Université d'Abomey-Calavi

Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines

Ecole Doctorale Pluridisciplinaire « Espaces, Cultures et Développement »

Faculté des Sciences et Techniques

Chaire UNESCO en Sciences, Technologie et Environnement

Thèse de Doctorat pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi

Option : *Environnement et Santé*
***Spécialité** : Parasitologie*

N° d'enregistrement: _____-2015/UAC/FLASH/EDP/GEN.

EVALUATION DES PRINCIPALES STRATEGIES DE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE, DE PRISE EN CHARGE ET DE PREVENTION DU PALUDISME AU BENIN

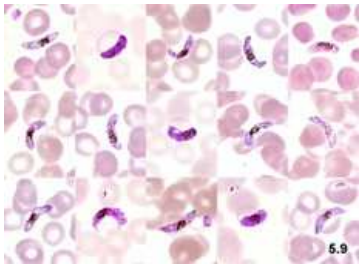
Présenté par:

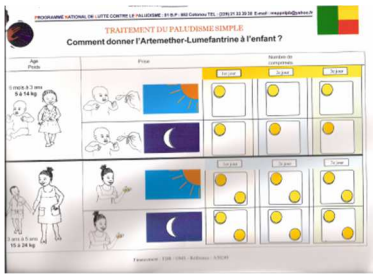
Yves Eric Donan DENON

Sous la direction de

Prof. Dorothée A. KINDE GAZARD







Soutenu publiquement le, ……, devant le Jury composé de:

Président : Michel BOKO, Professeur titulaire, Université d'Abomey-Calavi
Rapporteur: Dorothée A. KINDE GAZARD, Professeur titulaire, Université d'Abomey-Calavi
Examinateur: Achille MASSOUGBODJI, Professeur titulaire, Université d'Abomey-Calavi
Examinateur: Jean-Philippe CHIPPAUX, Directeur de recherche, IRD France
Examinateur: Hervé MENAN, Professeur titulaire, Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY

Date de soutenance: **Mention:**

ABSTRACT

The main strategies contained in the national strategic plan 2011-2015 goals are to contribute to the achievement of the objectives N °4, 5, 6 and 7of the Millenium Development Goals (MDG) in the Republic of Benin. This study allowed to evaluate the effectiveness of the main strategies of case management and prevention of malaria in Benin and analyse their contribution to the achievement of the MDGs.

The evaluation of the therapeutic efficacy of artemether lumefantrine took place in Cotonou, according to the World Health Organisation Protocol.

The evaluation of the implementation of the free case management was made in 34 health zones of Benin by a probability sampling with systematic sampling technique.

The evaluation of the distribution of MIILDs campaign took place throughout the national territory.

It is a quantitative cross-sectional study which covered the twelve (12) departments. The sampling method that has been used is to survey two degrees of type World Health Organisation cluster.

Quantification of the MIILDs packaging waste was made by a non-probabilistic, technical convenience sampling.

The evaluation of the therapeutic efficacy of artemether lumefantrine on *Plasmodium falciparum* in malaria uncomplicated Cotonou indicates a clinical and parasitological response adequate 96.5% and a rate of treatment failure of 3.5%.

The free management cases of malaria among pregnant women and children under 5 years was deficient in 35% of the centres of public and allied in 2012, a year after the launch of the initiative. In 2013; 94% of health units public and assimilated ensure taking free management cases.

The evaluation of diagnostic methods shows that out of 100 cases of fevers, 25 are confirmed positive for malaria. This proportion is similar regardless of the tool used for the biological diagnosis: TDR, Thick smears/Thin smears and Cyscope. The two techniques of rapid diagnosis (TDR and Cyscope ®) have a good sensitivity and specificity.

Evaluation of molecular markers of resistance of Plasmodium falciparum shows that the prevalence of the T76 mutation in gene pfcrt within the study population is 85.2% and 35.7% for the Y86 mutation within the gene pfmdr1. The pfcrt gene is involved more specifically in resistance to chloroquine Plasmodium falciparum than the pfmdr1.

For the pfdhps gene, rate of Plasmodium falciparum is 7.6%. (ii) the prevalence of mutations at codons 436, 437 level is still low at the level of the study site. Sulfadoxine therefore retains relative efficiency on strains of Plasmodium falciparum in the Department of Littoral. He not was highlighted in the study, relationship directly between the clinical status and the presence of mutation at the level of the codons 436 and 437.

The national campaign for distribution of long lasting insecticidal bednets to households:

- Count 1 807 854 household on 1 546 632 attended, 115.15%.
- cover 1 639 090 household on 1 807 854 ménages attended, 90.6%

4 674 800 bednet soit 95.7% were distributed

The distribution of MIILDs generated 89.15 tons of waste that has been collected in 34 health zones and then destroyed in accordance with environmental standards.

The main strategies of biologic diagnostic, case management and prevention of malaria applied in Benin are conform to the recommendations of the World Health Organization and contribute to the well-being of the population. They allow increasing the protection of populations against malaria and the effective support of malaria cases. They contribute to the achievement of MDG 4, 5, 6 and 7.

DEDICACES

A

- ma mère **Elizabeth AGASSI**
  Mère, tes nombreux sacrifices ont porté leur fruit. Sans toi je n'aurais jamais atteint ce niveau. Reçois ici ma reconnaissance et que Dieu te bénisse et t'accorde la grâce d'en bénéficier comme tu le mérites.

- mon feu père **André Kpossou DENON TOUDONOU**, merci pour ton amour, je sais que tu aurais souhaité être là. Je suis convaincu que tu es avec moi. Paix à ton âme, paix éternelle.

- mon épouse **Sandrine ADOUKONOU DENON**, merci d'avoir pris ce travail comme le tien, merci pour ton soutien, tes prières et tes conseils tout au long de ma formation. Merci de m'avoir fait vivre le meilleur avec nos enfants.

- monsieur **Richard BOKO VOU**, tonton merci pour tout. Je bénis l'éternel qui a fait croiser nos chemins. Merci pour ton amour paternel.

- mes enfants : **Tiphanie, Fleur-Tracy, Divine et Christobal**, le travail libère l'homme : que ceci soit pour vous un exemple à suivre.

- mes frères, parents et amis, profonde gratitude

REMERCIEMENTS

A notre Directeur de Thèse

Professeur titulaire **Dorothée Akoko KINDE GAZARD**

Chère maître, j'ai eu l'opportunité d'avoir travaillé avec vous. Et vous m'avez tout donné: au plan professionnel, universitaire et associatif. C'est une fierté pour moi de d'être votre produit fini. Je tiens à vous le reconnaitre publiquement. En tant qu'enseignante, chercheur, et Ministres successifs de la Santé Publique et Ministre de la Santé, vous n'avez ménagé aucun effort pour apporter votre savoir-faire et votre expérience à la réalisation de ce travail. Que Dieu vous le rende au centuple.

Au Président du Jury, Professeur titulaire Michel BOKO

Cher maître, vous avez accepté de sacrifier de votre précieux temps pour lire minutieusement ce document, vous y avez apporté des corrections pour améliorer sa qualité. Vous avez enfin accepté de présider cette soutenance de thèse et nous aider à parfaire notre apprentissage, recevez ici toute notre gratitude.

Au professeur titulaire Achille MASSOUGBODJI

Professeur, cher maître, c'est un immense honneur pour moi d'avoir eu l'opportunité d'apprendre avec vous. Recevez ma gratitude et ma reconnaissance pour la qualité de l'encadrement dont j'ai bénéficié de votre part. Merci pour tout.

Aux membres du Jury, Professeurs Hervé MENAN et Jean Philippe CHIPPAUX

Chers maîtres, vous avez accepté lire et apporter vos contributions avant et pendant la soutenance, recevez notre reconnaissance pour tous les efforts fournis pour parfaire ce travail. Soyez en remerciés.

Au Directeur de l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire « Espace, Culture et Développement », aux enseignants et au secrétaire Mr GBEHI Charles de Gaulles, sincères remerciements.

A tout le personnel du **Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP)**, spécialement à la Coordonnatrice Nationale, Dr Mariam OKÊ-SOPOH, ce travail est le nôtre. Merci pour tout.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, sincères remerciements.

SOMMAIRE

Pages

Dédicaces……1
Remerciements……2
Sommaire……3
Liste des figures……5
Liste des photographies……6
Liste des graphiques……7
Liste des tableaux……9
Liste des annexes……13
Sigles et acronymes……14
Résumé……17
Abstract……19

Introduction générale……21
1. Contexte et justification……22
2. Enoncé du problème……24
3. Hypothèses de recherche……25
4. Objectifs de la recherche……26
5. Plan de thèse……27
6. Cadre d'étude……28

Chapitre 1 : Généralités sur le paludisme……32

Première partie : la prise en charge du paludisme……60
Chapitre 2 : évaluation de l'efficacité thérapeutique de artemether lumefantrine dans les cas de paludisme simple……61
Chapitre 3 : évaluation de la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes ……86

Deuxième partie: diagnostic Biologique du paludisme…….....104
Chapitre 4 : évaluation de la performance des TDR et du Cyscope en référence à la goutte épaisse…….....105
Chapitre 5 : évaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du Plasmodium falciparum…….....130

Troisième partie : prévention du paludisme….....176
Chapitre 6: évaluation post campagne de distribution des MIILD pour la couverture universelle en 2011…….....177

Conclusion générale 222
Recommandations.....226
Perspectives.....228
Bibliographie 230
Publications.....247
Annexes.....300
Table des matières.....335

LISTE DES FIGURES

Pages

Figure 1 : Nombre de cas confirmés en 2010……..…22
Figure 2 : Cartographie et stratification du risque lié au paludisme en République du Bénin ……..28
Figure 3: Cartographie de l'endémicité du paludisme au Bénin en 2014…..……29
Figure 4: Cycle des plasmodies humaines…….....….38
Figure 5 : Pays et territoires affectés par le paludisme …….....……38
Figure 6: Mécanismes proposés pour la chloroquino-résistance ; Implication des protéines Crt et Pgh1…….....…..55
Figure 7: Voie métabolique des pyrimidines chez *P. falciparum* ……...……..56
Figure 8 : Cassette d'un TDR négatif ….....110
Figure 9 : Cassette d'un TDR positif.....110
Figure 10: Illustration d'un confetti…….....…….137
Figure 11 : Schéma d'une plaque de 96 puits…….....……..139
Figure 12: Répartition des ménages enquêtés suivant le nombre requis en MIILD…….....….193
Figure 13 : Répartition de ménages possédant au moins une MII après la campagne de 2011…….....….....199
Figure 14: Répartition des ménages disposant un nombre requis de MII après la campagne de 2011…….....200
Figure 15: Microscope fluorescente (Cyscope®) branchée à un ordinateur portable et lames pré-fixées.....332
Figure 16 : Etapes de réalisation d'une lame du microscope Cyscope®.....333

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Pages

Photo 1: Incinérateur au centre de santé de Agoué (Bénin)…….....….....59
Photo 2: Photo du Gel d'agarose pour le gène pfcrt visualisé après coloration au bromure d'éthidium…….....154
Photo 3: Photo d'un gel après digestion par Mnl I…….....….....161
Photo 4: Ramassage des emballages vides de MIILD dans les zones sanitaires …….....….....212
Photo 5 : Emballages vides de MIILD à embarquer pour les sites de destruction de Ouidah …..…….....212
Photo 6: Transport des emballages vers le camion qui ne peut accéder au lieu d'entreposage…….....213
Photo 7: Déchargement des emballages sur le site de destruction à Pahou (Ouidah)…….....213
Photo 8: Produits issus du broyage des emballages de type NET Protect….....213
Photo 9: Produits issus du broyage des emballages de type Olyset Net…….214
Photo 10 : Image d'une lame positive au Cyscope®.....333

LISTE DES GRAPHIQUES

Pages

Graphique 1: Age des enfants évalués…….....….77
Graphique 2: Taux de positivité du paludisme…….…….....78
Graphique 3: Répartition des présumés bénéficiaires de soins gratuits……..95
Graphique 4: Répartition des patients selon le sexe…….....……..116
Graphique 5 : Répartition des patients selon l'utilisation de la moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action…….....117
Graphique 6 : Répartition des patients selon la densité parasitaire……...……119
Graphique 7: Distribution des enfants retenus dans l'étude selon l'âge et le statut clinique…….....151
Graphique 8: Distribution des enfants retenus dans l'étude selon le sexe et le statut clinique…….....……152
Graphique 9: Résultats de la PCR RFLP…….....……..154
Graphique 10: Résultats de la PCR pour le gène pfcrt…….....……..155
Graphique 11: Distribution de la mutation T76 dans la population d'étude..……156
Graphique 12: Distribution des allèles de pfcrt selon le statut clinique…….....157
Graphique 13: Résultats de la PCR pour le gène pfmdr1…….....….158
Graphique 14: Distribution de la mutation Y86 dans la population d'étude…..….158
Graphique 15 : Distribution des allèles de pfmdr1 selon le statut clinique……....160
Graphique 16: Distribution des mutations au niveau des codons 436 et 437 dans chaque groupe clinique…….....……162
Graphique 17: Distribution des génotypes des souches plasmodiales au niveau des codons 436 et 437…….....……163
Graphique 18: Possession des MII dans les ménages suivant les départements après la campagne de 2011…….....196
Graphique 19: Proportions de ménages avec au moins une MII et une MII pour deux membres après la campagne 2011 suivant le milieu de résidence……...201

Graphique 20: Ménages informés de la campagne MIILD de 2011 selon le canal d'information…….....…205
Graphique 21: Proportions de ménages informés de la campagne et celles ayant échangés un coupon avec au moins une MIILD…….....…206
Graphique 22: Proportions de ménages informés de la campagne et celles ayant échangés un coupon avec un nombre requis de MIILD…….....207

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques (Hyde, 2005)…….....49
Tableau II : matériels utilisés dans le cadre de l'étude…….....…64
Tableau III : Posologie d'artemether lumefantrine 20/120 mg, (PNLP 2011)…..…..67
Tableau IV: Répartition des enfants ayant la fièvre en fonction du sexe…….....….76
Tableau V: Répartition enfants en fonction des ethnies…….....…77
Tableau VI: Statut des individus en fonction du sexe …….....……..78
Tableau VII: Statut des enfants en fonction de la classe d'âge…….....……..79
Tableau VIII: Baisse de la température (Apyrexie) chez les patients traités par artemether lumefantrine à Cotonou…….....…..79
Tableau IX : Clairance parasitaire au bout de 48h de traitement …….....…..79
Tableau X: Efficacité thérapeutique de artemether lumefantrine dans un cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affectio.....80
Tableau XI: Récapitulatif de la taille de l'échantillon en fonction des cibles….....89
Tableau XII: Centres de santé évalués en 2012 et 2013 par département …….92
Tableau XIII: Récapitulatif des formations sanitaires n'ayant pas pratiqué ou ayant relâché la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes au moment des visites…….....…..93
Tableau XIV: Disponibilité des intrants de prise en charge gratuite en 2012…….…94
Tableau XV: Disponibilité CTA et TDR en 2013…….....….94
Tableau XVI: Cas de paludisme simple et grave pris en charge en 2012 et 2013 chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes…….....….96
Tableau XVII: Pourcentage de centre de santé ayant été remboursé au moins une fois selon le département…….....97
Tableau XVIII: Montants remboursés en 2013…….....……98
Tableau XIX: Difficulté de confirmation des cas de paludisme.....98
Tableau XX: Effet de la prise en charge gratuite sur la fréquentation des centres de santé….....…98
Tableau XXI: Récapitulatif indicatif des résultats (Harper, 1999)…….....…..113

Tableau XXII: Répartition des patients selon l'âge…….....…..116
Tableau XXIII: Répartition des enfants de moins de 5 ans en fonction de la température corporelle …….....118
Tableau XXIV: Répartition de la positivité de la GE en fonction de la température chez les enfants de moins de 5 ans…….....118
Tableau XXV: Répartition des tests réalisés en fonction des résultats……...…119
Tableau XXVI: Comparaison entre les résultats de la GE et des TDR……..120
Tableau XXVII : Comparaison entre les résultats de la GE et du Cyscope®……...121
Tableau XXVIII : Comparaison entre les résultats des TDR et du Cyscope®...…122
Tableau XXIX: Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR des gènes pfcrt K76T et pfmdr1N86Y…….....…..139
Tableau XXX: Programme d'amplification utilisé et séquences des primers pour l'analyse du gène pfcrt K76T…….....…….140
Tableau XXXI: Programme d'amplification utilisé et séquences des primers pour l'analyse du gène pfmdr1N86Y…….....…….140
Tableau XXXII: Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec AP0l….....141
Tableau XXXIII : Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec AflIII….....142
Tableau XXXIV: Composition des mélanges réactionnels d'amplification par échantillon pour les PCR I et II …….....145
Tableau XXXV: Tableau récapitulatif des amorces et des programmes d'amplification….....146
Tableau XXXVI: Composition des mélanges réactionnels de digestion enzymatique par échantillon …….....…..147
Tableau XXXVII: Bandes attendues…….....……..148
Tableau XXXVIII: Répartition de la densité parasitaire en fonction du statut clinique.....153
Tableau X XXIX: Prévalence de la mutation T76 selon le statut clinique …….156
Tableau XL: Prévalence de la mutation Y86 selon le statut clinique…….....159
Tableau XLI: Répartition des mutations T76 et Y86 selon le statut clinique……...160

Tableau XLII: Répartition des échantillons en fonction du taux de positivité du gène Pfdhps au niveau des codons 436, 437 et 540…….....…161
Tableau XLIII: Répartition des échantillons en fonction des mutations au niveau des codons 436, 437 et 540…….....162
Tableau XLIV: Répartition des chefs ménages enquêtés suivant le sexe et le milieu de résidence…….....186
Tableau XLV: Répartition des chefs ménages enquêtés suivant l'âge et le département…….....……187
Tableau XLVI: Taille moyenne des ménages, suivant le département….....…187
Tableau XLVII: Caractéristiques des enfants de moins de 5 ans par département et milieu de résidence…….....…188
Tableau XLVIII: Caractéristiques des femmes enceintes au sein des ménages enquêtés…….....…….189
Tableau XLIX: Répartition des ménages qui ont reçu un coupon…….....…190
Tableau L: Répartition des ménages couverts en MIILD par département et par milieu de
résidence…….....……191
Tableau LI: Répartition des ménages ayant reçu un nombre requis de MIILD par département et suivant milieu de résidence au cours de la campagne de 2011.....…192
Tableau LII: Possession des MIILD par les ménages selon les départements et le Milieu de résidence de résidence…….....195
Tableau LIII : Possession des MII parmi les ménages avec femmes enceintes et enfants de moins de 5 ans après la campagne. …….....….197
Tableau LIV: Indicateurs de couverture universelle par milieu de résidence et par département…….....…….198
Tableau LV: Utilisation de MII dans les ménages par département et suivant les milieux de résidence, après la campagne…….....…202
Tableau LVI: Utilisation de MII par les groupes vulnérables par département et suivant les milieux de résidence…….....203
Tableau LVII: Répartition des ménages informés de la campagne MIILD de 2011 selon le canal et par département…….....……204

Tableau LVIII: Résultats de la mise en œuvre de la campagne MIILD par les aires de santé …….....…….208
Tableau LIX: les raisons de non possession de MIILD par certains ménages selon les agents de santé de CS…….....……..209
Tableau LX: Principales sources d'informations sur la campagne MIILD selon les agents de santé…….....……..209
Tableau LXI: Mode de gestion des restes de MIILD de la campagne de 2011 dans les aires de santé…….....210
Tableau LXII: masse des emballages de MIILD utilisés lors de la campagne de distribution de 2011…….....211
Tableau LXIII: Masse de déchets des emballages de MIILD utilisés lors des campagnes de distribution de 2007 et 2011…….....….212

LISTE DES ANNEXES

Pages

Annexe 1 : Tableau posologique de Artemether Lumefantrine.....301
Annexe 2 **:** Classification des résultats du traitement[1].....302
Annexe 3 : Formulaire de dépistage……..…...303
Annexe 4 : Calendrier des activités de suivi.....305
Annexe 5 : Dossier individuel du participant.....306
Annexe 6 : Formulaire de déclaration des manifestations indésirables graves.....308
Annexe 7 : Lignes directrices pour l'analyse des résultats.....310
Annexe 8 : Formulaire de consentement 311
Annexe 9: Fiche de consentement éclairé.....317
Annexe 10: L'alphabet des acides aminés; codes à une et trois lettres.....318
Annexe 11: Comparaison de possession de MII parmi les ménages avec ou sans enfants de moins de 5 ans après la campagne gratuite de juillet 2011.....319
Annexe 12: Proportion des personnes informées de la campagne MIILD 2011 selon le canal, par département et par Milieu de résidence.....320
Annexe 13 : Caractéristiques des femmes enceintes au sein des ménages enquêtés par département et par milieu de résidence ; campagne 2011.....321
Annexe 14: Répartition des ménages couverts en MIILD par département et par milieu de résidence 322
Annexe 15: Indicateurs de couverture universelle par milieu de résidence et par département après la campagne de juillet 2011.....323
Annexe 16 : Utilisation de MII par les groupes vulnérables par département, suivant les milieux de résidence, après la campagne de juillet 2011.....324
Annexe 17 : Outils de collecte.....325
Annexe 18: Fiche d'enquête.....330
Annexe 19 : Microscope à immunofluorescence Cyscope 332
Annexe 20 : Etapes de réalisation d'une lame du microscope Cyscope®.....333
Annexe 21 : Matériels pour l'étude des marqueurs moléculaires de la résistance du Plasmodium à la chloroquine et à la sulfadoxine pyrimethamine.....334

