
1. Introduction	2
2. Matériel et méthodes	2
2.1 La zone d'étude	2
2.2 Epreuve pratique type de l'OMS (épreuve de sept jours), et variante en dose unique	2
3. Résultats	3
3.1 Epreuves <u>in vivo</u>	3
3.2 Contrôle de la parasitémie au jour 28	3
4. Discussion et conclusion	4
5. Résumé	4
Summary	5
Références bibliographiques citées ou consultées	6
Tableaux	8

¹ Médecin-biologiste des Hôpitaux des Armées, Département Paludologie, Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies (OCCGE), Centre Muraz, Boîte postale 153, Bobo-Dioulasso, Haute-Volta.

² Professeur Agrégé, Médecin-biologiste des Hôpitaux des Armées, Directeur du Centre Muraz, Boîte postale 153, Bobo-Dioulasso, Haute-Volta.

³ Technicien de laboratoire, Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique, Brazzaville, Congo.

⁴ Docteur ès sciences, Entomologiste médical de l'Office de la Recherche scientifique et technique Outre-mer (ORSTOM). O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

⁵ Docteur en médecine, Entomologiste médical de l'ORSTOM.

N° : 20743
Cote : B 49 M

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

20743
B

1. INTRODUCTION

Parmi les mesures de contrôle antipaludique, la chimiothérapie occupe une place de plus en plus importante dans la lutte contre la mortalité et la morbidité causées par le paludisme. La constatation, ces dernières années, de quelques cas de résistance de souches de Plasmodium falciparum à la chloroquine, représente une grave menace pour tout le continent africain; cependant, aucun cas de résistance aux amino-4 quinoléines n'a été confirmé en Afrique de l'Ouest ou Centrale.

Malgré tout, avec le développement dans ces régions de la chloroquinisation, qu'elle soit "spontanée" ou organisée par les Etats, il est capital d'assurer une surveillance régulière de la sensibilité des souches de P. falciparum aux antipaludiques et aux amino-4 quinoléines en particulier.

Les épreuves in vitro (Rieckmann et al., 1968, 1978; Rieckmann, 1971) nécessitent des techniciens qualifiés et un équipement particulier de laboratoire; les épreuves in vivo, telles qu'elles sont préconisées par l'OMS (1967, 1973), sont d'application plus simple pour permettre un dépistage de la résistance ou de diminution de la sensibilité. Cependant, les limites des épreuves in vivo sont connues, et, en particulier, en zone d'endémie paludéenne, la sensibilité in vivo est influencée par l'état immunitaire de l'hôte.

Une étude sur la sensibilité des souches de P. falciparum à la chloroquine, par les épreuves in vivo, a été effectuée dans une zone de savane arbustive d'Afrique de l'Ouest, à Bobo-Dioulasso et dans les environs immédiats, en Haute-Volta.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 La zone d'étude

L'étude a été menée dans deux écoles, l'une en milieu urbain à Bobo-Dioulasso, ville de 150 000 habitants, l'autre en zone rurale, à Nasso, village situé à 20 km de la ville; elle s'est étendue sur un mois de la mi-mai, fin de la saison sèche, à la mi-juin, début de la saison des pluies.

A Bobo-Dioulasso, en milieu urbain, le paludisme est de type mésoendémique, tandis qu'en milieu rural il est hyperendémique. Dans les deux cas, il y a une recrudescence saisonnière en juin-juillet-août pendant la saison des pluies.

Dans cette zone de l'étude, une chimioprophylaxie par la chloroquine est pratiquée officiellement, au niveau des dispensaires, chez les enfants de 0 à 5 ans et chez les femmes enceintes à partir du cinquième mois de grossesse; en fait, on estime que seulement 10 % de la population cible est réellement touchée par cette médication; par contre, dans le milieu scolaire et en particulier dans les écoles étudiées, aucune chimioprophylaxie à la chloroquine n'est pratiquée.

La population scolaire examinée est une population semi-immune, âgée de 7 à 14 ans. Dans l'école de Bobo-Dioulasso, l'enquête paludométrique initiale, avec confection de lames de sang (frottis et goutte épaisse), a montré que 13,6 % des 159 élèves de la tranche d'âge 7-9 ans étaient porteurs de Plasmodium, l'espèce P. falciparum ayant la prévalence relative la plus élevée avec 94,7 %, suivie de P. malariae avec 5,3 %. En milieu rural, à l'école de Nasso, sur les 204 lames de sang examinées, provenant d'élèves de la tranche d'âge 7-14 ans, 90 présentaient une infection à Plasmodium, soit une prévalence parasitaire de 44,1 %, les prévalences relatives de P. falciparum et de P. malariae étant de 94,6 % et 5,6 % respectivement.