SIGLE ET ACRONYMES

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
AOF/ MS	Attributions, Organisation et Fonctionnement du Ministère de la Santé
CAME	Centrale d'Achat des Médicaments Essentiels et consommables médicaux
CDC	Center for Desease Control
CDT	Centre de Détection de la Tuberculose
CEDEAO	Communauté Economique des Etats de l'Afrique de l'Ouest
CERPAGE	Centre d'Etude et de Recherche pour le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance
CHD	Centre Hospitalier Départemental
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIPEC	Centre d'Information, de Prospective, d'Ecoute et de Conseil
CLHP	Chromatographie liquide de haute performance
CLIP	Centre de Lutte Intégré contre le Paludisme
CNGO	Centre National de Gérontologie de Ouidah
CNHPP	Centre National Hospitalier de Pneumo Phtisiologie
CNHU- HKM	Centre National Hospitalier Universitaire Hubert Koutoucou Maga
CNPC	Centre National de Psychiatrie de Cotonou
CPS	Chimio Prévention Saisonnière du paludisme
CRP	Protéine –C- Réactive
CRT	Chloroquine Resistant Transporter
CS	Centre de Santé
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artemisinine
DBM	Déchets Bio Médicaux
DDT	Diphényl Trichloro Ethane

DHFR	Dihydrofolate reductase
DHPS	Dihydropteroate synthase
DMAP	Dispositif pour des Médicaments Abordables pour le Paludisme
DPMED	Direction des Pharmacies, du Médicament et des Explorations Diagnostiques
ECT	Echec Clinique Tardif
EDP	Ecole Doctorale Pluridisciplinaire
EPT	Echec Parasitologique Tardif
ETP	Echec Thérapeutique Précoce
FAST	Faculté des Sciences et Techniques
FLASH	Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines
GB	Globule Blanc
Hb	Hémoglobine
HOMEL	Hôpital de la Mère et de l'Enfant
HRP2	Histidine Riche en Protéine 2
IgG	Immunoglobulines G
IgM	Immunoglobulines M
INSAE	Institut National de la Statistique et de l'Analyse Appliquée à l'Economie
ISBA	Institut des Sciences Biomédicales Avancées
MGG	May Grunwald Giemsa
MII	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
MIILD	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'action
NFS	Numération Formule Sanguine
OMD	Objectifs du Millénaire pour le Développement
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisation Non Gouvernementale
PIB	Produit Intérieur Brut

PCR	Réaction de Polymérisation en Chaine
pfmdr1	*plasmodium falciparum* multidrug résistant
Pgh1	P-glycoprotein homolog1
PIB	Produit Intérieur Brut
PID	Pulvérisation Intra Domiciliaire
PLDH	Lactate Déshydrogénase du Parasite
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	Quantitative Buffy Coat
RGPH	Recensement Général de la population et de l'Habitat
TDR	Tests de Diagnostic Rapide
TIE	Taux annuel d'Inoculation Entomologique
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIn	Traitement Préventif Intermittent chez le nourrisson
UA	Union Africaine
UAC	Université d'Abomey Calavi
UE	Union Européenne
UV	Ultra Violet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPP	Valeur prédictive positive
VPN	Valeur prédictive négative
VS	Vitesse de sédimentation
SIDA	Syndrome de l'Immuno Déficience Acquis

RESUME

Les principales stratégies contenues dans le plan stratégique national 2011-2015 ont pour objectifs de contribuer à l'atteinte de l'objectif N°4, 5, 6 et 7 des OMD. La présente étude a permis d'évaluer l'efficacité des stratégies de diagnostic biologique, de prise en charge et de prévention du paludisme au Bénin afin d'analyser leur contribution à l'atteinte des OMD.

L'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'artemether lumefantrine a été réalisée selon le protocole de l'OMS. L'évaluation des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques et des méthodes de diagnostic ont eu également lieu à Cotonou tandis que celle de la mise en œuvre de la prise en charge gratuite a été faite dans les 34 zones sanitaires du Bénin par un échantillonnage probabiliste avec la technique d'échantillonnage systématique.

L'évaluation de la campagne de distribution des MIILD est une étude transversale quantitative. La méthode d'échantillonnage utilisée est celle de sondage par grappes à deux degrés de type OMS. La détermination de la quantité des déchets des emballages des MIILD a été faite à partir de la masse unitaire par types d'emballages.

L'évaluation de l'efficacité thérapeutique de artemether lumefantrine sur le *Plasmodium falciparum* dans les cas de paludisme non compliqué à Cotonou indique une réponse clinique et parasitologique adéquate de 96,5% et un taux d'échec thérapeutique de 3,5%.

La prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans était défaillante dans 35% des centres de santé publiques et assimilés en 2012, un an après le lancement de l'initiative. En 2013 ; 94% de formations sanitaires publiques et assimilées mettent effectivement en œuvre la prise en charge gratuite.

L'évaluation des méthodes diagnostiques montre que sur 100 cas de fièvres, 25 sont confirmés positifs pour paludisme. Cette proportion est similaire quel que soit l'outil utilisé pour le diagnostic biologique: le TDR, Cyscope et la goutte épaisse. Les deux techniques de diagnostic rapide (TDR et Cyscope®) ont une bonne sensibilité et spécificité.

L'évaluation des marqueurs moléculaires de la résistance du *Plasmodium falciparum* montre que la prévalence de la mutation T76 dans le gène pfcrt au sein de la population d'étude est de 85,2% et de 35,7% pour la mutation Y86 au sein du gène pfmdr1. Le gène pfcrt est impliqué de façon plus spécifique dans la résistance à la chloroquine du *Plasmodium falciparum* que le pfmdr1. Par contre pour le gène pfdhps,

le taux de portage de *Plasmodium falciparum* est de 7,6%. ii) La prévalence des mutations au niveau des codons 436, 437 est encore faible au niveau du site d'étude. La sulfadoxine conserve donc une relative efficacité sur les souches de *Plasmodium falciparum* dans le département du Littoral. Il n'a pas été mis en évidence dans l'étude, de relation directe entre le statut clinique et la présence de mutation au niveau des codons 436 et 437.

La campagne nationale de distribution gratuite de Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILD) aux ménages a permis de :

- dénombrer 1 807 854 ménages sur 1 546 632 attendus, soit un taux de 115,15%.
- couvrir à l'échelle nationale un effectif de 1 639 090 ménages sur les 1 807 854 ménages recensés au total, soit un taux de couverture administrative nationale de 90,6%.

Au total, 4 674 800 moustiquaires ont été distribuées et ont engendré 89,15 tonnes de déchets qui ont été collectées dans les 34 zones sanitaires puis détruits conformément aux normes environnementales.

Les principales stratégies de diagnostic biologique, de prise en charge et de prévention du paludisme en vigueur au Bénin sont conformes aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé et contribuent au bien être de la population. Elles permettent d'augmenter la protection des populations contre le paludisme et la prise en charge effective des cas de paludisme. Elles contribuent à l'atteinte des OMD 4, 5, 6 et 7.

ABSTRACT

The main strategies contained in the national strategic plan 2011-2015 goals are to contribute to the achievement of the objectives N °4, 5, 6 and 7of the MDGs in the Republic of Benin. This study allowed to evaluate the effectiveness of the main strategies of case management and prevention of malaria in Benin and analyse their contribution to the achievement of the MDGs.

The evaluation of the therapeutic efficacy of Artemether lumefantrine took place in Cotonou, according to the World Health Organisation Protocol.

The evaluation of the implementation of the free case management was made in 34 health zones of Benin by a probability sampling with systematic sampling technique.

The evaluation of the distribution of MIILDs campaign took place throughout the national territory.It is a quantitative cross-sectional study which covered the twelve (12) departments. The sampling method that has been used is to survey two degrees of type World Health Organisation cluster. Quantification of the MIILDs packaging waste was made by a non-probabilistic, technical convenience sampling.

The evaluation of the therapeutic efficacy of Artemether lumefantrine on *Plasmodium falciparum* in malaria uncomplicated Cotonou indicates a clinical and parasitological response adequate 96.5% and a rate of treatment failure of 3.5%.

The free management cases of malaria among pregnant women and children under 5 years was deficient in 35% of the centres of public and allied in 2012, a year after the launch of the initiative. In 2013; 94% of health units public and assimilated ensure taking free management cases.

Evaluation of diagnostic methods shows that out of 100 cases of fevers, 25 are confirmed positive for malaria. This proportion is similar regardless of the tool used for the biological diagnosis: TDR, Thick smears/Thin smears and Cyscope. The two techniques of rapid diagnosis (TDR and Cyscope ®) have a good sensitivity and specificity. Evaluation of molecular markers of resistance of *Plasmodium falciparum* shows that the prevalence of the T76 mutation in gene pfcrt within the study population is 85.2% and 35.7% for the Y86 mutation within the gene pfmdr1. The pfcrt gene is involved more specifically in resistance to chloroquine *Plasmodium falciparum* than the pfmdr1.

For the pfdhps gene, rate of *Plasmodium falciparum* is 7.6%. (ii) the prevalence of mutations at codons 436, 437 level is still low at the level of the study site. Sulfadoxine therefore retains relative efficiency on strains of *Plasmodium falciparum* in the Department of Littoral. He was not highlighted in the study, relationship directly between the clinical status and the presence of mutation at the level of the codons 436 and 437.

The national campaign for distribution of long lasting insecticidal bednets to households:

- count 1 807 854 household on 1 546 632 attended, 115.15%.
- cover 1 639 090 household on 1 807 854 ménages attended, 90.6%

Au total, 4 674 800 bednet were distributed and generated 89.15 tons of waste that has been collected in 34 health zones and then destroyed in accordance with environmental standards.

The main strategies of biologic diagnostic, case management and prevention of malaria applied in Benin are conform to the recommendations of the World Health Organization and contribute to the well-being of the population. They allow increasing the protection of populations against malaria and the effective support of malaria cases. They contribute to the achievement of MDG 4, 5, 6 and 7.

Introduction générale

1. Contexte et justification

La zone intertropicale est caractérisée par une température moyenne mensuelle toujours supérieure à 18 ou 20°C ; une faible variation de la durée des jours et des nuits : à peu près 12 h de jour et 12 h de nuit toute l'année ; une amplitude thermique annuelle faible ; une répartition des pluies dite «zénithale» avec un maximum ou deux maxima dans les semaines qui suivent les passages du soleil au zénith.

Cette zone présente des pathologies tropicales variées, avec une prédominance des affections endémo-épidémiques dont la plus importante est le paludisme.

Dans le monde entier, 99 pays sont touchés par la transmission du paludisme et près de 3,3 milliards de personnes sont exposées au risque d'infection. On estime environ 207 millions de cas survenus en 2012 et 627000 décès **(**OMS, 2013). Plus de 90% des décès liés au paludisme surviennent en Afrique et 86% des victimes sont des enfants de moins de 5 ans (OMS, 2012).On estime que 44% des cas de décès liés au paludisme soit 290000 cas ont lieu au Nigéria et en République Démocratique du Congo.

Selon les données soumises en 2013, 52 pays sont en bonne voie vers une réduction de leur taux d'incidence des cas de paludisme de 75% dans le droit fil des cibles fixées pour 2015 par l'assemblée mondiale de la santé et le partenariat Roll Back Malaria «Faire reculer le paludisme ». En effet, l'incidence du paludisme a diminué de 31% en Afrique depuis 2000 tandis que le taux de mortalité a décliné de 42 % (OMS, 2013). Il faut noter que les 52 pays ayant soumis des données exhaustives ne représentent que 4 % des cas estimés dans le monde. (OMS, 2013).

La figure ci-dessous présente la répartition des cas de paludisme dans le monde.

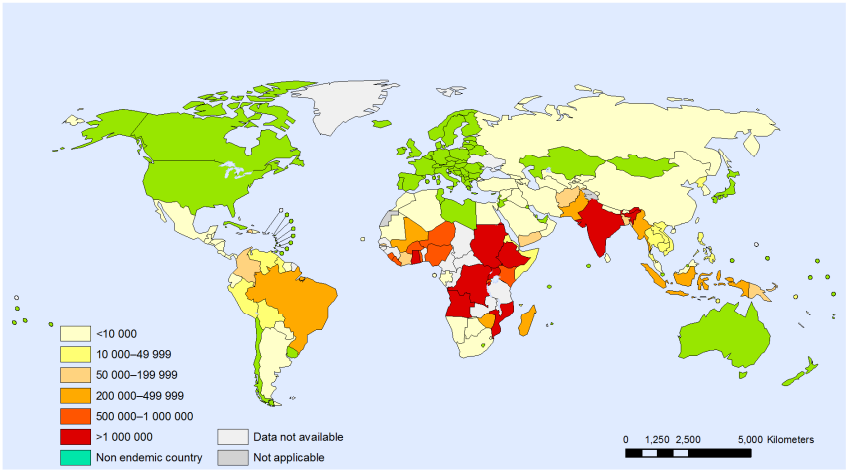


Figure 1 : Nombre de cas confirmés en 2010

Source : OMS, 2012

Les 52 pays en bonne voie pour la réduction de l'incidence du paludisme ne représentent que 4 % des cas totaux estimés dans le monde, soit 8 millions (OMS 2013). La stagnation de l'incidence s'explique donc par un certain nombre de faits. En novembre 2010, 25 pays situés dans la région africaine autorisaient encore la commercialisation des monothérapies. La propagation de la résistance aux médicaments antipaludiques au cours des dernières décennies a conduit à une intensification de la surveillance de l'efficacité pour permettre une détection précoce de la résistance. (OMS, 2010).

L'utilisation des CTA comprenant un médicament partenaire inefficace peut augmenter le risque de développement ou de propagation de résistance à l'artémisinine comme ce fut le cas pour la chloroquine.

Chaque année, selon les estimations de l'OMS, 150 millions de MIILD sont nécessaires pour protéger toutes les populations à risque de paludisme en Afrique subsaharienne. Le nombre annuel de MIILD livrées par les fabricants aux pays d'endémie palustre en Afrique subsaharienne est de 92 millions en 2011 et 66 millions en 2012. (OMS, 2012). Ces MIILD sont à la base de la production de centaines de tonnes de déchets et constituent à la longue un problème majeur de santé s'ils ne sont pas récupérés et détruits suivant les normes environnementales (OMS 2008).

Toutefois, on note ces dernières années une amélioration sensible. En 2011, 79 pays et territoires ont adopté les CTA en traitement de première intention pour le paludisme à *Plasmodium falciparum*. Selon les rapports de fabricants et le dispositif pour des médicaments abordables pour le paludisme (DMAP), le nombre de traitements par CTA livrés aux secteurs publics et privés dans le monde a augmenté, passant de 11 millions en 2005 à 278 millions en 2011 (OMS, 2012). Les tests de diagnostic rapide sont offerts gratuitement dans le secteur public de 84 pays dans le monde. La proportion de cas suspects testés est passée de 37 % en 2010 à 61 % en 2012 (OMS, 2013).

Au Bénin, la gestion du paludisme est un problème essentiel de santé publique, de gestion de l'environnement, mais aussi de développement; ce qui explique que le Ministère de la Santé en ait fait une maladie prioritaire. Un programme de lutte contre la maladie a été créé, avec des stratégies devant permettre de réduire l'incidence du paludisme. Les données du système national d'information et de gestion des données sanitaires (SNIGS) de la période de 2003-2013 montrent qu'il y a une stagnation de l'incidence du paludisme avec de légères tendances à la hausse. La létalité a peu évoluée au cours de la même période avec une légère baisse en 2008 (Ministère de la Santé, 2013).

La prise en charge correcte du paludisme nécessite la confirmation biologique des présomptions cliniques avec les tests de diagnostic rapide dans les centres de santé ne disposant pas de laboratoire et dans la communauté, ou la goutte épaisse dans les laboratoires (Programme National de Lutte contre le Paludisme, 2011).

Les cas confirmés doivent être traités avec les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine CTA (artemether lumefantrine ou artesunate amodiaquine) pour le paludisme simple, et pour le paludisme grave avec la quinine ou artesunate injectable (Programme National de Lutte contre le Paludisme, 2011)**.**

Le diagnostic biologique de qualité, le traitement par un médicament efficace associé à la prise en charge gratuite des cas de paludisme sont autant de mesures qui contribuent à améliorer l'accès aux soins des populations et l'atteinte des objectifs du millénaire pour le développement en son point 6.

2. Enoncé du problème

Dans le but d'assurer un mieux-être au peuple béninois, la Constitution de la République du Bénin met l'accent sur le droit des populations de bénéficier de soins de qualité (Constitution de la République du Bénin, 1990) et les objectifs du millénaire pour le développement (OMD) stipulent en leur point 6 : combattre le VIH/SIDA, le paludisme et les autres maladies. Pour atteindre ses objectifs, le PNLP a retenu, conformément aux normes internationales de lutte contre le paludisme, les stratégies suivantes:

- ✓ Prévention du paludisme
- ✓ Prise en charge des cas de paludisme
- ✓ Communication intégrée
- ✓ Suivi évaluation
- ✓ Capacités institutionnelles & gestion du programme

Dans le cadre de la présente thèse intitulée ***« Evaluation des principales stratégies de diagnostic biologique, de prise en charge et de prévention du paludisme*** » , les deux premières stratégies ont fait l'objet d'évaluation pour apprécier leur pertinence et leur contribution à l'atteinte des OMD 4, 5, 6 et 7.

Pour y arriver il a fallu:

1. Evaluer l'efficacité thérapeutique et l'innocuité de artemether lumefantrine dans les cas de paludisme simple;
2. Evaluer la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes ;

3. Evaluer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine chez les enfants ;
4. Evaluer la performance des TDR et du Cyscope® versus GE dans le diagnostic biologique du paludisme
5. Evaluer la campagne de distribution des MIILD pour la couverture universelle, édition 2011 et la gestion des déchets issus des emballages des MIILD.

3. Hypothèses de recherche

La démarche de recherche conçus pour cette étude repose sur quatre hypothèses :

Traitement du paludisme:

- (H1) La combinaison thérapeutique artemether lumefantrine, utilisée pour la prise en charge du paludisme simple au Bénin a un taux d'échec thérapeutique précoce inférieur à 10%.
- (H2) La prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes est effective dans au moins 90% des formations sanitaires publiques et assimilées.

Diagnostic biologique du paludisme:

- (H3) La goutte épaisse et le test au microscope à immunofluorescence Cyscope® sont plus sensibles que les tests de diagnostic rapide.
- (H4) La prévalence des mutations est supérieure ou égale à 70% pour les marqueurs moléculaires pfcrt et pfmdr1 de la résistance du *Plasmodium* à la chloroquine et inférieure à 10% sur le gène pfdhfr de la résistance du *Plasmodium* à la sulfadoxine dans le département du Littoral

Prévention du paludisme:

- (H5) La campagne de distribution gratuite de MIILD aux ménages en 2011 augmente la couverture en MIILD à 90% au moins et le taux d'utilisation des MIILD par la population béninoise à plus de 80 %.

4. Objectifs de la recherche

❖ Objectif général

Evaluer les principales stratégies de diagnostic biologique, de prise en charge et de prévention du paludisme au Bénin.

❖ Objectifs spécifiques

- ✓ Déterminer les taux de réponse clinique, de réponse parasitologique adéquate et d'échec thérapeutique de artemether lumefantrine dans le cas de paludisme simple *Plasmodium falciparum* chez les enfants de 6 mois à 14 ans à Cotonou ;
- ✓ Déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires pfcrt, pfmdr1 et des mutations ponctuelles du gène Pfdhps dans le département du Littoral.
- ✓ Evaluer la performance des TDR et du Cyscope® en référence à la GE
- ✓ Evaluer la mise en œuvre de la stratégie de prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes dans les formations sanitaires publiques et assimilées;
- ✓ Déterminer la couverture et le taux d'utilisation des MIILD en République du Bénin après la campagne de distribution des MIILD en 2011.

5- Plan de thèse

La présente thèse s'articule autour de cinq points importants.

- Le premier point porte sur l'efficacité thérapeutique et l'innocuité des antipaludiques recommandés par la politique de lutte contre le paludisme au Bénin. Dans ce chapitre, nous avons évalué les taux d'échec thérapeutique et de réponse clinique et parasitologique adéquate pour artemether lumefantrine recommandés par le PNLP pour la prise en charge du paludisme simple ; (**article N°1**)
- Le second porte sur l'évaluation de la prise en charge gratuite du paludisme chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes dans les formations sanitaires publiques et assimilées du Bénin. Cette évaluation a permis d'une part de parcourir les formations sanitaires de tous les départements, d'administrer un questionnaire, de faire des investigations dans les dossiers des malades et les registres de soins. D'autre part de confronter les données transmises par les formations sanitaires au PNLP pour remboursement de frais engagés, avec les données effectives dans les centres de santé. (**article N°2**).
- Le troisième porte sur l'évaluation de la performance des tests de diagnostic rapide (TDR) et du Cyscope® versus goutte épaisse (GE) dans le diagnostic biologique du paludisme (**article N°3**)
- Le quatrième porte sur l'évaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine pyriméthamine chez les enfants dans le département du Littoral au Bénin
- Le cinquième point porte sur l'évaluation de la couverture et le taux d'utilisation des MIILD en République du Bénin à l'occasion de la campagne de distribution gratuite de MIILD en 2011. En juillet 2011, le Ministère de la Santé à travers le PNLP, a organisé une vaste campagne de distribution de MIILD aux ménages dans tous les départements, communes, arrondissements, villages et hameaux. La quantité de déchets produits a été déterminée ; (**article N°4 ; EDS 2011-2012**). Il a été suivi de l'évaluation de la quantité de déchets produits par les MIILD, et leur destruction.

6- Cadre d'étude

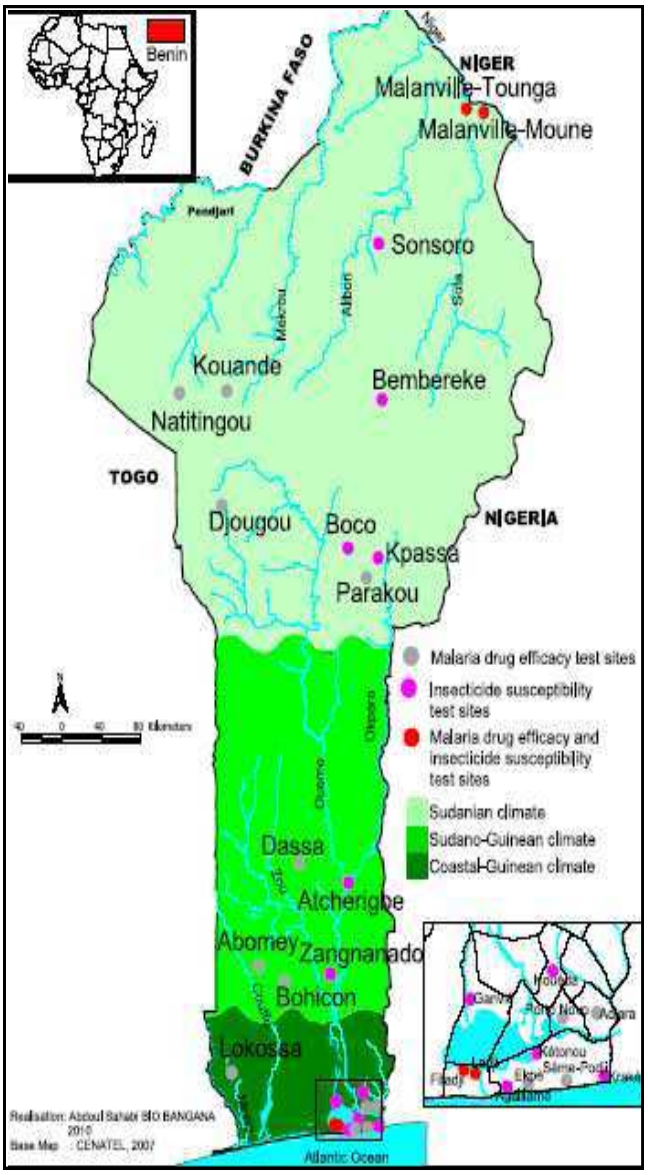


Figure 2 : Cartographie et stratification du risque lié au paludisme en République du Bénin. Source SIGS 2013

Cette étude a été réalisée en République du Bénin, un pays fortement touché par le paludisme. Il est situé en Afrique de l'Ouest sur le Golf de Guinée et couvre une superficie de 114 763 km^2. Sur le plan administratif il est subdivisé en 12 départements et 77 communes. Sur le plan sanitaire, le pays est subdivisé en 12 départements sanitaires et 34 zones ou districts sanitaires. La population du Bénin est estimée en 2013 à 9 671 592 habitants avec un taux d'accroissement annuel de 3,25% (INSAE, 2014). Au Bénin la transmission du paludisme est stable dans l'ensemble du pays. Les principaux facteurs qui influencent la transmission sont l'espèce vectorielle, la géographie, le climat, l'hydrographie, la pluviométrie, la température.

On distingue trois principales zones de transmission (figure) : (i) dans la zone sud, côtière avec des lacs et lagons la transmission est hétérogène du fait de la diversité des vecteurs, (ii) au centre, la transmission est holo-endémique, (iii) au nord, la transmission est saisonnière avec un pic au cours de la saison des pluies allant de juin à octobre. Toute la population est exposée au paludisme. Cependant les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes constituent les groupes les plus vulnérables ; et sont exposés aux formes graves de la maladie.

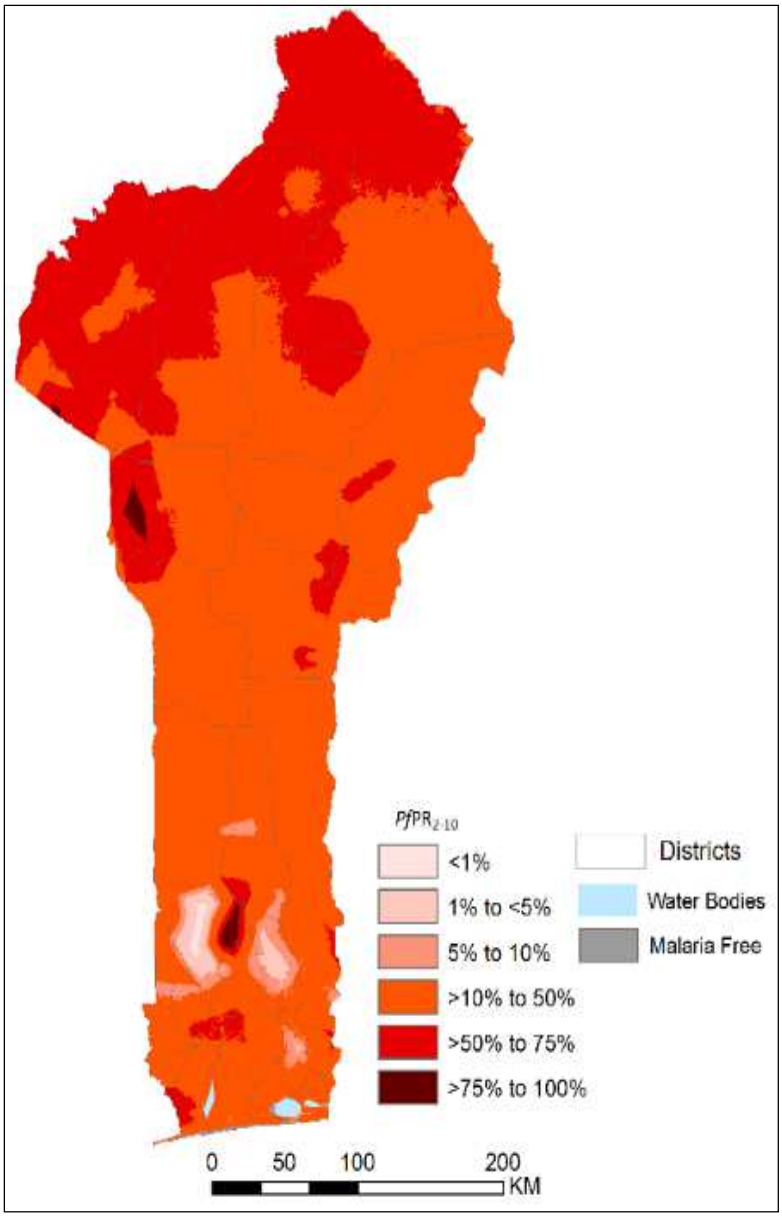


Figure 3: Cartographie de l'endémicité du paludisme au Bénin en 2014. Source : SIGS 2014

L'agent pathogène du paludisme est le *Plasmodium* et l'espèce la plus répandue au Bénin est *Plasmodium falciparum*. Il est à l'origine de 98% des cas de paludisme. D'autres espèces, notamment le *Plasmodium malariae* et le *Plasmodium ovale* sont responsables de 2% des cas. Le *Plasmodium vivax* est rare au Bénin.

Une étude conduite au Bénin (Akogbéto & Di Deco, 1995) a identifié *l'anopheles gambiae* comme en étant le principal vecteur. Le paludisme représente 40,6% des motifs de recours aux soins dans les centres de santé au Bénin. En 2013, les formations sanitaires ont notifiées 1635 828 cas de paludisme dont 2 033 décès (SNIGS 2013).

Près de 45% des cas de paludisme ont été enregistrés chez les enfants âgés de moins de cinq ans; 37% des décès liés au paludisme sont également enregistrés dans ce groupe (SNIGS 2013). Le nombre de cas cliniques et de cas présumés de paludisme enregistrés chez les femmes enceintes est de 136 687 soit environ 8,5% des cas (SNIGS 2013). L'Enquête Démographique de Santé de 2012 indique que la prévalence du paludisme chez les enfants âgés de 6-59 mois est de 28% (EDS 2012).

Les données du système national d'information et de gestion des données sanitaires de la période de 2003-2013 montrent qu'il y a une stagnation de l'incidence du paludisme

avec de légères tendances à la hausse. La létalité a peu évoluée au cours de la même période avec une légère baisse en 2008. (SNIGS 2013)

6.1 Sites de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'artemether lumefantrine

Les sites d'étude pour les tests d'efficacité thérapeutique se situent au niveau périphérique.

- **L'hôpital Saint Luc à Cotonou**

Le service de pédiatrie qui a permis d'inclure les malades est dirigé par un médecin pédiatre, et compte en outre 5 médecins et 14 infirmiers. Au titre de l'année 2010, le nombre de consultations pédiatriques était de 15233; le nombre de malades hospitalisés était de 4235 dont 1129 cas de paludisme pour 38 lits. Le nombre de cas de paludisme reçu en consultation était de 3658.

- **L'hôpital Bethesda à Cotonou**

Le service de pédiatrie est également sous la responsabilité d'un pédiatre et compte en outre 4 médecins. Au titre de l'année 2009, le nombre de consultations pédiatriques était de 2818; le nombre d'enfants hospitalisés était de 1683 avec un taux de décès en hospitalisation de 4 %.

6.2 Sites d'évaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine pyriméthamine chez les enfants dans le département du Littoral au Bénin et d'évaluation de la performance des TDR et du Cyscope® versus GE dans le diagnostic biologique du paludisme

Les sites de collecte sont constitués d'écoles primaires publiques et des hôpitaux Saint Luc et Bethesda situés dans les 8ème et 10ème arrondissements de la commune de Cotonou (département du Littoral).

Les sites de manipulation sont constitués des laboratoires des hôpitaux de St Luc, de Bethesda ; et du laboratoire de parasitologie du CNHU-HKM où ont été réalisés des GE/DP, le dosage de l'hémoglobine, la réalisation des Confettis et des laboratoires du CERPAGE **(**Centre d'Etude et de Recherche pour le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance) et du CLIP (Centre de Lutte Intégrée contre le Paludisme) où ont été réalisés des travaux de biologie moléculaire.

Le CERPAGE dispose d'un laboratoire situé dans les locaux du laboratoire de parasitologie de la FSS et spécialisé dans la recherche fondamentale sur le Plasmodium chez l'enfant et la femme enceinte en milieu tropicale. Le laboratoire du

CLIP est une unité de biologie moléculaire implantée dans l'enceinte de l'école de Pharmacie de la FSS.

6.3 Evaluations de la prise en charge gratuite du paludisme, de la campagne de distribution des MIILD et de la gestion des déchets

Les évaluations se sont déroulées sur l'ensemble du territoire national.

Pour l'évaluation de la prise en charge gratuite des cas de paludisme, toutes les zones sanitaires ont été parcourues et les centres de santé ont été retenus de sorte à parcourir toutes les communes composant la zone sanitaire.

L'évaluation de la campagne de distribution gratuite de MIILD aux ménages a été réalisée sur l'ensemble du territoire national dans tous les départements, communes, arrondissements, villages et hameaux. La collecte des déchets issus des MIILD a été faite également dans toutes les zones sanitaires.

Chapitre 1
Généralités sur le paludisme

L'environnement intertropical dans lequel se situe le Bénin est caractérisé par des affections endémo-pathologiques qui perturbent le bien-être des populations. Parmi ces affections, se trouve en première position le paludisme.
Maladie de l'environnement créant un sérieux problème de santé publique, le paludisme fait l'objet de la présente thèse.

1.1 Définition de concepts

Paludisme : ou malaria (de l'italien mal' aria), « mauvais air » est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* et transmis à l'homme par la piqûre des moustiques du genre *Anophèle* femelle (Ross, 1897; Grassi *et al*., 1899A ET B).
Il est caractérisé par une fièvre qui est généralement intermittente, et selon un rythme caractéristique pour chaque espèce plasmodiale.

Anémie sévère : Concentration d'hémoglobine < 5 g pour 100 ml (hématocrite < 15%) (Kitua *et al.,* 1996 ; Kitua *et al.,* 1997).

Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (CTA) : Association d'artémisinine ou de l'un de ses dérivés et d'un ou plusieurs antipaludiques d'une autre classe (OMS, 2002).

Mérozoïtes : Formes parasitaires libérées dans la circulation sanguine lors de l'éclatement d'un schizonte hépatique ou érythrocytaire. Elles envahissent ensuite les hématies (Khouri & Claude, 1990).

Monothérapie : Traitement antipaludéen au moyen d'un seul médicament (soit un composé actif unique, soit une association synergique de deux composés dont les mécanismes d'action sont liés) (Wellems & Plowe, 2001; Basco *et al*., 1995; Hudson *et al*., 1991.

Paludisme grave à falciparum : Forme aiguë de paludisme à *Plasmodium falciparum* accompagnée de signes de gravité et/ou d'un dysfonctionnement des organes vitaux (Newton *et al.,* 2000; WHO, 1990; White, 1992; Treutiger *et al.,* 1992; Looareesuwan *et al.,* 1987; Ringwald *et al.*, 1993; Sherman *et al.,* 2003; Pino *et al.,* 2003).

Paludisme simple : Infestation symptomatique accompagnée d'une parasitémie palustre sans signes de gravité ni dysfonctionnement des organes vitaux (Bruce-Chwatt, 1952 ; Kitua *et al.*, 1996).

Plasmodium : Genre de protozoaires parasitant le sang des vertébrés (hématozoaire) qui comprend les agents étiologiques du paludisme. *Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax* provoquent des accès palustres chez l'homme. Des infestations humaines par la plasmodie du singe *Plasmodium knowlesi* ont également été signalées dans des zones forestières de l'Asie du Sud-Est (Laveran, 1880).

Recrudescence: Récurrence d'une parasitémie asexuée après le traitement de l'infestation, due aux mêmes plasmodies que celles qui ont causé l'accès initial. Elle résulte d'une élimination incomplète de la parasitémie en raison d'un traitement insuffisant ou inefficace. Elle se distingue donc des rechutes observées dans les infestations à Plasmodium *vivax* et Plasmodium *ovale* et ne constitue pas non plus une nouvelle infestation ou une ré-infestation (comme le montre le génotypage moléculaire dans les zones d'endémie (OMS, 2006; Ursing *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2007).

Récurrence: Récurrence d'une parasitémie asexuée faisant suite à un traitement. Elle peut être due à une recrudescence, à une rechute (dans les infestations à Plasmodium *vivax* et à Plasmodium *ovale* uniquement) ou à une nouvelle infestation (OMS, 2006; Ursing *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2007).

Test de Diagnostic Rapide (TDR) : Test antigénique sur bandelettes, cassette ou carte, dans lequel une coloration linéaire indique la présence d'antigènes plasmodiaux (WHO, 2000).

1.2 Historique de la maladie

Avant 1630, on distinguait déjà, parmi les fièvres intermittentes, la « fièvre des marécages ». En 1630, Don Francisco Lopez apprend à des Indiens du Pérou les vertus de l'écorce de quinquina ; les fièvres sont alors divisées en deux groupes, selon leur sensibilité ou leur résistance à cette drogue. Pelletier et Caventou en isolent l'alcaloïde actif (1820), la quinine, que Maillot utilise au cours de la campagne d'Algérie (1830). L'agent pathogène est découvert en 1880 par Charles Laveran à Constantine. Marchiafava Cellie et Golgi, distinguaient trois espèces de parasites de l'homme : Plasmodium *vivax*, Plasmodium *falciparum et* Plasmodium *malariae*. De 1895 à 1897, la transmission de cette

affection par un moustique du genre Anopheles est soupçonnée par Ross, et sera confirmée par Grassi en 1898. Stephens isole en 1922 une quatrième espèce plasmodiale pathogène pour l'homme : Plasmodium *ovale*. C'est en 1930 que la cinquième espèce *Plasmodium Knowlési* a été identifiée chez un macaque par Dr Robert Knowles et Dr Biraj Mohan Das Gupta à Calcutta. En 1965, le premier cas de transmission naturelle à l'homme a été prouvé par CDC Atlanta, en Malaisie.

Avant la seconde guerre mondiale, la chloroquine, premier antipaludique de synthèse, est préparée.

En 1961, la mise en évidence de souche de *Plasmodium falciparum* résistante aux amino-4-quinoléines, dont la chloroquine remet en cause les progrès.

Actuellement, la recherche est orientée vers la lutte anti vectorielle, le diagnostic, le traitement, et la vaccination contre le parasite. Les problèmes sont d'ordre technique (résistance des anophèles aux insecticides), mais aussi économique (coût des insecticides et de la mise en œuvre de la lutte antivectorielle). Le traitement du paludisme requiert de nouveaux produits efficaces contre les souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux antipaludiques usuels.

1. 3 Epidémiologie

1.3.1 L'agent pathogène

L'agent pathogène du paludisme est un protozoaire intracellulaire appartenant au phylum des Apicomplexa, à la classe des Sporozoea, à la sous classe des Coccidia, à l'ordre des Eucoccidida, sous ordre des Haemosporina à la famille des Plasmodiidae et au genre *plasmodium (Robert, 1989).*

Le paludisme humain est causé par cinq espèces plasmodiales parmi plus de 140 espèces de plasmodium. Il s'agit de :

- ✓ *Plasmodium falciparum* : C'est le plus redoutable, le plus fréquent et le plus répandu à travers le monde surtout dans les régions tropicales et intertropicales. Il est responsable des cas de paludisme grave. Son incubation correspond au cycle exoérythrocytaire et dure 7 à 12 jours. Il développe souvent des résistances aux antipaludiques.
- ✓ *Plasmodium vivax* : Il est responsable de la fièvre tierce bénigne et est moins repandu que falciparum. On le rencontre souvent entre le 33ème degré de latitude Nord et le 25ème degré de latitude Sud. Son incubation est de 11 à 15 jours selon la souche. Il est responsable de l'accès de reviviscence schizogonique.

- ✓ *Plasmodium ovale :* Il est responsable des fièvres tierces bénignes. Il est peu identifié au Bénin. Sa durée de vie peut atteindre 4 ans.
- ✓ *Plasmodium malariae* : Il présente une répartition clairsemée et est responsable de la fièvre quarte. Il est rarement observé au Bénin et a une durée de vie comprise entre 3 et 20 ans.
- ✓ *Plasmodium Knowlesi :* proche génétiquement de *Plasmodium vivax*, et microscopiquement de *Plasmodium malariae*. Il a été découvert récemment chez l'Homme en Malaisie en 1965 (mais était connu antérieurement chez le singe).

1.3.2 L'agent vecteur

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique culicidé du genre *Anopheles.* C'est un Arthropode de l'ordre des diptères, sous-ordre des nématocères, de la famille des culicidae, et de la sous-famille des anophelinae. Seule la femelle hématophage peut transmettre le paludisme après piqûre surtout le soir ou la nuit (Bruce-Chwatt & De Zulueta, 1985; Mouchet et al., 1993; Harbach, 2004 ; Coluzzi, 1992).

1.3.3 Cycle évolutif du paludisme

Le parasite évolue successivement chez deux hôtes : l'homme et l'anophèle femelle. Ainsi nous avons: la phase asexuée ou schizogonique chez l'homme (l'hôte intermédiaire) et la phase sexuée ou sporogonique chez l'Anophèle femelle (hôte définitif) (Khouri & Claude, 1990).

1.3.3.1 Cycle schizogonique chez l'homme

- ✓ **Schizogonie pré érythrocytaire**

Au cours de la piqûre, un moustique infesté injecte dans un capillaire sanguin des sporozoïtes infectants contenus dans les glandes salivaires. Ces derniers ne font que transiter une demi-heure dans les capillaires sanguins et gagnent le foie où ils pénètrent au sein des hépatocytes.

Leur développement et leur multiplication repoussent vers la périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multi nucléée appelée schizonte ou corps bleu. La cellule éclate après quelques jours de maturation, libérant de nombreux mérozoïtes uninucléés.