2.2 Epreuve pratique type de l'OMS (épreuve de sept jours), et variante en dose unique

Seuls les élèves porteurs asymptomatiques de formes asexuées de P. falciparum, et qui n'avaient pas pris d'antipaludique dans les 15 jours précédents, ont été retenus. La recherche de la chloroquine dans les urines par la méthode de Dill et Glazko (Lelijveld & Kortmann, 1969) a été systématiquement effectuée avant l'épreuve et dans les deux jours suivant la première

prise de chloroquine. Aucun des sujets sélectionnés pour les épreuves in vivo n'était positif à l'examen d'urine par la méthode de Dill et Glazko.

Au total, 103 élèves ont été retenus pour la réalisation des épreuves in vivo.

L'épreuve pratique type de l'OMS de sept jours a été effectuée chez 67 élèves, la chloroquine-base étant administrée selon le protocole classique suivant :

Jour 0 : 10 mg/kg de poids corporel en dose unique	} Total : 25 mg/kg de chloroquine en trois jours
Jour 1 : 10 mg/kg de poids corporel en dose unique	
Jour 2 : 5 mg/kg de poids corporel en dose unique	

Une variante de l'épreuve a été réalisée chez 36 élèves de Nasso selon le protocole suivant :

Jour 0 : Dose unique de 10 mg/kg de poids corporel de chloroquine-base.

La prise médicamenteuse s'est toujours faite en présence du médecin, et on vérifiait que la chloroquine était effectivement avalée, et qu'il n'y avait pas de vomissement secondaire. Tous les élèves étaient positifs à l'examen d'urine de Dill et Glazko aux jours 1 et 2 (une classe de Nasso n'a pas pu être contrôlée au jour 1). Tous les élèves ont été suivis quotidiennement, avec confection de frottis et gouttes épaisses, jusqu'à disparition de la parasitémie décelable, et un contrôle systématique a été effectué au jour 7. Une numération approximative des formes asexuées du Plasmodium par microlitre de sang a été réalisée sur les gouttes épaisses et calculée en fonction du nombre de parasites par globules blancs; on a estimé en moyenne à 7500 par microlitre de sang le nombre de globules blancs des élèves pour le calcul de la densité parasitaire.

3. RESULTATS

3.1 Epreuves in vivo

Les résultats de l'épreuve pratique type de l'OMS de sept jours et de la variante en dose unique sont présentés dans le tableau 1; seuls 99 élèves ont pu être suivis pour toute la durée des épreuves. Les résultats peuvent être ainsi résumés :

- quel que soit le protocole, tous les élèves ont vu leur parasitémie disparaître au jour 3 ou 4 (soit le 4^e ou 5^e jour après la première prise de chloroquine) et, au jour 7, aucun élève n'a présenté une parasitémie décelable;
- 13,9 % des élèves ayant subi la variante de l'épreuve en dose unique étaient encore positifs au jour 3, contre 5,6 % seulement chez les élèves ayant subi l'épreuve type;
- les densités parasitaires moyennes étaient de 8500 parasites, forme asexuée, par microlitre de sang au jour 0, de 850 au jour 1 et inférieures à 100 aux jours 2 et 3; au jour 0 on notait une numération maxima de 80 000.

3.2 Contrôle de la parasitémie au jour 28

Un contrôle de la parasitémie chez les élèves a été effectué au jour 28 et les résultats entre les groupes ayant subi les épreuves in vivo et les groupes témoins qui étaient négatifs au jour 0 et n'avaient donc pas reçu de chloroquine ont été comparés. Ces résultats sont présentés dans le tableau 2.

A l'école de Bobo-Dioulasso, 11,1 % des élèves soumis à l'épreuve type in vivo, et donc porteurs de formes asexuées de Plasmodium au jour 0, puis devenus négatifs au jour 4, sont de nouveau porteurs asymptomatiques de formes asexuées au jour 28; mais par ailleurs 7,1 % des élèves qui étaient négatifs au jour 0, et qui n'ont donc pas reçu de chloroquine, se trouvent être aussi porteurs de Plasmodium au jour 28; il n'y a donc pas de différence significative entre ces deux groupes au jour 28 au niveau de la prévalence parasitaire. On arrive aux mêmes conclusions à Nasso; quel que soit le type d'épreuve in vivo effectué, il n'y a pas de différence significative au jour 28, au niveau de la prévalence parasitaire, entre les groupes ayant subi les épreuves et les groupes témoins, non porteurs de parasite au jour 0.