Certains parasites restent à l'état quiescent dans les hépatocytes, sans se transformer en corps bleu, ce sont les hypnozoïtes. Après un temps variable, génétiquement déterminé, ils

entrent en division .Ce phénomène n'existe que chez les espèces *Plasmodium vivax et Plasmodium ovale* expliquant l'accès de reviviscence tardif (Sinden, 1998).

- ✓ **Schizogonie érythrocytaire**

Les mérozoïtes libérés gagnent la circulation sanguine, pénètrent par endocytose dans les hématies et deviennent chacune un trophozoïte. Celui-ci se développe, grossit et son noyau se divise. Il en résulte un schizonte, qui se charge progressivement d'un pigment spécifique d'origine parasitaire, l'hémozoïne ou pigment malarique. La multiplication des noyaux forme dans l'hématie un corps en rosace. Parallèlement apparaissent dans l'hématie selon l'espèce plasmodiale en cause, des granulations de Schuffner (*P. vivax, P.ovale*), des taches de Maurer (*P. falciparum*) ou des ponctuations de Ziemann (*P.malariae*). Le corps en rosace, dilaté et mur éclate. Cet éclatement est contemporain de l'accès thermique clinique. L'hémozoïne libérée est phagocytée par des leucocytes polynucléaires ou mononucléaires qui deviennent mélanifères. Ils déversent cette charge pigmentaire dans les tissus au niveau des cellules du système monocyte-macrophage (cellules de Kupffer du foie et histiocytes de la rate) (Taylor & Read, 1997).

Les mérozoïtes libérés vont parasiter une hématie vierge et poursuivre le cycle intraérythrocytaire. On parle de cycle asexué ou érythrocytaire. Après plusieurs cycles asexués, apparaissent dans les hématies des éléments à potentiel sexué, les gamétocytes, qui ne poursuivront leur développement que s'ils sont absorbés par l'Anophèle femelle. C'est le cycle sexué ou sporogonique qui commence (Taylor & Read, 1997).

1.3.3.2 Cycle sporogonique chez l'anophèle femelle

Lors de son repas sur un sujet paludéen, l'anophèle peut ingérer tous les autres stades évolutifs des plasmodiums contenus dans le sang. Seuls les gamétocytes vont poursuivre le cycle à l'intérieur de l'organisme du moustique et se transforment en gamètes mâles et femelles. La fécondation issue de la fusion d'un gamète femelle et d'un gamète mâle, donne un œuf mobile appelé ookinète, qui traverse la paroi de l'estomac du moustique et se transforme à sa face antérieure en oocyste, dans lequel, par division, s'individualisent les sporozoïtes. Une fois libérés, ces derniers gagnent les glandes salivaires de l'anophèle, réservoir à partir duquel ils pourront être injectés à l'homme lors d'une nouvelle piqûre infectante. C'est le cycle sexué ou sporogonique (Khouri & Claude, 1990).

Ci-dessous, le cycle des plasmodies humaines.

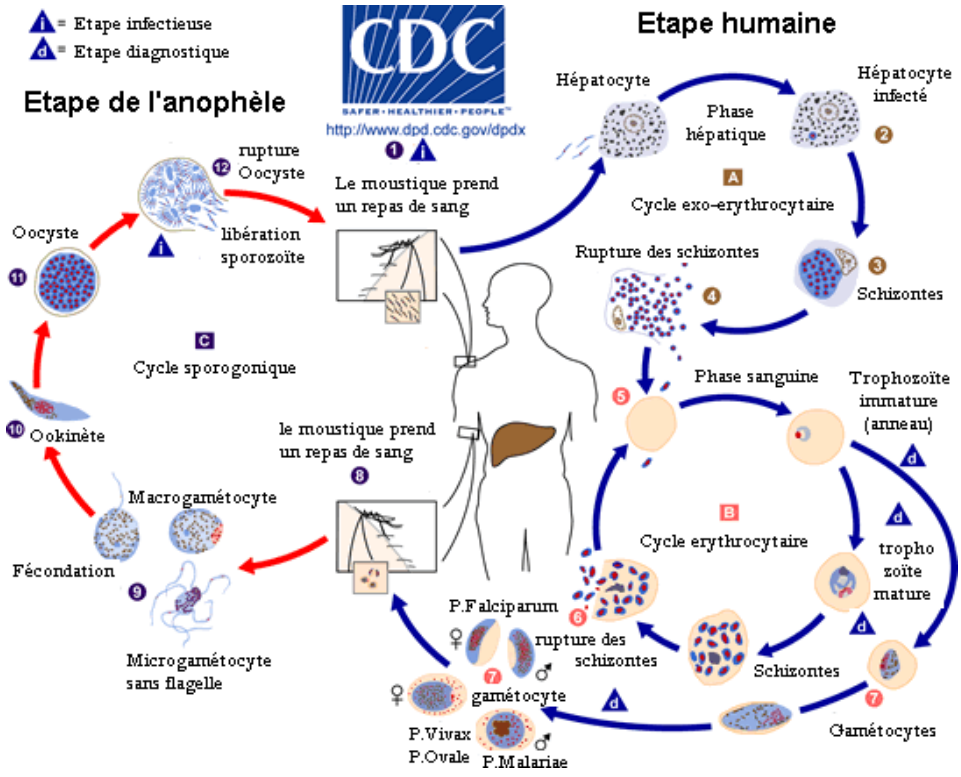


Figure 4: Cycle des plasmodies humaines

Source: (Khouri & Claude, 1990). http://www.dpd.cdc

1.3.4 Répartition géographique du paludisme

La figure ci-dessous présente la répartition du paludisme dans le monde. L'Afrique et les pays les moins avancés sont les plus affectés.

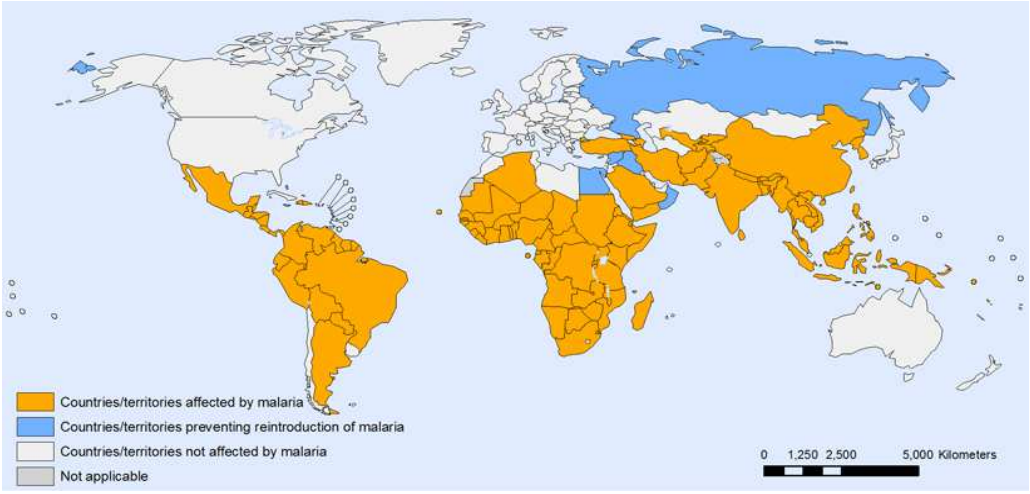


Figure 5 : Pays et territoires affectés par le paludisme

Source: OMS World Malaria Report 2010, Genève, 2012.

1.3.5 Les faciès épidémiologiques

La variation de transmission selon les régions permet de définir des zones épidémiologiques (Robert et al, 1988; Sangare, 1996). On distingue :

- **Les zones de paludisme stable :** le paludisme se transmet toute l'année, avec parfois de légères variations saisonnières. Les adultes sont protégés et sont peu exposés. Le Bénin est situé dans une zone de paludisme stable.

- **Les zones de paludisme instable :** elles se caractérisent par une transmission intermittente liée à la saison de transmission, qui correspond en général à la saison pluvieuse. Les adultes et enfants sont sujets au paludisme grave dans cette zone.

- **Les zones exemptes de paludisme** : la population n'a aucune immunité contre le paludisme dans ces zones. En cas de déplacement dans une zone endémique, le sujet est exposé au paludisme grave.

1.3.6 Ethiopathogénie

Les manifestations du paludisme sont liées directement ou indirectement à la schizogonie érythrocytaire, alors que la schizogonie hépatique comme la gamogonie sont asymptomatiques. La gravité de la symptomatologie dépend de l'espèce plasmodiale, et du degré de prémunition de l'hôte. Ainsi, au cours de la schizogonie érythrocytaire, l'hémolyse entraine l'anémie et l'ictère, libère l'hémozoïne qui est une substance pyrogène. Dans la rate et parfois le foie, l'hypersplénisme et les macrophages responsables de la phagocytose des hématies parasitées sont à la base de l'hépato-splénomegalie clinique. (Gentilini, 1991).

1.4 Diagnostic du paludisme

Le diagnostic du paludisme se base sur la présence des signes cliniques confirmés à la biologie par la présence des plasmodies dans le sang, soit par la goutte épaisse/frottis sanguin, soit par les tests de diagnostic rapide (TDR) (Baudon *et al.*, 1985).

1.4.1 Manifestations cliniques du paludisme

1.4.1.1 Paludisme simple

Le diagnostic est basé sur la détection de la fièvre (température axillaire ≥ 37°5 C) ou antécédent récent de fièvre sans signes de gravité (Rogier *et al.*, 2001).

1.4.1.2 Paludisme grave

Le diagnostic du paludisme grave est basé sur la reconnaissance de l'un des signes de gravité (confère rubrique traitement du paludisme)

1.4.2 Diagnostic biologique

Il repose sur la mise en évidence du *Plasmodium* dans le sang. Le diagnostic biologique du paludisme est devenu obligatoire avec les nouvelles directives de lutte contre le paludisme. En effet, les cas déclarés uniquement sur des signes cliniques accroissent les traitements par excès, la pression médicamenteuse et l'extension des résistances parasitaires aux antipaludiques**.**

Le diagnostic biologique du paludisme permet de confirmer la présomption clinique, de quantifier la parasitémie, d'identifier l'espèce, d'apprécier la gravité du paludisme et d'évaluer l'efficacité du traitement. De ce fait, la disponibilité et l'accessibilité des tests biologiques sont essentielles pour une utilisation rationnelle des antipaludiques, en particulier les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) *(*Baudon et al., 1985*).*

1.4.2.1Examens d'orientation

- La numération formule sanguine (NFS) ou hémogramme montre une hémoglobine souvent normale au début de la maladie, une tendance leuco neutropénique et surtout une thrombopénie d'origine périphérique est très fréquente**.**
- La vitesse de sédimentation (VS) est peu élevée contrastant avec une protéine C- réactive élevée (CRP) souvent >100 mg/l.
- Les transaminases peuvent être élevées, pouvant égarer le diagnostic vers une hépatite virale.
- La cholestérolémie est basse, les triglycérides sont élevés et on a souvent une hypocalcémie.
- La glycémie : elle favorise également l'orientation du traitement.

1.4.2.2 Examen de confirmation

On distingue : le frottis sanguin, la goutte épaisse, la leucocytocentrifugation, le test à l'acridine orange ou Quantitative Buffy Coat (QBC), les Tests de Diagnostic Rapide (TDR), la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et actuellement la microscopie par fluorescence (Cyscope®) (Rogier et al., 2001).

♦ **Les techniques microscopiques conventionnelles**

Elles demeurent la référence. Elles nécessitent une méthodologie simple, mais précise, rigoureuse et un long apprentissage.

✓ **La goutte épaisse**

La goutte épaisse, examen de référence de l'OMS, est une excellente méthode d'enrichissement qui permet d'observer sur une petite surface beaucoup plus de sang que sur un frottis. Sa sensibilité est 10 à 20 fois plus élevée que celle du frottis mince.

La quantification des parasites se fait par la détermination du nombre de parasites par rapport au nombre de globules blancs. En général, on considère qu'il y a 6000 GB/µl de sang.

✓ **Le frottis sanguin**

Le frottis sanguin permet l'identification de l'espèce plasmodiale et l'étude de la morphologie des hématozoaires.

La lame séchée après coloration, est observée au microscope avec l'objectif à immersion. La lecture du frottis est facile si la coloration est bien faite car les hématozoaires sont bien visibles dans des hématies peu colorées. La parasitémie due à *Plasmodium falciparum* se présente sous l'aspect monotone de trophozoïtes annulaires parasitant l'hématie. La taille des hématies n'est pas modifiée et celles-ci contiennent quelques taches de Maurer.

Les deux techniques goutte épaisse et frottis sont complémentaires pour la détermination de la parasitémie et la confirmation de l'espèce plasmodiale **(**OMS, 2006**).**

♦ **La leucocytocentrifugation**

C'est une technique de concentration associant une hémolyse par la saponine, une cytocentrifugation et une coloration au May Grunwald Giemsa (MGG). Elle ne peut remplacer les techniques classiques de frottis sanguin et de goutte épaisse dans le diagnostic du paludisme, mais reste d'un intérêt épidémiologique certain**.**

♦ **La technique par fluorescence : Buffy Coat**

Le principe du test Quantitative Buffy Coat est la coloration fluorescente des acides nucléiques des parasites par l'acridine orange. Sa sensibilité est de 93% par rapport à la goutte épaisse et sa spécificité de 99,8%. Le seuil de détection est de 10p/µl de sang, mais ne permet pas un diagnostic d'espèce, son coût est prohibitif**.**

- **La séro-immunologie**

Elle repose sur la mise en évidence dans le sérum des immunoglobulines spécifiques (IgG, IgM) de *Plasmodium*. Cette méthode n'a pas d'intérêt pour un diagnostic d'urgence et est plus utilisée lors des enquêtes épidémiologiques**.**

- **La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

La technique de PCR permet de mettre en évidence la présence d'ADN parasitaire. Il s'agit de la méthode la plus sensible et la plus spécifique. Elle est onéreuse et utilisée au laboratoire de recherche. Elle permet de faire la différence entre réinfection et recrudescence des parasites. Elle est également utilisée pour la détection des résistances, par la mise en évidence des gènes de mutation responsables du transport (Pfmdr1, Pfcrt) et du métabolisme du médicament (dhfr, dhps). Particulièrement sensible, elle détecte un plasmodium dans 10µL de sang prélevé (Nwanyanwu *et al.*, 1997).

- **Les tests de diagnostic rapides (TDR)**

Ce sont des tests immunochromatographiques basés sur la détection d'antigènes parasitaires du sang périphérique en utilisant des anticorps mono ou polyclonaux spécifiques. Les trousses de détection prêtes à l'emploi permettent de mettre en évidence en quelques minutes la présence de *Plasmodium spp*, sans nécessiter de laboratoire, d'électricité, ou d'équipement particulier**.** La cible de la plupart des TDR est soit l'antigène HistidinRich Protéine 2 (HRP2), soit l'enzyme *plasmodium* lactate déshydrogénase (pLDH), soit l'aldolase.

- **Le microscope à fluorescence**

Le principe du test est la coloration fluorescente des acides nucléiques des parasites sanguicoles surtout les plasmodies par l'acridine orange ou le DiAmidino Phényl Indol (DiAPI). Sur la lame est fixé de l'acridine qui perce une partie du noyau des parasites et toutes les cellules nucléées sanguicoles. L'ADN des parasites est marqué par une substance qui les rend fluorescents à la lumière UV. L'observation est faite à une longueur d'onde (>515nm) supérieure à celle de l'UV (365nm).

Le Cyscope® de Partec est un microscope fluorescent innovant utilisant la lumière UV utilisant le DiAPI. Ce microscope comprend un LED ultraviolet de haute puissance (365nm) pour la détection de l'ADN**.** Par Cyscope® Malaria, une caméra est utilisée en option pour prendre des images des lames et les analyser grâce au logiciel basé sur Windows. Les résultats de ce test sont qualitatifs. La présence de petits points très

réfringents à l'UV indique un résultat positif. Le seuil de positivité est situé entre 30 et 40 parasites par µl de sang.

1.5 Traitement du paludisme

1.5.1 Paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

1.5.1.1 Définition

Le paludisme simple se définit comme suit : paludisme symptomatique (fièvre avec température axillaire ≥ 37°5 C, ou antécédent récent de fièvre) sans signes de gravité, ni de dysfonctionnement des organes vitaux, confirmé par la microscopie, le test de diagnostic rapide ou tout autre examen parasitologique (Nébié *et al*., 1994).

1.5.1.2 Objectifs thérapeutiques

L'objectif principal du traitement antipaludique est d'obtenir une guérison clinique et parasitologique rapide. L'objectif secondaire est de prévenir (i) la survenue des formes graves du paludisme, (ii) les échecs de traitements liés à une mauvaise utilisation du médicament et (iii) l'apparition d'une résistance aux antipaludiques (OMS, 2006).

1.5.1.3 Recommandations thérapeutiques

Les CTA représentent le traitement recommandé pour tous les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum.*

L'artéméther luméfantrine est le médicament de choix retenu pour le traitement du paludisme simple. Cependant, (i) en cas de non disponibilité, (ii) en cas d'intolérance et (iii) chez l'enfant de moins de six mois, on peut utiliser l'artésunate amodiaquine.

Le traitement avec l'artéméther luméfantrine se fait en deux doses journalières pendant trois jours, tandis que l'artésunate amodiaquine se prend en prise unique journalière chez l'enfant et en deux prises chez l'adolescent et l'adulte ; la dose de ces deux produits s'administre en fonction du poids et/ou l'âge du malade (PNLP, 2011)**.**

1.5.1.4 Traitement des cas particuliers

Les cas de paludisme simple chez la femme enceinte et les enfants de moins de 5 ans sont considérés comme une urgence et doivent être traités comme tels.

- **Femmes enceintes**

La politique de lutte contre le paludisme recommande (i) la quinine pour le traitement du paludisme simple ou grave au premier trimestre, (ii) les CTA et la quinine au 2ème et 3ème trimestre pour le paludisme simple et le paludisme grave (OMS, 2010 ; PNLP 2013).

1.5.1.5 Gestion des cas d'échec thérapeutique

L'échec thérapeutique est l'absence de diminution de la parasitémie et/ou la persistance des signes cliniques en dépit d'une administration correcte d'antipaludiques efficaces.

En cas de suspicion d'échec thérapeutique, les patients seront référés à l'hôpital pour recevoir le traitement adéquat. La confirmation microscopique est obligatoire (OMS, 2009 ; PNLP 2011).

1.5.2 Paludisme grave à *Plasmodium falciparum*

1.5.2.1 Définition

C'est la présence d'une ou plusieurs des manifestations cliniques ou biologiques suivantes avec une parasitémie positive à *Plasmodium falciparum* (OMS, 2005).

- **Manifestations cliniques**

Les manifestations cliniques sont essentiellement la prostration, les troubles de la conscience ou coma, la détresse respiratoire (respiration acidosique), les convulsions multiples (convulsions actuelles ou antécédants de convulsions au cours du présent épisode), le collapsus cardiovasculaire, l'Œdème pulmonaire, le saignement anormal, l'ictère, l'hémoglobinurie ou urine 'coca cola' et l'incapacité de se nourrir.

- **Manifestations biologiques**

Les manifestations cliniques sont l'anémie sévère (Hb<5 g/dl), l'hypoglycémie (glycémie <0,40 g/l), l'acidose métabolique (bicarbonates < 15 millimol/l), l'insuffisance rénale aiguë (Créatinine > 15 mg/l), l'hyperlactatémie (Lactate > 5 millimol/l), l'hémoglobinurie ou urine coca cola (bandelette positive).

1.5.2.2 Objectifs thérapeutiques

L'objectif principal du traitement en cas de paludisme grave est d'éviter le décès. L'objectif secondaire est de prévenir la survenue des séquelles surtout chez les enfants (WHO, 2006).

La prise en charge du paludisme grave se fait en hospitalisation uniquement dans les formations sanitaires de référence publiques et privés: les cliniques privées polyvalentes, les hôpitaux privés, les Hôpitaux de Zone, les Centres Hospitaliers Départementaux, Centres Hospitaliers Nationaux. Exceptionnellement, les centres de santé disposant de la capacité de transfusion, d'un plateau technique et des ressources humaines adéquates peuvent prendre en charge les cas de paludisme grave dans leur forme anémique.

Toutefois, un traitement de pré transfert et une référence bien organisée doivent être assurés dans les formations sanitaires n'ayant pas le plateau technique d'un centre de référence (PNLP, 2012).

1.5.2.3 Recommandations thérapeutiques

La prise en charge d'un cas de paludisme grave comporte, après la mise en condition:

1. le traitement d'urgence des signes de gravité et des complications (coma, convulsions, hypoglycémie, anémie sévère, etc.);
2. le traitement antipaludique spécifique;
3. le traitement de soutien (traitement adjuvant et nursing);
4. la surveillance rigoureuse des constantes vitales, de l'état de conscience et de la diurèse, etc (PNLP, 2012).