En milieu rural, à Nasso, la prévalence parasitologique du paludisme, toutes classes confondues, est passée de 44,1 % au début de l'épreuve à 58,1 % au jour 28; cette augmentation significative est probablement due au début de la poussée saisonnière du paludisme, liée à l'apparition des premières pluies; il n'y avait pas encore eu de retentissement en milieu urbain.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats des 99 épreuves in vivo permettent de conclure à l'absence de résistance à la chloroquine de degré RII et RIII des souches de P. falciparum dans les zones étudiées. (Une résistance de degré RII ou RIII se reconnaît par le fait qu'il n'y a pas de disparition de la parasitémie décelable entre le jour 0 et le jour 7.)

Une résistance de degré RI ne peut être exclue sur une épreuve de sept jours. (Une résistance de degré RI se reconnaît par une disparition de la parasitémie avant le jour 7; une réponse sensible se reconnaît quand il n'y a pas de réapparition de la parasitémie.) Pour pouvoir se prononcer, il faudrait donc réaliser l'épreuve de 28 jours; mais notre étude, dans laquelle le nombre de porteurs de Plasmodium au jour 28 dans les groupes ayant subi les épreuves in vivo est comparé avec celui dans les groupes négatifs au jour 0, confirme clairement l'impossibilité d'interpréter une épreuve de 28 jours en zone de transmission continue, à cause des éventuelles réinfections. Ainsi parmi les élèves ayant subi les épreuves in vivo, 11,1 % du groupe d'élèves de zone urbaine et 41,4 % et 69,4 % respectivement des deux groupes d'élèves de zone rurale ont très probablement été réinfectés par le Plasmodium et sont redevenus positifs au jour 28.

Des études avaient déjà été réalisées en Haute-Volta et dans la région de Bobo-Dioulasso montrant l'absence de résistance des souches de P. falciparum à la chloroquine : Schneider et al. (1962) à Kari, Jeffery & Gibson (1966) et Ricosse et al. (1968) à Boni et Picq et al. (1976) à Koumbia. Une autre étude menée par Richard-Lenoble et al. (1973) sur le traitement de 86 accès de paludisme à P. falciparum par la chloroquine, à raison de 25 mg/kg de poids corporel en trois jours, a également confirmé l'absence de résistance à ce produit.

Les épreuves in vivo permettent d'étudier la sensibilité clinique des souches plasmodiales, mais on en connaît les limites : en particulier, la sensibilité in vivo est influencée par l'état immunitaire de l'hôte. La réalisation d'une épreuve in vitro est donc nécessaire pour affirmer l'existence d'une résistance, et, seules les techniques in vitro, dans les zones où la résistance à la chloroquine n'est pas encore apparue, permettront d'étudier la réponse à ce médicament avant que n'apparaissent des résistances cliniques manifestes du type RII/RIII.

RESUME

Il n'a pas encore été démontré clairement de résistance de Plasmodium falciparum à la chloroquine en Afrique de l'Ouest ou Centrale; il faut être très prudent dans l'interprétation des épreuves in vivo, surtout au degré de résistance RI. Il est certain que, là où la résistance à la chloroquine n'est pas établie, une surveillance rigoureuse doit être exercée avec notification des échecs thérapeutiques des cas cliniques. Les épreuves in vitro permettent seules d'affirmer l'apparition de la résistance et, en particulier en zone d'endémie, de contrôler la sensibilité à la chloroquine avant que n'apparaisse une résistance clinique de type RII ou RIII. En attendant de pouvoir mettre en place l'utilisation sur une grande échelle d'épreuves in vitro, les épreuves in vivo de réalisation simple pourraient déjà être développées comme moyens de première ligne pour le dépistage de la résistance, tout en reconnaissant les limites de ces épreuves qui ont donc surtout une valeur d'alarme.

SUMMARY

STUDY ON THE SENSITIVITY OF PLASMODIUM FALCIPARUM TO CHLOROQUINE IN IN VIVO TESTS,
IN A SHRUB SAVANNA ZONE OF UPPER VOLTA HYPERENDEMIC FOR MALARIA - RELIABILITY OF
THE IN VIVO 28-DAY TEST IN AN AREA OF CONTINUOUS TRANSMISSION

A study on the in vivo sensitivity of Plasmodium falciparum strains to chloroquine was carried out in a shrub savanna zone of Upper Volta, West Africa. This study was conducted on schoolchildren aged 7 to 14 years from an urban area of the town of Bobo-Dioulasso and from a rural area at 20 km from the town. The two in vivo tests used were: (a) the WHO standard 7-day field test consisting of the administration of 25 mg/kg body weight of chloroquine base over 3 days, and (b) the single-dose alternative test consisting of the administration of 10 mg/kg chloroquine base. In addition to the 7-day observation period, a blood examination for parasitaemia was made on all the schoolchildren on day 28. From the results of the 99 in vivo tests it was concluded that, in the areas studied, there were no chloroquine-resistant P. falciparum strains at the RII or RIII level. The presence of an RI level of resistance cannot be excluded on the basis of the in vivo 7-day test. To be able to ascertain this, the 28-day test would have to be carried out. However, from the comparison made between the numbers of P. falciparum carriers on day 28 among the schoolchildren having undergone the in vivo tests and among the controls negative for P. falciparum on day 0, it appeared that a 28-day test in an area of continuous transmission could not be clearly interpreted because of the possibility of reinfection. Caution must therefore be exercised in interpreting in vivo test results, especially at the RI level of resistance. In areas where chloroquine resistance has not yet become established, strict surveillance should be carried out, together with notification of treatment failures in clinical cases. Only in vitro tests provide a means to demonstrate the appearance of resistance and to monitor sensitivity to chloroquine before the appearance of clinical resistance of the RII or RIII type. This is particularly true in endemic areas where the in vivo sensitivity is influenced by the immune status of the host. Until the use of in vitro tests can be introduced on a large scale, the in vivo tests which are simple to perform could already be developed as a first-line measure for the detection of resistance, while recognizing the limitations of such tests which are especially useful as a warning system.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CITEES OU CONSULTEES

- Aladdin Abdul Aziz Ahmed (1982) Study on the effect of chloroquine on Plasmodium falciparum infection in the People's Democratic Republic of Yemen (Document OMS non publié WHO/MAL/82.987)
- Armstrong, J. C., Asfaha, W. & Palmer, T. T. (1976) Chloroquine sensitivity of Plasmodium falciparum in Ethiopia. I. Results for in vivo test. American journal of tropical medicine and hygiene, 25 : 2-9
- Charmot, G. & Rhodhain, F. (1982) La chimiorésistance chez Plasmodium falciparum, analyse des facteurs d'apparition et d'extension. Médecine tropicale, 42 : 441-449
- Kouznetsov, R. L., Rooney, W., Wernsdorfer, W., El Gaddal, A. A., Payne, D. & Abdalla, R. E. (1979) Assessment of the sensitivity of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs at Sennar, Sudan : use of the in vitro microtechnique and the in vivo method (Document OMS non publié WHO/MAL/79.910)
- Kouznetsov, R. L., Kilama, W., Payne, D., Ulrich, A. M., Campbell, C. C., Storey, J., Kihamia, C. & Ramji, B. (1980) Use of various in vivo and in vitro methods for the assessment of Plasmodium falciparum response to chloroquine in highly endemic malarious areas of Bagamoyo, Tanzania (Document OMS non publié WHO/MAL/80.928)
- Lasch, E. E. & Nguyen, T. L. (1965) Observations on an apparent chloroquine resistant strain of Plasmodium falciparum in West Africa. British medical journal, Nov. 20 : 1219
- Lelijveld, J. & Kortmann, H. (1969) The eosine colour test of Dill and Glazko : a simple field test to detect chloroquine in urine (Document OMS non publié WHO/MAL/69.692)
- Myint-Lwin, Min-Zaw & Rooney, W. (1982) Comparative study of the micro in vitro and the in vivo tests of the response of Plasmodium falciparum to chloroquine in Burma (Document OMS non publié WHO/MAL/82.982)
- Nozais, J. P. & Gentilini, M. (1981) Résistance du Plasmodium falciparum aux amino-4 quinoléines. Conséquences épidémiologiques. Médecine et maladies infectieuses, 11 : 280-284
- Organisation mondiale de la Santé (1967) Chimiothérapie du paludisme. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. Organisation mondiale de la Santé, Série de Rapports techniques N° 375
- Organisation mondiale de la Santé (1973) Chimiothérapie du paludisme et résistance aux anti-paludiques. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. Organisation mondiale de la Santé, Série de Rapports techniques N° 529
- Picq, J. J., Roux, J., Marcadet, Y., Etienne, J. & Lafaye, A. (1976) Variations des indices paludométriques et des anticorps antipalustres décelés par immunofluorescence en zone d'holoendémie à Plasmodium falciparum chez des sujets soumis à une chimioprophylaxie par la chloroquine et chez des sujets non soumis à la chimioprophylaxie (Document OMS non publié WHO/MAL/76.866)
- Richard-Lenoble, D., Ricossé, J. H. & Picq, J. J. (1973) Etude sur le traitement du paludisme à Plasmodium falciparum dans la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta (Document OMS non publié WHO/MAL/73.814)
- Ricossé, J. H., Lamontellerie, M., Coz, J. & Albert, J. P. (1968) Chimiothérapie du paludisme par la pyriméthamine, l'association pyriméthamine sulfone et la chloroquine. Etude comparée réalisée en Haute-Volta, région de Bobo-Dioulasso. In : Abstracts. Eighth International Congresses on Tropical Medicine and Malaria, Teheran, 1968, p. 1483