1.5.2.4 Traitement d'urgence des signes de gravité et des complications

- En cas de coma: libérer les voies aériennes supérieures, faire une restriction hydrique et assurer le nursing.
- Rechercher et corriger systématiquement l'hypoglycémie.
- Si anémie sévère: transfuser du culot globulaire ou du sang total.
- Si convulsions : diazépam en intra rectal
- Si état de mal convulsif : prendre en charge en réanimation.
- Si acidose métabolique: administrer sérum bicarbonaté 14‰.
- Si choc hypovolémique: administrer du sérum salé 9‰ ou de la dopamine10 à 15 gama/kg/mn.
- Si œdème aigu du poumon: faire une restriction hydrique et donner du furosémide2 - 4 mg/kg sans dépasser 2 g/j.
- Si hyperthermie: donner du paracétamol.
- Si insuffisance rénale: administrer de la dopamine à raison de 3 gama/kg/mn sur 24 à 48 heures et du furosémide 1 – 2 mg/kg en intraveineuse directe si bon état d'hydratation (PNLP, 2012)..

1.6 Les molécules antipaludiques

1.6.1 Classification

La classification se fait en fonction de l'origine et de la cible parasitaire**.**

- Les schizonticides

  Ils sont efficaces sur les formes intraérythrocytaires. On distingue:

  - Les antipaludiques naturels

- ✓ La quinine
- ✓ l'artémisinine

- ♦ Les antipaludiques de synthèse : ce sont les amino-4- quinoléines, les aryl-amino-alcool, les antifoliniques et les antifoliques, les antibiotiques : cyclines, macrolides, les combinaisons thérapeutiques à bases de dérivées d'artémisinine et les combinaisons thérapeutiques sans dérivés d'artémisinine.

1.7 Protocoles de prévention antipaludique

1.7.1 La prévention médicamenteuse

Le PNLP recommande la prévention médicamenteuse du paludisme seulement chez certaines catégories de personnes : la femme enceinte pour le Traitement Préventif Intermittent (TPI) et les sujets neufs.

1.7.2 La lutte anti-vectorielle intégrée et la prévention mécanique

Elle vise à rompre la chaîne de transmission du parasite entre le moustique et l'homme tout en respectant l'environnement *(PNLP, 2006).* Cette lutte passe par la protection individuelle (utilisation des MIILD), protection familiale: utilisation des rideaux imprégnés et de grillages, la protection collective (réduction et destruction des gîtes larvaires, traitement aux larvicides biologique des gîtes de moustiques) et la Pulvérisation Intra Domiciliaire (PID).

1.7.3 Prévention vaccinale

La mise au point d'un vaccin efficace constitue une voie d'avenir pour le contrôle et l'élimination du paludisme.

Plusieurs équipes de chercheurs mènent des travaux orientés sur l'identification et la synthèse d'antigènes vaccinants issus soit de sporozoïtes, soit de mérozoïtes ou de schizontes, soit de gamétocytes (Gentillini, 1993 ; Mazier **,**1991) quelques années après le premier vaccin synthétique mis au point par Manuel Elkin Patarroyo **(**Valero,1993).

Les essais cliniques d'un vaccin anti-mérozoïtes appelé MSP3 sponsorisé par African Malaria Network Trust (Amanet) se déroulent au Burkina Faso, en Tanzanie et au Mali. La phase I a été menée au Burkina-Faso chez les adultes en 2006 (Sirima SB, 2007) et chez les enfants en 2008 (Nebie I, 2008). De mai 2007 à juillet 2009, la phase II des essais cliniques d'un vaccin AMA-1/AS02A sponsorisé par le National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) s'est déroulée au Mali (Spring M D, 2009).

Depuis mai 2009, la phase III des essais cliniques d'un vaccin anti-mérozoïte appelé RTS, S/AS02 développé chez GlaxoSmithKline Biologicals en Belgique a démarré dans 11 sites

de 7 pays d'Afrique (Burkina Faso, Gabon, Ghana, Kenya, Malawi, Mozambique, Tanzanie) (Wang R, 2010). Il présente une efficacité de 50 % sur le paludisme clinique sur une durée de 8 mois, lors d'un essai de phase 2 au Kenya et en Tanzanie.

1.8 La chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques

1.8.1 Définition de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques

C'est l'aptitude d'une souche de parasite à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un antipaludique à doses thérapeutiques normale par un sujet humain (Nebie I, 2008). Cet antipaludique doit être en contact direct avec le parasite ou les érythrocytes infectés pour avoir l'effet du médicament (Bruce-Chwatt, 1986).

1.8.2 Chimiorésistance au Bénin

La résistance des plasmodies aux antipaludiques s'est accrue ces dernières années et constitue un défi dans la prise en charge du paludisme. Face à la résistance élevée à la chloroquine (35,2%) et à la sulfadoxine- pyriméthamine (22,8%) décrite au Bénin en 2002 une nouvelle politique de traitement faisant appel aux CTA a été adoptée. (PNLP, 2002).

1.8.3 Etude de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques

Le choix d'une méthode d'étude de chimiorésistance de *P. falciparum* aux antipaludiques dépend des objectifs visés (détermination du phénotype ou du génotype des souches plasmodiales de *P. falciparum* vis-à-vis des antipaludiques ou dosage sanguin d'un antipaludique) et des technologies disponibles.

1.8.3.1 Tests in vitro

En fonction des moyens de mesure de croissance cellulaire de parasites, exposés en culture à des concentrations connues d'antipaludiques. Il s'agit des :

- ✓ Tests optiques, à savoir le micro-test OMS et le semi-micro-test de Le Bras.
- ✓ Tests isotopiques regroupant le micro-test isotopique de Desjardins (Desjardins, 1979) et le semi-micro-test isotopique de Le Bras (Lebras, 1984)
- ✓ Tests colorimétriques à savoir le test de Noedl (Noedl H, 1985) ou test de Maklër (Maklër, 1993)
- ✓ Tests fluorimétriques regroupant les tests utilisant le PicoGreen (Kosaisavee 2006) ou le SybrGreen (Bennett 2004, Smilkstein 2004 et Bacon 2007).

1.8.3.2 Dosage sanguin de médicaments

Cette technique est couplée aux tests *in vivo* afin d'établir si un échec thérapeutique a bien eu lieu en présence d'un taux plasmatique adéquat d'antipaludique (May, 2003).À l'heure actuelle, la chromatographie liquide de haute performance (CLHP) est admise comme la technique de référence la plus sensible et la plus fiable parmi les différentes méthodes de dosage. (Basco, 2000).

1.8.3.3 Tests in vivo

Standardisés par l'OMS, ces tests rendent compte de la nature biologique des traitements antipaludiques. Des patients souffrant de paludisme sont sélectionnés, traités avec un antipaludique puis sont suivis sur le plan clinique et biologique durant 28 ou 42 jours selon le régime thérapeutique reçu (OMS, 2002)**.**

1.8.3.4 Techniques moléculaires

L'identification des marqueurs moléculaires de la chimiorésistance de *P. falciparum* aux antipaludiques, dans le tableau I suivant, est passée par l'identification de gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments. La relation entre les mutations et un phénotype résistant a pu être démontrée dans certains modèles, *in vitro*, par des transformations génétiques, et l'expression chez la levure des protéines correspondantes mutées.

Tableau I : Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques (Hyde, 2005)

Molécules	Gène	Mutations principales	Référence
Chloroquine	**Pfcrt** **Pfmdr1**	**K76T (causale)** **N86Y (associée)**	**(Djimde 2001)**
Amodiaquine	Pfcrt Pfmdr1	K76T N86Y	**(Holmgren 2006)**
Pyriméthamine	**Pfdhfr**	**S108N + N51I + C59R (causales)**	(Kublin 2002)
Proguanil/Cycloguanil	Pfdhfr	S108N + (A16V ou (I164L + (N51I et/ou C59R)))	
Sulfadoxine	**Pfdhps**	**A437G + K540E (causales)**	
Méfloquine, Halofantrine, Lufantrine, Quinine	Pfmdr1	N86Y et autres mutations ponctuelles (184, 1034, 1042 et 1246)	**(Price 2004)**
Méfloquine, Halofantrine, Lufantrine, Quinine	Pfmdr1	Nombre de copies du gène >1	
Atovaquone	Pfcytb	Y268S, C, N et autres mutations ponctuelles	**(Gil 2003)**
Artémisinine et dérivés	Pfatp6		

Les techniques moléculaires utilisées pour la détection des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques sont variées et parfois combinées.

a) Puce à ADN

Une puce à ADN est fabriquée par dépôt (ou synthèse) sur un support, d'oligonucléotides de séquences différentes (appelées cibles) selon un plan préétabli. Selon les techniques de fabrication, on dispose de 10^4 à 10^5 séquences par cm^2. L'incubation de cette puce avec de l'ADN, à étudier qui a été préalablement marqué, conduit à son hybridation avec les cibles correspondantes. Cette hybridation est détectée et localisée. Les profils différents d'hybridation reflètent donc des différences de séquences.

b) PCR/RFLP

Cette technique combine la PCR et la RFLP.

-PCR

La PCR classique utilise de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérases, celle de pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce.

➢ Réactifs

• Les amorces sont des oligonucléotides longs de 15 à 30 nucléotides

• L'ADN polymérase : la plus utilisée est la Taq polymérase. Cette enzyme est extraite d'une archéobactérie, *Thermus aquaticus*. Elle est thermostable et a une activité optimale entre 65 et 72°C.

• Les désoxyNucléotideTriPhosphate (dNTP) : Il en existe quatre types à savoir le désoxyAdénosineTriPhosphate (dATP), le désoxyCytosineTriPhosphate (dCTP), le désoxyGanosine Triphosphate (dGTP) et le désoxyThymidineTriPhosphate (dTTP). Leur rôle est de fournir les désoxyribonucléotides nécessaires à la synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase. La spécificité de la PCR augmente quand on diminue les concentrations de dNTP. Son augmentation conduit à des produits non spécifiques

• Le tampon de réaction (PCR Buffer) : le tampon standard pour la PCR contient 50 mM de KCl, 1,5mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris HCl (pH à 8,3). Le KCl facilite l'hybridation des amorces, le $MgCl_2$ fournit les ions Mg^{2+} qui ont une influence sur l'hybridation des amorces, la spécificité du produit d'amplification et sur l'activité et la fidélité de la Taq polymérase, le Tris-HCl régule le pH de la réaction.

➢ Etapes

▪ **La dénaturation de l'ADN:** sous l'action de la chaleur, à 94-95°C, les liaisons hydrogène liant les bases A-T et C-G sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe alors sous la forme d'un simple brin dans le milieu.

▪ **L'hybridation des amorces:** la température d'hybridation, permettant la fixation des amorces sur les monobrins d'ADN est fonction de la concentration en $MgCl_2$; de la composition en nucléotides et de la longueur des séquences des amorces. Elle est comprise entre 45°C et 65°C. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.

▪ **L'extension des amorces:** la Taq polymérase allonge chacune des amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 68-72°C.

Ces trois étapes sont répétées 20 à 40 fois selon les quantités d'ADN au départ. En pratique, le rendement est compris entre 70 et 85 % à cause d'une possible hybridation des amorces avec d'autres séquences non ciblées, d'un possible défaut d'hybridation des amorces, de la baisse de certains réactifs, de l'augmentation de la viscosité du milieu et de la baisse de l'activité de l'ADN polymérase thermostable au cours de l'amplification.

c) PCR/Séquençage

Cette technique combine la PCR et le séquençage.

Le séquençage peut s'effectuer manuellement selon la méthode de Sanger ou par l'intermédiaire d'un appareil automatisé.

Il utilise comme principe, la réaction de polymérisation de l'ADN à la différence que l'on ajoute des nucléotides modifiés fournis par des didésoxyribonucléotides (ddNTP) dans le tube. Ces nucléotides modifiés sont en moins grande concentration que les nucléotides normaux fournis par les dNTP.

L'ADN polymérase ajoute des nucléotides normaux jusqu'à l'ajout d'un nucléotide modifié qui stoppe la synthèse. On obtient donc une série de molécules d'ADN plus ou moins longues dans le tube. On sépare toutes ces molécules par électrophorèse. Chacun des ddNTP est marqué avec un fluorochrome spécifique. La lecture du gel s'effectue grâce à un détecteur à fluorescence. L'utilisation des logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire.

d) PCR en temps réel

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Il permet d'obtenir une cinétique de la réaction, donc la quantification de l'ADN. Les systèmes de détection du signal fluorescent utilisent soit des agents intercalant. (SYBR®Green), soit des sondes (Taqman, FRET, Molecular Beacons, Scorpion).

e) PCR/Southern blot

Des amplicons sont digérés par une enzyme de restriction à nombreux sites de coupure. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon, par marquage via un flux de liquide. La membrane peut alors être testée en utilisant une sonde ADN marquée avec un complément de la séquence en question.Après plusieurs lavages, la membrane est mise en contact avec un film photosensible (autoradiographie).

1.8.4 Facteurs d'apparition et d'extension des résistances

1.8.4.1 Facteurs liés à l'homme

La prémunition améliore l'efficacité thérapeutique d'un antipaludique. Les sujets « neufs » développent une immunité non spécifique contre les parasites et sont donc des réservoirs

de multiplication et de propagation des souches plasmodiales chimiorésistantes (Alene, 1996). Des facteurs humains tels que le défaut d'absorption intestinale, les vomissements, la diarrhée, les déficiences enzymatiques diminuent l'absorption médicamenteuse ou perturbent le métabolisme d'un antipaludéen normalement absorbé.

1.8.4.2 Facteurs liés au parasite

Un individu infecté par *P. falciparum* est porteur de 10^{10} à 10^{12} parasites et il a été estimé que la fréquence d'apparition des mutations est de $2{,}5\times10^{-9}$ à 3×10^{-11} par réplication parasitaire au laboratoire **(**Paget-Mcnicol, 2001). Moins le nombre de mutations requis pour la chimiorésistance est élevé, plus vite la chimiorésistance intervient (White, 1999).

1.8.4.3 Facteurs liés au vecteur et à l'environnement

Une capacité vectorielle élevée entraînerait l'expansion de la chimiorésistance car elle favorise une infestation permanente de l'hôte. Ainsi en Asie du Sud-est, la dissémination de souches de *P. falciparum* chloroquino-résistantes serait due à *Anophèles balabacensi*, très bon vecteur anthropophile et exophile (Filler, 2003). De plus certaines souches chimiorésistantes se reproduiraient plus facilement chez *Anophèles dirus* que les souches chimiosensibles (Wernsdorfer, 1994).

1.8.4.4 Facteurs liés aux antipaludiques

La fréquence et l'usage massif des antipaludiques entraînent une émergence de la chimiorésistance soit par la sélection d'individus résistants, soit par induction de mutations. En effet, plus la pression médicamenteuse est forte et constante, plus les parasites s'adaptent et se multiplient. Les antipaludiques à demi-vie longue (méfloquine 10-40 jours, sulfadoxine-pyriméthamine 95-180h) permettent de limiter le nombre de prises médicamenteuses, par conséquent d'améliorer l'observance, mais ont le désavantage de persister longtemps dans le sang à des doses sub-thérapeutiques. En zone de transmission, cette persistance augmente la pression médicamenteuse sur la population parasitaire. On assiste alors à une recrudescence, voire un envahissement de l'organisme par les souches résistantes (Hastings 2002)**.**

1.8.5 Génome du *Plasmodium falciparum*

Son ancêtre d'origine *P. reichenowi* est un parasite de chimpanzé décrit entre 1917-1920 (Reichenow 1920)**.** On ne peut distinguer ces 2 espèces morphologiquement mais elles présentent cependant une forte spécificité d'hôte. Elles auraient divergé il y a 5 à 10 millions d'années en même temps que les chimpanzés et les hominidés. *P. falciparum* est

un sporozoaire dont l'expansion mondiale aurait débuté il y a plusieurs dizaines de milliers d'années, à partir d'une petite population originelle africaine (Conway 2007 ; Xu 2007).

P. Falciparum est un eucaryote, haploïde durant la majorité de son cycle biologique, exception faite de la formation du zygote.

Le matériel génétique du *Plasmodium* comporte 3 types d'acides nucléiques : nucléaire, mitochondriale, et plastidique (Wilson, 1997). Le génome nucléaire du clone 3D7 de *P. falciparum* est composé de 22,8 Mb réparties en 14 chromosomes dont la taille varie de 0,643 à 3,29 Mb.

Ce génome est caractérisé par sa richesse en bases puriques, adénine et thymine (A+T) qui se partagent environ 90 % des régions intergéniques, télomériques et sub-télomériques et 70 à 80 % des autres régions **(**Mccutchan, 1984 ; Pollack 1982). Environ 5300 gènes ont été prédits à la suite du séquençage complet de *P falciparum* réalisé (Gardner 2002).

Ce polymorphisme entraine donc une grande variabilité génotypique et phénotypique des parasites au niveau des gènes réarrangés tels que les gènes codants pour les protéines antigéniques (CSP, MSP-1, MSP-2) et les gènes codants pour les protéines cibles des antipaludiques qui sont souvent sujets à mutation après une pression médicamenteuse.

1.8.6 Mécanismes de résistance du *Plasmodium* aux amino-4-quinoleïnes

Les mécanismes de résistance à la chloroquine ont été plus étudiés pour *Plasmodium falciparum*. La résistance de ce parasite est liée à une diminution de sa concentration au sein de la vacuole digestive du parasite induisant la présence d'une concentration en principe actif beaucoup trop faible pour bloquer le processus de détoxification de l'hème en hémozoïne. Plusieurs hypothèses ont été avancées :

- L'acquisition d'un mécanisme d'efflux rapide, phénomène de multi-drug résistance.
- La perte ou la réduction du mécanisme d'influx,
- L'augmentation du pH lysosomal, qui réduirait l'accumulation acido-tropique de la chloroquine.

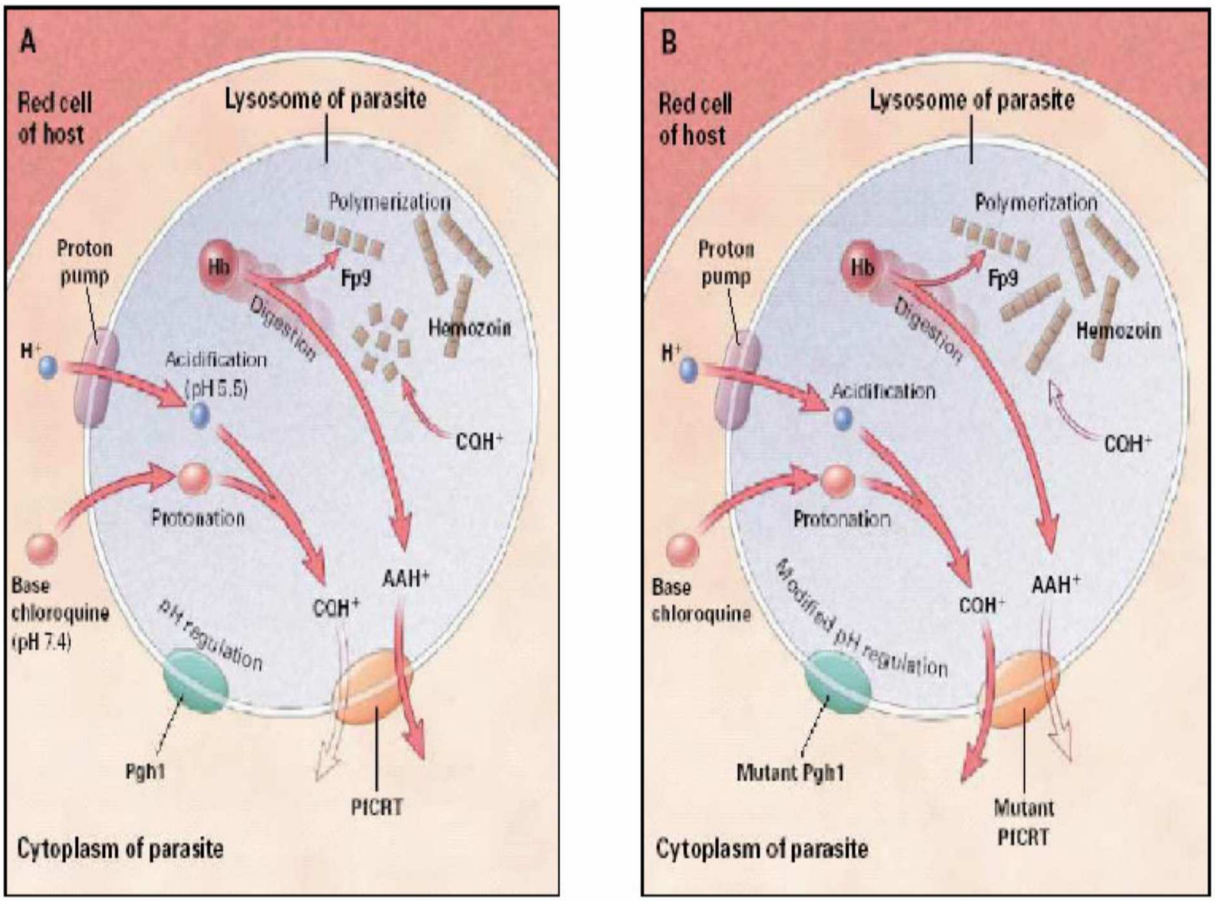
La chloroquine peut être sous forme di-protonée, et étant une base faible, elle va se répartir dans les compartiments intra et extracellulaires selon un gradient de pH. Elle va donc s'accumuler dans la vacuole digestive du parasite (pH voisin de 5,0-5,2). On estime que la concentration de chloroquine peut être 20.000 fois plus importante dans la vacuole parasitaire que dans l'érythrocyte infecté (Bardanas 2008). Cette accumulation du produit dans la vacuole du *Plasmodium* a pour conséquence d'une part, le blocage de la dégradation enzymatique de l'hémoglobine en hémozoïne par l'hème polymérase et d'autre part, la destruction de la membrane parasitaire (Wakpo, 2008). Ainsi une différence initiale de pH entre les souches sensibles et résistantes à la chloroquine pourrait

donc être l'une des explications possibles à la moindre concentration dans la vacuole parasitaire de l'antipaludique. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'efflux de la chloroquine hors de la vacuole digestive et le rôle de la protéine Crt (Chloroquine Resistant Transporter) ; en effet un canal transportant la chloroquine sous forme protonée à l'extérieur du parasite rendrait possible la plus faible accumulation de chloroquine chez les parasites résistants. La protéine Crt agit également comme un transporteur, de ce fait la mutation K76T (sur le gène pfcrt) par la perte d'une charge positive rend possible l'efflux de la chloroquine. L'implication de cette mutation dans la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine a été clairement démontrée.