- Rieckmann, K. H., McNamara, J. V., Frischer, M., Stockert, T. A., Carson, P. E. & Powell, R. D. (1968) Effects of chloroquine, quinine and cycloguanil upon the maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of Plasmodium falciparum in vitro. American journal of tropical medicine and hygiene, 17 : 661
- Rieckmann, K. H. (1971) Determination of the drug sensitivity of Plasmodium falciparum. Journal of the American Medical Association, 217 : 573
- Rieckmann, K. H., Campbell, G. H., Sax, L. & Mrema, J. E. (1978) Drug sensitivity of Plasmodium falciparum. An in vitro microtechnique. Lancet, 1 : 22
- Schneider, J., Escudie, A., Ouedraogo, A. & Sales, P. (1962) Chimio prophylaxie du paludisme par distribution hebdomadaire de chloroquine ou d'une association chloroquine-primaquine-pyriméthamine. Bulletin de la Société de Pathologie exotique, 55 : 280

TABLEAU 1. RESULTATS DE L'EPREUVE PRATIQUE TYPE DE L'OMS DE SEPT JOURS
ET DE LA VARIANTE EN DOSE UNIQUE, EFFECTUEES POUR L'ETUDE IN VIVO DE LA SENSIBILITE
DES SOUCHES DE PLASMODIUM FALCIPARUM A LA CHLOROQUINE EN ZONE DE SAVANE ARBUSTIVE, BOBO-DIOULASSO, HAUTE-VOLTA

Groupes d'élèves	Dose de chloroquine	Nombre (%) de cas positifs					
		Jour 0	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 7
A Zone rurale (7-14 ans)	25 mg/kg de poids corporel en trois jours Jour 0 : 10 mg/kg	45	31 (68,9)	8 (17,8)	0	0	0
		DPM* : 620	190	270			
B Zone urbaine (7-9 ans)	Jour 1 : 10 mg/kg Jour 2 : 5 mg/kg	18	12 (66,7)	2 (11,1)	1 (5,6)	0	0
		DPM* : 1880	820	150	110		
C Zone rurale (7-9 ans)	Jour 0 : 10 mg/kg de poids corporel (dose unique)	36	Non recherché	8 (22,2)	5 (13,9)	0	0
		DPM* : 1980		165	130		

* DPM = Densité parasitaire moyenne exprimée en nombre de Plasmodium par microlitre de sang.

TABLEAU 2. COMPARAISON AU JOUR 28 DES CAS POSITIFS (PLASMODIUM FALCIPARUM)
 ENTRE LES GROUPES D'ELEVES POSITIFS AU JOUR 0 ET SOUMIS AUX EPREUVES IN VIVO (A, B, C),
 ET LES GROUPES D'ELEVES TEMOINS, NEGATIFS AU JOUR 0 (A', B', C')

Zone	Groupes d'élèves	Nombre d'élèves	Nombre (%) de cas positifs		
			Jour 0	Jour 4	Jour 28
Rurale	A 25 mg/kg en 3 jours	45	45 * (100 %) DPM : 620	0	17/41 * (41,4 %) DPM : 1750
	A' Témoins négatifs	60	0	Non recherché	31/60 * (51,6 %) DPM : 3120
Urbaine	B 25 mg/kg en 3 jours	18	18 * (100 %) DPM : 1880	0	2/18 * (11,1 %) DPM : 700
	B' Témoins négatifs	140	0	Non recherché	10/140 * (7,1 %) DPM : 1970
Rurale	C 10 mg/kg en 1 jour	36	36 * (100 %) DPM : 980	0	25/36 * (69,4 %) DPM : 1950
	C' Témoins négatifs	54	0	Non recherché	38/54 * (70,5 %) DPM : 1200

* DPM = Densité parasitaire moyenne exprimée en nombre de Plasmodium par microlitre de sang.