D'autre part, la protéine Pgh1 P-glycoprotein homolog1 pourrait participer également à l'efflux de chloroquine hors de la vacuole digestive du parasite. Cette protéine a une structure de type canal transmembranaire. Le gène codant pour cette protéine est le gène pfmdr1 (*Plasmodium falciparum* multidrug résistant 1), un homologue de la multidrug transporteur connu dans les cellules de mammifères (Duraisingh 2005, Uhlemann 2005, Mita 2006). La Pgh1semble chez *Plasmodium falciparum* participer aux mécanismes de concentration de la chloroquine dans la vacuole digestive soit directement, soit par régulation du pH (Picot 2001).

En présence de mutations sur le gène pfcrt (K76T), la présence d'une mutation sur le codon 86 du pfmdr1 modulerait le niveau de résistance à la chloroquine.

La figure 4 ci-dessous résume le texte ci-dessus.



A-Action de la protéine Crt dans une souche sauvage. La protéine Crt participe de façon majoritaire à l'élimination des acides aminés protonés et de façon minoritaire à l'élimination de la chloroquine protonée

Action de la protéine Crt dans une souche mutée. La protéine Crt permet l'élimination massive de la chloroquine protonée.

Figure 6: Mécanismes proposés pour la chloroquino-résistance ; Implication des protéines Crt et Pgh1. (Duraisingh 2005)

1.8.7 Bases moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine

1.8.7.1 Cibles thérapeutiques : DHFR et DHPS

Les bases puriques et pyrimidiques sont nécessaires à la synthèse de l'ADN. *Plasmodium* étant incapable de synthétiser les bases puriques, il utilise celles de l'hôte. Par contre, au niveau des bases pyrimidiques, il les synthétise *de novo* parce qu'il est incapable d'utiliser l'acide folique de l'hôte. Ceci aboutit à la synthèse de dihydroptéroate grâce à l'action de la dihydropteroate synthase (DHPS), absente des cellules des mammifères, sur l'acide para-aminobenzoïque (PABA), puis à la synthèse de dihydrofolate reductase (DHFR),

véritable cofacteur dans la synthèse des pyrimidines. La DHFR et la DHPS sont les produits d'expression de gènes situés respectivement sur les chromosomes 4 et 8 du génome plasmodiale (Wu 1996, Triglia 1994).

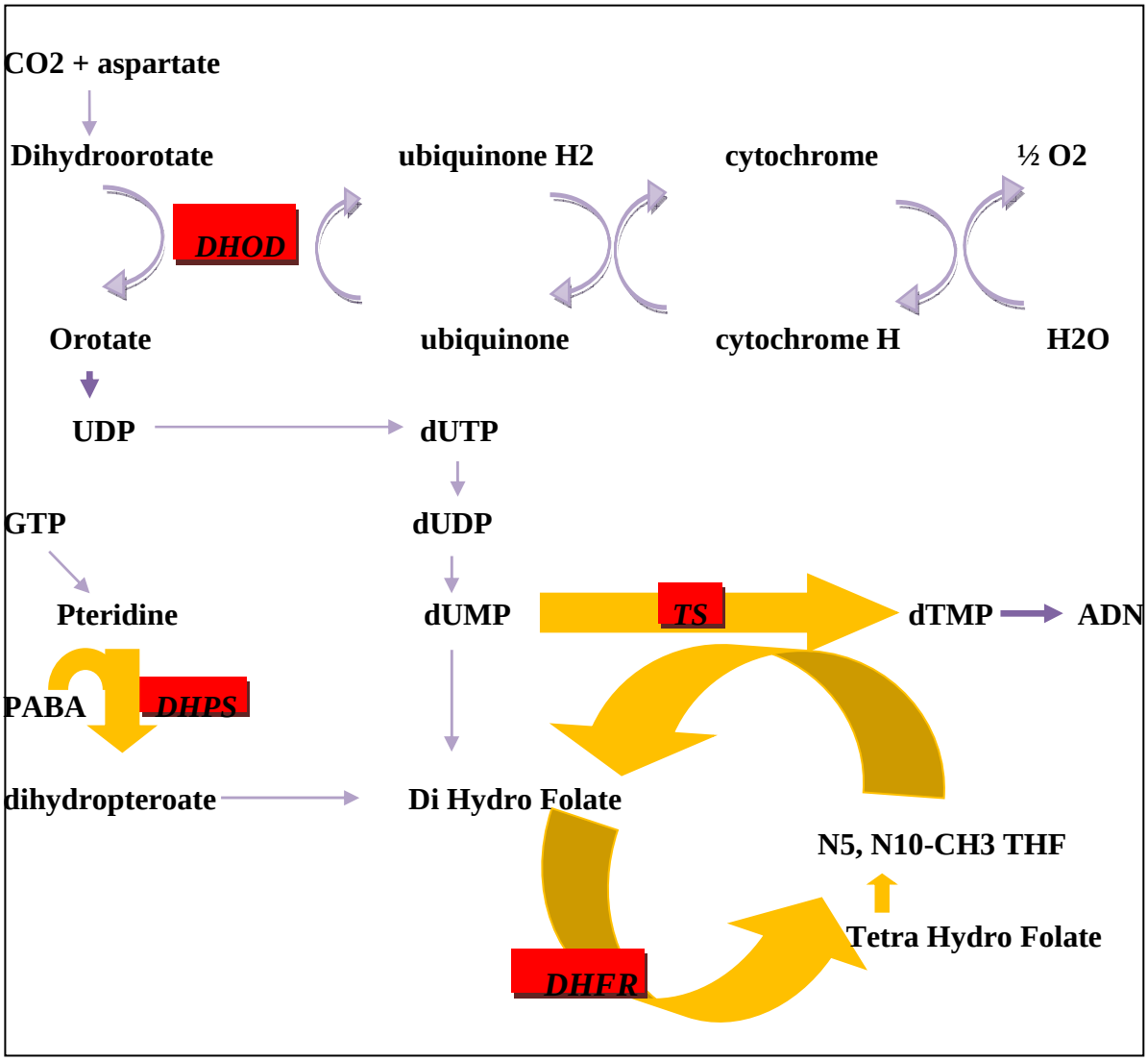


Figure 7: Voie métabolique des pyrimidines chez *P. falciparum*
Source : Lebras, 1999

1.8.7.2 Mécanisme d'action de la sulfadoxine-pyriméthamine

Le mécanisme d'action des antimétabolites est une inhibition enzymatique compétitive de la synthèse de l'ADN parasitaire. Ces deux composés agissent séquentiellement sur la même voie métabolique du parasite. La pyriméthamine, analogue structurale de la DHFR est un inhibiteur compétitif de cette enzyme tandis que la sulfadoxine, analogue structural de l'acide para-amino benzoïque (PABA) inhibe spécifiquement l'activité de la DHPS.

L'inhibition de ces enzymes parasitaires de biosynthèse de l'ADN (DHFR et DHPS) entraîne un arrêt de la multiplication des parasites.
Il y a quelques années, on pensait que les antifoliniques utilisés (pyriméthamine, cycloguanil) avaient une plus forte affinité pour le site actif de la DHFR plasmodiale que pour celui de la DHFR humaine. En réalité l'effet différentiel de l'antifolinique vis-à-vis de ces deux cibles vient du fait que la cellule humaine augmente sa synthèse de DHFR lorsque la quantité de molécules actives vient à baisser. Le parasite ne possède pas ce mécanisme de rétrocontrôle (Zhang 2002).
L'emploi simultané de ces deux composés entraine une potentialisation de leurs effets. Ainsi, la dose nécessaire de chaque composé est diminuée et les parasites sont détruits plus rapidement.

1.8.7.3 Mécanismes de résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine

Les gènes de résistance à la Sulfadoxine et à la Pyriméthamine sont bien établis, clonés et séquencés chez *P. falciparum*. Ce sont respectivement les gènes codant pour la DHPS (Pfdhps) et la DHFR.
En réalité, le gène codant pour la DHPS est bi fonctionnel (il code également pour la 7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterinpyrophosphokinase et est aussi appelé Pfdhps-pppk) ainsi que le gène codant pour la DHFR (il code également pour la thymidylate synthase et est aussi appelé Pfdhfr-ts) **(**Yuvaniyama 2003, Triglia 1998)
Les mutations ponctuelles au niveau de chaque gène sont responsables d'un changement de conformation de l'enzyme, d'une diminution de l'affinité de la molécule antipaludique et donc d'une perte de son activité. Les mutations au niveau des codons 436, 437 et 540 de Pfdhps sont responsables de la résistance à la Sulfadoxine (Kublin 2002, Triglia 1998). Au niveau du gène Pfdhfr, les mutations observées dans l'émergence de la résistance à la Pyriméthamine, sont celles observées au niveau des codons 51, 59 et 108 **(**Kublin 2002**,** Wu 1996, Peterson 1988, Cowman 1988). Plus le nombre de mutations est élevé, plus le niveau de résistance des parasites est important (Le Bras 1999, Triglia 1998, Nzila-Mounda 1998).

1.9 La gestion des déchets médicaux

1.9.1 Définition et caractérisation des déchets médicaux

Les déchets médicaux comprennent tous les déchets produits lors d'activités de soins, de diagnostic ou de prévention.75 à 90 % de ces déchets sont comparables aux déchets domestiques ou déchets urbains et ne représentent pas de danger particulier. Ces déchets

peuvent suivre la même filière de recyclage, de ramassage et de traitement que les déchets urbains de la communauté. Les autres 10 à 25 % sont appelés déchets médicaux dangereux ou déchets spéciaux. Ces déchets représentent des risques pour la sante. (Comité International de la Croix Rouge, 2011).

1.9.2 Production des déchets médicaux issus de la lutte contre le paludisme

Au niveau mondial, la production annuelle des déchets médicaux en 1995 représentait de 1,1 à 12 kg par personne dans les pays industrialisés, de 0,8 à 6 kg par personne dans les pays émergents ou en développement et de 0,5 à 3 kg par personne dans les pays les moins avancés .

Selon le rapport de l'OMS *Safe Management of Wastes from Health-Care Activities* (Yves Chartier ; Annette Pruss, WHO 1999), la production par lit de soin par pays classe l'Amérique du Nord en première position, représentant un taux de production de 7 à 10 kg par lit de soin. Celle en Europe de l'Ouest et en Amérique latine avoisine de 3 à 6 kg par lit de soin. Celle de l'Asie de l'Est, de l'Europe de l'Est ou du Moyen-Orient représente quant à elle de 1,3 à 4 kg par lit de soin.

Il y a une nouvelle catégorie de déchets produits dans le cadre des programmes spécifiques comme la lutte contre le paludisme. En effet, le diagnostic biologique et l'utilisation des MIILD à travers les campagnes de masse pour la couverture universelle génèrent une quantité importante de déchets. Pour les premières expériences de distribution de MIILD, le Ministère de la Santé ne se préoccupait guère de la gestion de ces déchets du fait de leur petite quantité. C'est à partir de la campagne MIILD de 2011 que le problème s'est véritablement posé. (Décret 2006-087 du 08 mars 2006)

Les déchets spécifiques issus des intrants de la lutte contre le paludisme sont :

- Cassettes de tests de diagnostic rapide
- Gants usés
- Vaccinostyles
- Pipettes ou anse ou gobelet inversé
- Coton souillé de sang
- Tampon souillé de sang
- Sachet contenant la cassette de TDR
- Sachet de dessicant du TDR
- les consommables périmés
- Les emballages des MIILD
- Etc.

En général, les déchets issus des tests de diagnostic rapide les autres déchets suivent le circuit habituel de gestion des déchets et sont détruits à travers les incinérateurs des centres de santé (Décret N° 2002- 484 du 15 novembre 2002).



Photo 1: Incinérateur au centre de santé de Agoué (Bénin).

Les emballages de MIILD et les médicaments périmés sont détruits par d'autres procédés avec un suivi depuis le Ministère de la Santé.

En effet, la Direction des Pharmacies, Médicaments et Explorations Diagnostiques (DPMED) procède à la destruction des médicaments périmés selon les normes en vigueur. La structure en charge de la destruction est identifiée par appel d'offre après évaluation de ses capacités techniques.

Les emballages des MIILD suivent également la même procédure. Il est procédé à la sélection d'une structure capable de procéder à la destruction des emballages suivant les normes environnementales. La destruction emballages issus des campagnes de distribution pour une couverture universelle, en particulier celles de 2011 ont été détruits par l'Organisation Non Gouvernementale (ONG) Béthesda-DCAM sur un site dans l'arrondissement de Pahou (Ouidah), suivant des normes environnementales.

Première partie
La prise en charge du paludisme

Chapitre 2
Evaluation de l'efficacité thérapeutique de artemether luméfantrine dans les cas de paludisme simple

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Conception de l'étude

Cette étude de surveillance constitue une évaluation prospective des réponses cliniques et parasitologiques au traitement du paludisme non compliqué avec observation directe du traitement *(OMS 2009)*. Les personnes atteintes de paludisme non compliqué, qui satisfont aux critères d'inclusion dans l'étude, ont été recrutées et traitées sur les sites par artemether luméfantrine, et ont fait l'objet d'une surveillance pendant 28 jours. Le suivi a consisté en une série de visites de contrôle à date fixe et en examens cliniques et tests de laboratoire correspondants. Sur la base des résultats de ces évaluations, les patients ont été classés selon qu'ils présentent un échec thérapeutique (précoce ou tardif) ou une réponse adéquate. La proportion de patients présentant un échec thérapeutique durant le suivi a servi à évaluer l'efficacité des médicaments faisant l'objet de l'étude. L'analyse par PCR était prévue pour faire la distinction entre une vraie recrudescence due à un échec thérapeutique et des épisodes de ré infestation, en cas d'échec thérapeutique précoce. Les résultats obtenus n'ont pas favorisé la réalisation du PCR.

2.1.2 Population visée par l'étude

L'étude a porté sur des patients atteints de paludisme à *P. falciparum* non compliqué, âgés de 06 mois à 14 ans, qui viennent en consultation dans les centres de santé. Les parents ou tuteurs ont donné leur consentement éclairé écrit au nom des enfants. Les enfants en âge de lire et de comprendre ont signé un formulaire d'assentiment éclairé.

2.1.3 Date et durée de l'étude

L'étude a été réalisée pendant la saison de transmission du paludisme, de juin à décembre 2011.

2.1.4 Matériels utilisés pour l'étude

Le tableau ci-dessous présente la liste des matériels utilisés dans le cadre de la présente étude

Tableau II : matériels utilisés dans le cadre de l'étude

N°	Désignation	Conditionnement	Quantité
1	Pâte à sceller	Boîte de 5	50
2	Appareil pour dosage Hémoglobine : Hémocue	Malette d'hémocue	3
3	Boites pour tests Hémocue	Boites de 100	10
5	**Papier whattman 3**	Conditionné en petits sachets pour prélèvements de sang biologie moléculaire	500
6	**Tests de diagnostic rapide du paludisme HRP2**	boite de 25	20
7	**Thermomètre**	Pour la température axillaire	100
8	**Boites à lames**	100 lames	20
9	**Lame porte-objet, bord dépoli**	Carton de 50 boîtes de 72	2
10	**Lamelle couvre-objet**	Carton de 10 boîtes de 100	5
11	**Vaccinostyle auto piquant**	Boîte de 200	50
12	**Râtelier**	Unité	20
13	**Huile à immersion**	Flacon de 200 ml	20
14	**Méthanol**	Flacon de 1 L	5
15	**Compteur manuel**	6 à 10 touches	3
16	**Minuterie**	De 60 minutes	3
17	**Ethanol**	Flacon de 1 L	20
18	**Giemsa**	Flacon de 1 L	5
19	**Gants latex**	Boîte de 100	50
20	**Coton hydrophile**	Rouleau de 500 g	10
21	**Seringue 10 cc**	lot de 10	30
22	**sérum glucosé 10%, 250 cc**	carton de 12	5
23	**Seringue 5 cc**	lot de 10	30
24	**Paracétamol 500 mg**	Boite de 1000 cp	6
25	**Quinine comprimés 300 mg**	Boite de 1000 cp	3
26	**Cathéter**	boite de 100	2
27	**Perfuseur**	boite de 10	20
28	**Quinine injectable**	Carton de 10 ampoules	30
29	**Solvant pour injection**	Carton de 10 ampoules	30
30	**Amoxicilline**	Boite de 1000 cp	3

2.1.5 Critères d'inclusion et d'exclusion des patients

a) Critères d'inclusion

Il s'agit de :

- âge compris entre 06 mois et 14 ans;
- infestation monospécifique à *P. falciparum* détectée par examen microscopique ;
- parasitémie comprise entre 2000-200000 parasites/µl (formes parasitaires asexuées) ;
- température axillaire ≥37,5°C ou température orale ou rectale ≥38°C ou antécédent de fièvre au cours des dernières 24 heures;
- capacité à prendre des médicaments par voie orale;
- possibilité et volonté de respecter le protocole pendant la durée de l'étude et de respecter le calendrier de consultations;
- consentement éclairé du patient, ou du père ou de la mère, ou du tuteur, lorsqu'il s'agit d'enfants.

b) Critères d'exclusion

Il s'agit de :

- présence de signes généraux de danger chez les enfants ou de signes de paludisme à *P.falciparum* grave selon les définitions de l'OMS;
- infestation mixte ou infestation mono spécifique par une autre espèce de *Plasmodium*, détectée par examen microscopique;
- malnutrition sévère (selon la définition, enfant dont la courbe de croissance se situe au-dessous de la courbe -3 (valeur du z), qui présente un œdème symétrique touchant au moins les deux pieds et dont le périmètre brachial à mi-hauteur est <110 mm);
- état fébrile dû à des maladies autres que le paludisme (par exemple rougeole, infection aiguë des voies respiratoires basses, maladie diarrhéique grave avec déshydratation) ou à d'autres maladies sous-jacentes chroniques ou graves connues (par exemple maladie cardiaque, rénale ou hépatique, VIH/sida) ;
- prise régulière de médicaments, qui risquerait de gêner la pharmacocinétique antipaludique ;
- antécédents d'hypersensibilité à l'un quelconque des médicaments testés ou utilisés comme traitement de remplacement, ou de contre-indication à ces médicaments.

c) Patient perdu de vue

Un patient recruté est perdu de vue lorsque, malgré tous les efforts déployés, il ne se rend pas aux consultations prévues et ne peut pas être retrouvé. Aucun résultat thérapeutique ne lui est attribué. Tout est fait pour prévoir une visite de suivi pour les patients qui ne reviennent pas au site, surtout durant l'administration du médicament visé par l'étude, mais aussi ultérieurement. Ces personnes ont été classées dans la catégorie des patients perdus de vue et les données les concernant ont été censurées ou exclues de l'étude. Les patients perdus de vue qui reviendraient au site avant le jour 28 n'ont pas été renvoyés, mais ont été encouragés à revenir pour des visites de contrôle. L'investigateur principal a décida si le patient doit être définitivement classé parmi les sujets perdus de vue en fonction de ses antécédents personnels ou s'il doit être maintenu dans l'étude.

d) Interruption de l'étude par le patient ou non-respect du protocole

Les patients remplissant l'un des critères suivants ont été classés parmi les sujets retirés de l'étude.

- Retrait du consentement. Un patient peut retirer son consentement à tout moment, en continuant néanmoins à être suivi ou traité dans le site où se déroule l'étude.
- Traitement non achevé, pour les raisons suivantes :
  - le patient présente des vomissements persistants. Un patient qui vomit les médicaments à deux reprises sera retiré de l'étude et recevra un traitement de secours ;
  - le patient ne s'est pas rendu aux consultations prévues les trois premiers jours; ou
  - des manifestations indésirables graves surviennent, qui nécessitent de mettre fin au traitement avant qu'il ne soit achevé.

  La participation d'un patient peut être interrompue si l'investigateur principal le décide en raison d'une manifestation indésirable de nature ou d'intensité appropriée. Dans ce cas, les informations sur cette manifestation et sur le traitement symptomatique doivent être notées dans le dossier individuel du patient. Si la manifestation indésirable est grave, l'investigateur principal doit le notifier immédiatement au promoteur ou à la personne désignée par ce dernier en suivant les procédures de notification décrites dans le présent protocole.

- Non-observation des dispositions relatives au recrutement:
  - paludisme grave au jour 0; ou
  - inclusion erronée d'un patient qui ne satisfait pas aux critères d'inclusion.
- Non-respect volontaire du protocole: prise d'un antipaludique (ou d'antibiotiques ayant une activité antipaludique) ou administration de ces médicaments par un tiers.
- Non-respect involontaire du protocole:
  - survenue, pendant la période du suivi, d'une maladie qui empêcherait une classification claire des résultats du traitement ;
  - détection d'une autre espèce plasmodiale au cours du suivi; ou
  - classification erronée du patient due à une erreur de laboratoire (parasitémie), qui donne lieu à l'administration d'un traitement de secours.

Les patients retirés de l'étude bénéficieront néanmoins d'un suivi jusqu'à leur rétablissement ou jusqu'à la fin de la période de suivi, si cela est possible; toutefois, aucun résultat thérapeutique ne leur sera attribué et les données les concernant seront censurées ou ils seront exclus de l'analyse. Les raisons de l'interruption ou du non-respect du protocole seront consignées dans le dossier personnel du patient.

2.1.6 Traitement des cas de paludisme

a) Traitement antipaludique

Artemether luméfantrine a été administré aux doses requises exprimées en mg base par kg de poids corporel, nombre de doses par jour et nombre de jours. La posologie exacte est déterminée à partir du tableau ci-dessous.

Tableau III : Posologie d'artemether luméfantrine 20/120 mg, (PNLP 2011)

Poids corporel (kg)	Nombre de comprimés		
	Jour 0	Jour 1	Jour 2
5-14 Kg (6 mois à 3 ans)	1comp. Matin/soir	1comp. Matin/soir	1comp. Matin/ soir
15-24 Kg (3 à 7 ans)	2comp. Matin/ soir	2comp. Matin/ soir	2comp. Matin/ soir
25-34 Kg (7 à 10 ans)	3comp. Matin/ soir	3comp. Matin/ soir	3comp. Matin/ soir
Plus de 35 Kg (10 à 12 ans)	4comp. Matin/ soir	4comp. Matin/ soir	4comp. Matin/ soir

Les comprimés d'artemether lumefantrine sont obtenus du lot des CTA acquis par le Programme National de Lutte contre le Paludisme et ses partenaires et stockés à la Centrale d'Achat des Médicaments Essentiels et consommables médicaux (CAME).

Toutes les doses de médicament ont été administrées sous la supervision d'un agent qualifié désigné par l'investigateur principal. Les patients ont été mis en observation pendant une période de 30 minutes après l'administration du médicament, dans le cas où surviendraient des réactions indésirables ou des vomissements. Tout patient présentant des vomissements durant cette période a reçu de nouveau la même dose de médicament et est resté en observation pendant 30 minutes supplémentaires. Si les vomissements recommencent, le patient est retiré de l'étude et il lui est proposé un traitement de secours.

b) Traitements et médicaments ne devant pas être utilisés pendant l'étude

Une fièvre de plus de 38°C peut être traitée avec du paracétamol. Pour les enfants de moins de cinq ans, des instructions sont données aux parents ou au tuteur sur l'enveloppement humide.

Un traitement antérieur par antipaludiques n'est pas considéré comme un critère d'exclusion. Toutefois, si, pendant la période de suivi, des infections autres que le paludisme nécessitent la prise de médicaments ayant une activité antipaludique, le patient est retiré de l'étude. Les patients auxquels il est prescrit une pommade ophtalmique à la tétracycline ne sont pas exclus. Les patients sont retirés de l'étude en cas d'automédication ou si un antipaludique ou un antibiotique ayant une activité antipaludique leur est administré par un tiers.

Les manifestations indésirables nécessitant un traitement peuvent être soignées conformément aux directives nationales. S'il existe une indication clinique pour la prescription de médicaments supplémentaires pendant la durée de l'étude, notamment un traitement pour soigner une manifestation indésirable liée aux médicaments visés par l'étude, le nom du médicament supplémentaire, sa posologie et la date et l'heure des prises doivent être notées dans le dossier individuel du patient.

L'utilisation de médicaments de phytothérapie a été évitée pendant la durée de l'étude, et les participants sont encouragés à se rendre sur le site de l'étude s'ils ne se sentent pas bien, de façon à y recevoir un traitement. Si le patient prend des médicaments de

phytothérapie au cours de l'étude, cette prise devrait être enregistrée dans le dossier du patient, sous la rubrique « Médicaments administrés ».

c) Traitement de secours

Si un patient vomit à deux reprises, il recevra un traitement parentéral par (les sels de quinine, 30mg base par kg de poids corporel par jour, en 3 trois prises par jour et durant 2 à 3 jours. Puis relais per os dès que possible) et est retiré de l'étude.

Tout patient présentant des signes de paludisme grave ou compliqué sera hospitalisé et recevra un traitement parentéral par les sels de quinine, 30mg base par kg de poids corporel par jour, en 3 trois prises par jour et durant 2 à 3 jours. Puis relais per os dès que possible et un traitement symptomatique approprié;

i) Faire un enveloppement humide en cas d'hyper pyrexie;

ii) Donner du paracétamol pour la douleur et la fièvre;

iii) Libérer les voies aériennes respiratoires en cas d'encombrements et garder le patient en position latéral de sécurité;

iv) Garder le patient en position demi assise (à 45°) et administrer de l'oxygène, un diurétique et diminuer le débit voire arrêter la perfusion en cas d'œdème aigu des poumons;

v) Faire le nursing, etc.

Si un patient répond à l'un des critères d'échec thérapeutique, il recevra les sels de quinine, 30mg base par kg de poids corporel par jour, en 3 trois prises par jour et durant 2 à 3 jours. Puis relais per os dès que possible, conformément aux recommandations nationales en vigueur. En cas de ré infestation par une autre espèce plasmodiale, le patient recevra les sels de quinine, 30mg base par kg de poids corporel par jour, en 3 trois prises par jour et durant 2 à 3 jours. Puis relais per os dès que possible, conformément aux recommandations nationales en vigueur.

2.1.7 Critères d'évaluation

Le résultat final de l'étude est la classification établie pour les patients. Les résultats finaux valables sont les suivants: échec thérapeutique, achèvement du suivi sans échec thérapeutique, patient perdu de vue, retrait de l'étude et non-respect du protocole. Le bien-être du patient devra toujours passer avant son maintien dans l'étude.

2.1.7.1 Evaluation de l'efficacité et de l'innocuité

a) Classification des résultats du traitement de patients

Les résultats du traitement sont classés sur la base de l'évaluation des résultats parasitologiques et cliniques du traitement antipaludique conformément aux lignes directrices de l'OMS *(OMS, 2005)*. Tous les patients ont donc étéclassés dans l'une des catégories suivantes: échec thérapeutique précoce (ETP), échec clinique tardif (ECT), échec parasitologique tardif (EPT) ou réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA).

Comme la guérison parasitologique est l'objectif du traitement antipaludique, tous les patients visés par l'étude qui présentent un échec thérapeutique ont reçu un traitement de secours. Le suivi s'est poursuivi jusqu'à la guérison du patient. Les résultats de ces patients n'ont pas été enregistrés de manière systématique pour les besoins de l'étude.

b) Résultats sur le plan de l'innocuité

La proportion de manifestations indésirables est enregistrée. Des questions ont été systématiquement posées aux patients à propos des symptômes antérieurs et des symptômes qui sont apparus depuis la dernière consultation de suivi. En cas d'indication clinique, une évaluation est faite et les patients ont reçu un traitement approprié. Toutes les manifestations indésirables ont été notées dans le dossier individuel du patient. Les manifestations indésirables graves sont également notifiées.

2.1.7.2 Evaluations clinique et biologique

Tous les patients ont fait l'objet d'une évaluation clinique décrite ci-après.

a) Examen médical

Un examen médical standard est réalisé au départ (jour 0 avant l'administration de la première dose) et aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28. Il est pris note des antécédents médicaux, des données démographiques et du nom des personnes à contacter lors du premier examen médical.

b) Poids corporel

Le poids corporel est enregistré au jour 0, après avoir été arrondi au kilogramme; les jeunes enfants sont pesés sur une balance Salter ou une balance suspendue. Les balances sont calibrées de manière appropriée. Les patients ne devraient pas porter trop de vêtements lors de la pesée pour ne pas surévaluer leur poids exact. Tous les jeunes enfants ont été pesés en sous-vêtements. Le poids est utilisé pour décider de l'inclusion ou de l'exclusion en fonction de l'état nutritionnel et pour calculer la dose (nombre de comprimés) à administrer. La fiabilité des balances est vérifiée avant le début de l'étude et contrôlée à intervalles réguliers.

Le périmètre brachial est mesuré, à mi-hauteur entre le coude et l'épaule, et est enregistré après avoir été arrondi au millimètre près.

Les œdèmes sont évalués par pression digitale, pendant une durée de 3 secondes, sur la surface dorsale des deux pieds.

c) Température corporelle

La température axillaire est mesurée au départ (au jour 0 avant l'administration de la première dose) et aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28. Elle est mesurée au moyen d'un thermomètre d'une précision de 0,1°C. La température est également mesurée en fonction des indications cliniques. Si le résultat est inférieur à 36°C, la mesure est répétée

La qualité de la technique de prise de température par des thermomètres est évaluée de manière régulière. Les thermomètres sont testés dans un bain-marie à température connue avant le début de l'étude et ultérieurement, à intervalles réguliers.

d) Examen sanguin au microscope

Il convient de prélever et d'analyser les gouttes épaisses et un frottis sanguin pour la numération des plasmodies lors du dépistage, au jour 0, afin de confirmer le respect des critères d'inclusion et d'exclusion. Des gouttes épaisses ont été examinées aux jours 2, 3, 7, 14, 21, 28, ou tout autre jour si le patient revient spontanément et si une réévaluation parasitologique est nécessaire. L'étiquetage des prélèvements est anonyme (numéro de dépistage ou d'étude, jour du suivi, date).

Un Giemsa frais est préparé au moins une fois par jour, voire plus souvent, selon le nombre d'étalements à traiter. Des gouttes épaisses et un frottis colorés au Giemsa sont

examinés au grossissement x 1000 pour identifier les espèces plasmodiales et la densité parasitaire.

Il est préparé trois étalements de sang par patient: deux gouttes épaisses et un frottis. On colore rapidement un étalement (Giemsa à 10% pendant 10 à 15 minutes) pour le dépistage initial, tout en conservant les autres. Si le patient est ensuite recruté, le deuxième étalement est coloré de manière plus minutieuse (Giemsa à 3% pendant 45 à 60 minutes) ; on a eu également recours à une coloration plus lente pour tous les étalements préparés lors des visites de suivi. Le numéro du patient, la date et le jour du suivi ont été notés sur la lame, soit sur le verre au moyen d'un marqueur indélébile.

La goutte épaisse du dépistage initial est utilisée pour procéder à la numération des formes asexuées de plasmodies et des globules blancs dans un nombre limité de champs microscopiques. La parasitémie adéquate aux fins du recrutement est d'au moins un parasite pour trois globules blancs, soit environ 2000 formes asexuées par microlitre.

On utilise la deuxième goutte épaisse pour calculer la densité parasitaire, en procédant à la numération des formes asexuées de plasmodies par rapport à un nombre défini de globules blancs (en général 200 ou 300) au moyen d'un compteur manuel. Dès lors qu'un champ est entamé, la numération doit être menée à son terme; il est donc rare que le nombre final de globules blancs soit exactement de 200. Si l'on dénombre plus de 500 plasmodies avant d'atteindre 200 globules blancs, la numération est interrompue après la lecture du dernier champ. On calcule la densité parasitaire, exprimée par le nombre de plasmodies asexuées par microlitre de sang, en divisant le nombre de ces formes asexuées par le nombre de globules blancs dénombrés et en multipliant ensuite le résultat par une densité de globules blancs supposée (en général 6000 par µl).

$$\text{Densité parasitaire/µl} = \frac{\text{nombre de plasmodies dénombrées x 6000}}{\text{Nombre de leucocytes dénombrés}}$$

On utilise la même technique pour procéder à la numération parasitaire sur chacun des étalements suivants. Si le nombre de formes asexuées est inférieur à 10 pour 200 globules blancs dans les gouttes épaisses de suivi, on effectuera une numération pour 500 globules blancs au moins (c'est-à-dire jusqu'à observation du champ contenant le 500e leucocyte). L'étalement sera considéré comme négatif lorsque l'examen de 1000 leucocytes ne met en

évidence aucune forme asexuée de plasmodie. La présence de gamétocytes sur un étalement réalisé au moment du recrutement ou du suivi est enregistrée.

On analyse également 100 champs de la deuxième goutte épaisse pour exclure les infestations mixtes ; en cas de doute, le frottis est examiné pour confirmation. Si l'examen de ce frottis n'est pas concluant, le patient est exclu de l'analyse après avoir reçu l'intégralité du traitement et bénéficié d'un suivi complet.

Deux techniciens de laboratoire qualifiés interprètent l'ensemble des lames de manière indépendante, et l'on calcule les densités parasitaires en faisant la moyenne des deux numérations. Les étalements présentant des résultats discordants (différences entre les résultats des deux techniciens pour le diagnostic des espèces, la densité parasitaire (>50 %) ou la présence de plasmodies) sont réexaminés par un troisième technicien indépendant et l'on détermine la densité parasitaire en faisant la moyenne des deux numérations les plus proches.

Un suivi périodique du diagnostic biologique est effectué sur le terrain par une équipe composée de biologistes provenant de l'UER parasitologie mycologie, du laboratoire National et du PNLP.

Un contrôle de qualité portant sur 10% des lames est effectué par le laboratoire de référence Parasitologie mycologie du CNHU-HKM.

e) Génotypage des plasmodies

Pour distinguer entre une recrudescence (même souche parasitaire) et une infestation nouvelle (souche parasitaire différente), un génotypage est effectué, compte tenu de la grande diversité génétique des gènes *mspl, msp2* et *glurp* du *Plasmodium (OMS, 2008).* On compare les profils génotypiques des souches avant et après la ré infestation.

Pour réduire l'inconfort que les ponctions digitales répétées peuvent causer au patient, deux ou trois gouttes de sang sont recueillies sur un papier-filtre (Wattman N°3) à l'inclusion et chaque fois que des étalements de sang sont nécessaires conformément au protocole, au jour 7 ou ultérieurement.

L'étiquetage des prélèvements est anonyme (numéro d'étude, jour du suivi, date) et ils sont conservés dans des sacs plastiques individuels avec des sachets de produit dessicatif et protégés de la lumière, de l'humidité et des températures extrêmes jusqu'à ce qu'ils sont analysés. Lorsque ces conditions ne peuvent être réunies, par exemple dans des milieux extrêmement humides où il n'y a pas d'air conditionné, on les stocke dans un réfrigérateur

ou un congélateur, et fait très attention à bien protéger les prélèvements du gel et de l'humidité. La technique de PCR utilisée est la nested PCR et la Q PCR. Le laboratoire du Centre de Lutte Intégré contre le paludisme effectue ces tests. Des paires de papier filtres sont utilisées, uniquement en cas d'échec thérapeutique, pour l'extraction de l'ADN des plasmodies et leur génotypage. Les papiers filtres inutilisés seront détruits immédiatement après l'étude.

2.1.8 Collecte et traitement des données

Les données ont été collectées grâce à des outils puis traités suivant le logiciel OMS.

a) Collecte des données

La collecte des données a été faite grâce à des fiches qui ont permis de noter les informations des patients. Il s'agit de :

- La fiche de consentement éclairé
- Fiche de suivi des patients
- Fiche de notification des effets indésirables
- Registre de laboratoire
- Registre de screening
- Résumé du suivi journalier

b) Traitement des données

Les informations collectées ont été traitées avec le logiciel Epi info et le logiciel TET28j édition 2014 de l'OMS pour le traitement et analyse des données.

2.2 Résultats

2.2.1 Description de la population d'étude

Au total, 244 enfants de 6 mois à 14 ans, atteints de fièvre et admis dans les hôpitaux de St Luc et de Bethesda ont fait l'objet d'un screening en vue de l'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité de artemether luméfantrine.
L'évaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques ayant été faite suivant le protocole de l'OMS, la taille a été mesurée tenant compte des spécificités de l'étude, comme indiqué dans la partie « matériels et méthodes ».

2.2.2 Répartitions des enfants en fonction du sexe

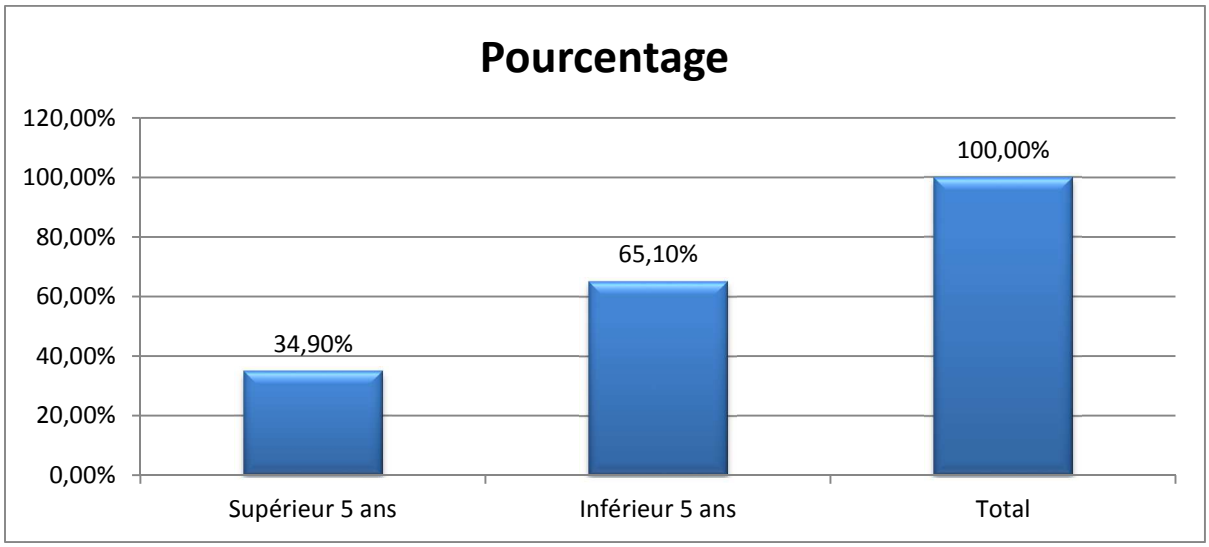
Le tableau ci-dessous montre la répartition des enfants en fonction du sexe.
Tableau IV: Répartition des enfants ayant la fièvre en fonction du sexe

Sexe	Fréquence	Pourcentage
Masculin	120	49,18%
Féminin	124	50,82%
Total	244	100,00%

51% d'enfants de sexe féminin contre 49% pour ceux de sexe masculin ont été évalués cliniquement dans le cadre de cette étude.

2.2.3 Répartitions des enfants en fonction de l'âge

Ci-dessous, le graphique indiquant les tranches d'âges ayant fait objet de l'étude



Graphique 1: Age des enfants évalués

34,9% des enfants évalués ont plus de 5 ans dans la population étudiée.
65,1% des enfants ayant eu la fièvre ont un âge compris entre 6 et 59 mois
La moyenne d'âge des enfants ayant consulté était de 4 ans (+ ou - 3 ans et demi) avec des extrêmes allant de 6 mois à 14 ans.

2.2.4 Répartitions des enfants en fonction des ethnies

Le tableau ci-dessous montre la répartition des enfants en fonction des ethnies.

Tableau V: Répartition enfants en fonction des ethnies

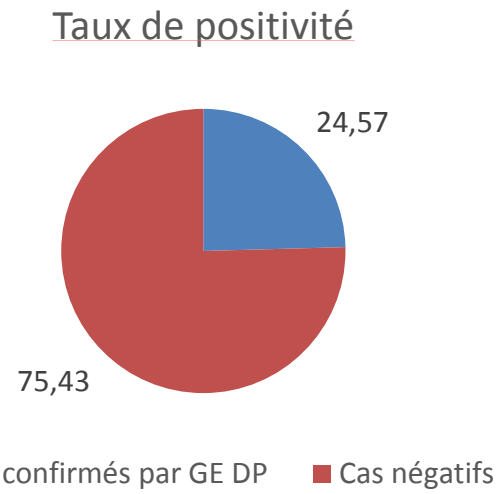
Sexe	Fréquence	Pourcentage
Fon et assimilés	124	50,8
Goun et Nago	60	24,6
Mina et adja	46	18,9
Dendi et peulhs	11	4,5
Autres	3	1,2
Total	**132**	**100,0**

Les Fons, Gouns et Nagos représentent près de 75% des cas reçus. On ne saurait dire qu'ils sont plus affectés par la maladie, mais plutôt qu'ils sont majoritaires dans la région où l'étude a été réalisée

2.2.5 Cas de paludisme

a) Taux de positivité du paludisme

Le graphique ci-dessous indique le taux de positivité du paludisme



Graphique 2: Taux de positivité du paludisme

Sur 228 cas de fièvres cliniques,

- 75,43% des cas de fièvres reçus dans les formations sanitaires n'ont pas le paludisme.
- 24,57% ont une densité parasitaire positive avec une moyenne qui s'établit à 65077 parasites par microlitres de sang.

La prévalence du paludisme dans l'échantillon est de 24,57.

2.2.6 Paludisme en fonction du sexe

Le tableau ci-dessous indique le statut en fonction du sexe

Tableau VI: Statut des individus en fonction du sexe

	Statut paludisme		
Sexe	**oui**	**non**	**TOTAL**
Masculin	14(28,0%)	100(54,9%)	114(49,1%)
Féminin	36(72,0%)	82(45,1%)	118(50,9%)
TOTAL	50(100%)	182(100,0%)	232(100,0%)

P=0,016

Parmi ceux qui ont le paludisme, 72% sont de sexe féminin et 28% sont masculins. Quant à ceux qui n'ont pas le paludisme, les pourcentages sont respectivement de 54,9% et 45,1% pour les garçons et les filles.

P=0,016 inférieur 0,05 il y a une différence significative entre la proportion d'enfants masculins et féminin ayant contacté le paludisme et ceux n'ayant pas contracté le paludisme.

2.2.7 Le statut des enfants en fonction de la classe d'âge

Ci-dessous, le statut en fonction de l'âge

Tableau VII: Statut des enfants en fonction de la classe d'âge

	Statut paludisme		
Classe	**oui**	**non**	**TOTAL**
Grand	22(47,8%)	54(31,4%)	76(34,91%)
Petit	24(52,2%)	118(68,6%)	142(65,1%)
TOTAL	46(100%)	172(100,0%)	218(100,0%)

Le nombre d'enfants de moins de 5 ans atteints du paludisme est deux fois plus élevé que ceux qui ont plus de 5 ans.

2.2.8 Apyrexie chez les patients traités par artemether luméfantrine

Le tableau ci-dessous montre la baisse de la fièvre

Tableau VIII: Baisse de la température (Apyrexie) chez les patients traités par artemether luméfantrine à Cotonou

T° à J0 > 37°5		T° J1 < 37°5		T° J2 < 37°5	
n	**%**	**n**	**%**	**N**	**%**
62	**100**	**62**	**85%**	**62**	**98%**

A J1, 85% des enfants n'ont plus la fièvre. A J2 presque la totalité n'a plus de fièvre.

2.2.9 La clairance parasitaire

Le tableau ci-dessous montre la diminution de la densité parasitaire

Tableau IX : Clairance parasitaire au bout de 48h de traitement

2000< DP< 200000		**DP J2 = 0**	
n	**%**	**n**	**%**
62	**100%**	**62**	**92**

Au bout de 48h de traitement (J2) 92% des enfants atteints du paludisme ont une densité parasitaire nulle.

2.2.10 Efficacité et innocuité de artemether lumefantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection

a) Efficacité thérapeutique de artemether luméfantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection

Les résultats se présentent comme suit :

- Pourcentage d'enfants suivi pendant 28j et pour lesquels une réponse clinique et parasitologique adéquate a été obtenue : 96,5%
- Pourcentage d'enfants suivi pendant 28j et pour lesquels un échec thérapeutique précoce a été obtenu : 3,5%
- Pourcentage d'enfants suivi pendant 28j et pour lesquels un échec parasitologique tardif a été obtenu : 0%
- Pourcentage d'enfants suivi pendant 28j et pour lesquels un échec clinique tardif a été obtenu : 0%

Le tableau ci-dessous résume les données

Tableau X: Efficacité thérapeutique de artemether lumefantrine dans un cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection

Site	n	RCPA	ETP	EPT	ECT	**TE**
Cotonou	62	96,5%	3,5%	0%	0%	**3,5%**

RCPA : Réponse clinique et parasitologique adéquate
ETP : Echec thérapeutique précoce
EPT : Echec parasitologique Tardif
ECT : Echec Clinique Tardif
TE : Taux d'echec

2.2.11 Innocuité de artemether lumefantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection

Aucun participant à l'étude n'a signalé des effets secondaires après la prise de artemetherlLumefantrine.

2.3 Discussion

Evaluation de l'efficacité thérapeutique de artemether lumefantrine

2.3.1 De l'intérêt de l'étude

L'efficacité thérapeutique de artemether luméfantrine a été évaluée. Les résultats permettront au Programme National de Lutte contre le Paludisme d'avoir une idée sur le niveau d'efficacité de l'antipaludique le plus utilisé pour la prise en charge des cas de paludisme simple au Bénin et de réviser si nécessaire la politique nationale en matière de traitement antipaludique.

Au total **244** enfants de 6 mois à 14 ans dont **50,82%** sont de sexe féminin, atteints de fièvre et admis dans les hôpitaux de St Luc et de Bethesda à Cotonou ont fait l'objet d'un screening en vue de l'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité de artemether lumefantrine. Sur les 244 ; 62 cas de paludisme confirmés ont été suivi pendant 28 jours. Sur les 62 enfants, **65,1%** des enfants ayant eu la fièvre ont un âge compris entre 6 et 59 mois. La taille de l'échantillon et les procédures sont conformes aux recommandations de l'OMS.

2.3.2 Du taux de positivité du paludisme

Sur 228 cas de fièvres cliniques reçus dans les formations sanitaires, 75,43% n'ont pas le paludisme. 24,57% ont une densité parasitaire positive avec une moyenne qui s'établit à 65077 parasites par microlitres de sang. Le taux de positivité du paludisme dans l'échantillon est de 24,57%. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans l'Enquête démographique et de santé 2011-2012**.** En effet, suivant l'EDSB, l'évaluation de la prévalence du paludisme (taux de positivité) chez les enfants de 0 à 5 ans ayant la fièvre est de 28,4% au plan national et de 22,6% pour le département du littoral (Cotonou). Ce résultat est similaire à celui obtenu lors de notre étude (EDSB, 2011-2012).

Parmi ceux qui ont le paludisme, 72% sont de sexe féminin et 28% sont masculins. Quant à ceux qui n'ont pas le paludisme, les pourcentages sont respectivement de 54,9% et 45,1% pour les garçons et les filles.

P=0,016 et est inférieur à 0,05 il y a une différence significative entre la proportion d'enfants masculins et féminins ayant contacté le paludisme et ceux ne l'ayant pas contracté.

2.3.3 De la clairance parasitaire

Une augmentation du temps de clairance parasitaire, mise en évidence par un nombre supérieur à 10 % de cas présentant des parasites détectables au 3ème jour suivant un traitement par les CTA fait suspecter la résistance (van Vugt et coll., 1998; Aubouy et coll., 2007 ; LE Bras, 1999; Wakpo, 2008; Djimde, 2010; Zhang et coll., 2009; Nsimba et coll., 2005; LE Bras et coll., 2003; Ouedraogo et coll.,1991; Tinto et coll., 2004; Chippaux et coll.,1989).

Les résultats de notre étude ont montré au bout de 48h de traitement (J2) que 92% des enfants atteints du paludisme ont une densité parasitaire nulle. Ce taux est porté à 96% à J3. Il n'y aurait donc pas de suspicion de résistance. Ces résultats sont similaires à ceux de Denon et coll, 2014 dans Comparative study of the effectiveness of combination therapies based on artémisinine in Dassa Zounme and Parakou : case of artemether luméfantrine and artésunate amodiaquine *;* où la clairance parasitaire était de 97,1% pour artemether luméfantrine et 98,4% pour artésunate amodiaquine à J2. Cette similitude a été retrouvée par Kinde-Gazard et coll en 2008, Gouissi et coll en 2012. Or, selon l'OMS, c'est une clairance parasitaire mise en évidence par un chiffre supérieur à 10% au troisième jour qui suive le traitement par les CTA qui suspecte une résistance.

De même, Kinde-Gazard en 2012, dans « Essai clinique randomisé comparant l'efficacité et la tolérance de la combinaison artemisinine - naphthoquine (Arco®) et artemether luméfantrine (Coartem®) dans le traitement du paludisme simple au Bénin » a montré que la clairance thermique est obtenue en 24 heures dans les deux groupes.

2.3.4 De l'apyrexie chez les patients traités à artemetherlLuméfantrine

La fièvre est un facteur déterminant dans la guérison des enfants. A J1, 85% des enfants n'ont plus la fièvre. A J2 presque la totalité soit 98% n'a plus de fièvre.

Ces résultats corrélés avec la clairance parasitaire indique donc qu'au bout de 2 jours de traitement, plus de 90% des enfants ont une parasitémie nulle et une diminution de fièvre de près de 98%. Ces résultats confirment bien que la fièvre est causée par la présence des parasites dans l'organisme des enfants.

2.3.5 De l'efficacité et l'innocuité

Un échec thérapeutique mis en évidence par la présence de parasites au 3ème jour et la persistance de parasites au 7ème jour ou leur recrudescence après le 7ème jour dans un

délai de 28/42 jours suite à un traitement de monothérapie orale par artémisinine, avec un taux sanguin adéquat confirme une résistance (WHO, 2008).
L'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité d'artemether luméfantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection montre que 96,5% d'enfants suivi pendant 28 jours ont obtenu une réponse clinique et parasitologique adéquate. 3,5% d'enfants suivis pendant 28jours ont obtenu un échec thérapeutique précoce. 0% d'enfants suivis pendant 28jours ont obtenu un échec parasitologique tardif et un échec clinique tardif.
Ces résultats montrent un taux d'échec thérapeutique précoce de 3,5%. Ces résultats sont similaires à ceux de Denon et coll en 2014 dans « Comparative study of the effectiveness of combination therapies based on Artémisinine in Dassa Zounme and Parakou : case of artemether luméfantrine and artésunate amodiaquine » qui ont trouvé un taux d'échec thérapeutique précoce de 1,45% et la réponse clinique et parasitologique adéquate de l'ordre de 98,55%.
Par ailleurs, Gouissi et coll, en 2012 ont obtenu un taux de réponse clinique et parasitologique adéquate de l'ordre de 97% chez les enfants de moins de 5 ans traités pour paludisme simple dans la commune des aguégués dans leur publication.

De même, Kinde Gazard et coll, en 2012 dans « Essai clinique randomisé comparant l'efficacité et la tolérance de la combinaison artémisinine-naphthoquine (Arco®) et artemether luméfantrine (Coartem®) dans le traitement du paludisme simple au Bénin » ont obtenu les résultats suivants : Cent soixante-quatorze enfants âgés de six mois à 15 ans, dont 84 dans le bras Arco® et 90 dans le bras Coartem®, ont été inclus dans l'étude. Le taux de guérison était respectivement de 98,8 % pour Arco® et de 100 % pour Coartem® à j28 sans différence statistiquement significative. La clairance thermique est obtenue en 24 heures dans les deux groupes. La clairance parasitaire quant à elle est obtenue en 48 heures pour le groupe Arco® et en 60 heures pour le groupe Coartem®. Les deux traitements étaient bien tolérés sans effets indésirables majeurs.

Au cours de cette évaluation, nous n'avons pas obtenu de cas d'échec parasitologique tardif, c'est-à-dire qu'il n'y a pas eu Présence d'une parasitémie asexuée n'importe quel jour entre J7 - J28 et température axillaire inférieure à 37,5°C, sans avoir répondu auparavant aux critères d'échec thérapeutique précoce ou d'Echec Clinique Tardif.
Cette étude n'a donc pas présenté l'opportunité de passer à la biologie moléculaire pour la différence entre recrudescence et nouvelle infestation. Pour les cas d'échec thérapeutique précoce, les dispositions cliniques ont été prises pour assurer à ces derniers une guérison totale. De même, les enfants qui ont été suivi dans le cadre de cette étude ont reçu

également d'autres médicaments, notamment des antibiotiques n'ayant pas d'effet sur le *Plasmodium falciparum* en cas de pathologies associées.

2.3.6 Innocuité d'artemether luméfantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

Aucun participant à l'étude n'a signalé des effets secondaires après la prise d'artemether luméfantrine. Ces résultats qui témoignent de l'innocuité d'artemether luméfantrine, sont semblables à ceux cités ci-dessus qui n'ont pas signalé d'effet secondaire dû à la prise d'artemether luméfantrine.

L'hypothèse (H1) suppose que la combinaison thérapeutique artemether luméfantrine, utilisée pour la prise en charge du paludisme simple au Bénin a un taux d'échec thérapeutique précoce inférieur à 10%.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer les taux de réponse clinique et parasitologique adéquate et d'échec thérapeutique d'artemether luméfantrine dans le cas de paludisme simple à Cotonou qui sont respectivement de 96,5% et de 3,5%. ***L'Hypothèse (H1) est vérifiée et l'objectif N°1 est atteint.***

Chapitre 3
Evaluation de la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et la femme enceintes

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Type et durée de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale descriptive visant à évaluer la mise en œuvre de la stratégie de la prise en charge gratuite des cas de paludisme dans les structures sanitaires publiques et assimilées retenues. Elle s'est déroulée sur une période de 12 mois avec la collecte de données en décembre 2012 et novembre 2013. Les données de 2012 et 2013 ont été comparées pour apprécier la progression.

3.1.2 Cibles de l'étude

Le suivi de la mise en œuvre de la prise en charge gratuite des cas de paludisme concerne les structures sanitaires publiques et assimilées des 12 départements du pays. Sont inclus dans ce suivi les cibles suivantes:

- ✓ **Cibles primaires**
  - Les hôpitaux nationaux;
  - Les Centres Hospitaliers Départementaux;
  - Les Hôpitaux de Zone sanitaire;
  - Les centres de santé
- ✓ **Cibles secondaires**

Dans chacune des structures retenues pour le suivi, les acteurs clés rencontrés sont :

- Le directeur de l'hôpital;
- Les responsables administratifs et financiers;
- Le médecin coordonnateur;
- Le chef poste

- ✓ **Cibles tertiaires**

Dans chaque aire de santé, les ménages résidant dans la localité et qui ont bénéficié de la prise en charge gratuite sont aussi ciblés.

3.1.3 Echantillonnage

En fonction des cibles de l'étude, la taille de l'échantillon a été déterminée de la manière suivante :

Tableau XI: Récapitulatif de la taille de l'échantillon en fonction des cibles

Cibles du suivi	Méthode d'échantillonnage	Taille de l'échantillon
Cibles primaires		**102**
Hôpitaux nationaux	Exhaustivité	2
Centres Hospitaliers Départementaux	Exhaustivité	5
Hôpitaux de Zone sanitaire	Exhaustivité	27
Centres de santé	02 par ZS	68
Cibles secondaires		**156**
Directeur de l'hôpital	Exhaustivité	27
Responsables administratifs et financiers	Exhaustivité	27
Médecin coordonnateur	Exhaustivité	34
Chef poste	02 par ZS	68
Cibles tertiaires		**170**
Ménages bénéficiaires	5 ménages par ZS	170

3.1.4 Techniques et outils de collecte des données

La collecte de données a été faite auprès de toutes les cibles de l'étude par un outil intégré appelé « fiche de suivi » qui comporte:

- une fiche de dépouillement au niveau des structures de santé;
- un guide d'entretien avec les acteurs clés;
- un guide d'entretien avec les ménages bénéficiaires

La collecte de données a été faite par une équipe de trois personnes dans chacun des douze départements. Le profil des agents de collecte de données permet d'apprécier aussi bien la qualité de la mise en œuvre de la stratégie au niveau du dispensaire/médecine-pédiatrie, de la maternité, du laboratoire et du service financier et comptable.

3.1.5 Traitement et analyse des données

Les données recueillies ont été saisies dans le tableau Excel pour le calcul des indicateurs quantitatifs. Des tableaux de fréquences simples ont été produits pour renseigner les indicateurs clés du suivi.

Les données issues des guides d'entretien ont fait l'objet d'un dépouillement manuel.

Une triangulation de l'information a été faite avant leur validation.

3.1.6 Dispositions éthiques

L'anonymat est respecté en ce concerne les données collectées à tous les niveaux; les photos prises ont été faites avec le consentement oral, libre et bien éclairé des personnes concernées.

3.2 Résultats

3.2.1 Centres de santé objet de l'évaluation

Au total 252 centres de santé ont été évalués, 95 en 2012 et 157 en 2013. Le tableau ci-dessous indique le nombre de structures visitées par année et par département.

Tableau XII: Centres de santé évalués en 2012 et 2013 par département

N°	Départements	zones sanitaires	Structures visitées en 2012	Structures visitées en 2013
1.	Mono/Couffo	4	8	20
2.	Ouemé/Plateau	5	16	25
3.	Zou/Collines	6	17	28
4.	Borgou/Alibori	7	19	31
5.	Atacora/Donga	5	14	25
6.	Atlantique/Littoral	7	21	18
	Total	**34**	**95**	**157**

3.2.2 Effectivité de la mise en œuvre de la gratuité

L'évaluation a permis de faire le point des formations sanitaires ne pratiquant pas ou ayant relâché la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes.

Le tableau suivant montre qu'en 2012 ; 35 formations sanitaires sur 95 évaluées ne pratiquaient pas la prise en charge gratuite du paludisme. En 2013 ; seulement 10 sur 157 formations sanitaires ont relâché la prise en charge gratuite du paludisme.

Le tableau suivant fait le point par départements.

Tableau XIII: Récapitulatif des formations sanitaires n'ayant pas pratiqué ou ayant relâché la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes au moment des visites

N°	Départements	Zones sanitaires	Centres de santé évalués en 2012	Proportion de CS défaillants en 2012	Centres de santé évalués en 2013	Proportion de CS défaillants en 2013
1.	Mono/Couffo	4	8	2 (25%)	20	4 (20%)
2.	Ouemé/Plateau	5	16	8 (50%)	25	3 (12%)
3.	Zou/Collines	6	17	5 (24%)	28	1 (3,6%)
4.	Borgou/Alibori	7	19	8 (42%)	31	0 (0%)
5	Atacora Donga	5	14	10 (71%)	25	1 (4%)
6.	Atlantique/ Littoral	7	21	2 (10%)	18	1 (5,5%)
	Total	**34**	**95**	**35 (37%)**	**157**	**10 (6,4%)**

3.2.3 Respect des directives de la prise en charge des cas

Les directives de prise en charge des cas de paludisme sont respectées dans les hôpitaux départementaux et hôpitaux de zone visités à l'exception de deux hôpitaux de zone, soit 6%.

Par contre, la plupart des Centres de Santé ne respectent pas ces directives bien que les documents soient envoyés dans tous les départements.

3.2.4 Disponibilité des intrants

Le tableau suivant fait le point de la disponibilité des intrants de prise en charge gratuite

Tableau XIV: Disponibilité des intrants de prise en charge gratuite en 2012

N°	Départements	Zones sanitaires	Centres de santé évalués en 2012	Proportion de CS en rupture CTA et TDR en 2012
1.	Mono/Couffo	4	8	1 (12,5%)
2.	Ouemé/Plateau	5	16	(25%)
3.	Zou/Collines	6	17	9 (47,4%)
4.	Borgou/Alibori	7	19	0 (0%)
5	Atacora Donga	5	14	5 (9,5%)
6.	Atlantique/ Littoral	7	21	0 (0%)
	Total	**34**	**95**	**19 (20%)**

Il ressort de ce tableau qu'en 2012, 20% des formations sanitaires visitées ont connu de rupture totale soit en TDR ou en CTA le jour de la visite.
Les données de 2013 sont présentées dans les tableaux ci-dessous

Tableau XV: Disponibilité CTA et TDR en 2013

Disponibilité	TDR	CTA
Oui	122(84,7%)	134(88,2%)
Non	22(15,3%)	18(11,8%)
Total	144(100,0%)	152(100%)

- ✓ 15% des centres de santé pratiquant la prise en charge gratuite ont connu de rupture en TDR
- ✓ 11,8% des centres de santé pratiquant la prise en charge gratuite ont connu de rupture en CTA

Par ailleurs, il est à noter que

- ✓ 5,5% des centres de santé ont connu de rupture en sérum glucosé 10% ;

- ✓ 20,8% des laboratoires des centres de santé ont connu de rupture en Giemsa ;
- ✓ 4% des formations sanitaires n'ont pas de paracétamol.
- ✓ 2,7% et 5,4% des formations sanitaires ne disposent respectivement pas de quinine comprimés et de quinine injectables
- ✓ 58,3% des formations sanitaires disposant d'un poste de transfusion sanguine ne disposent pas de sang au moment de l'évaluation

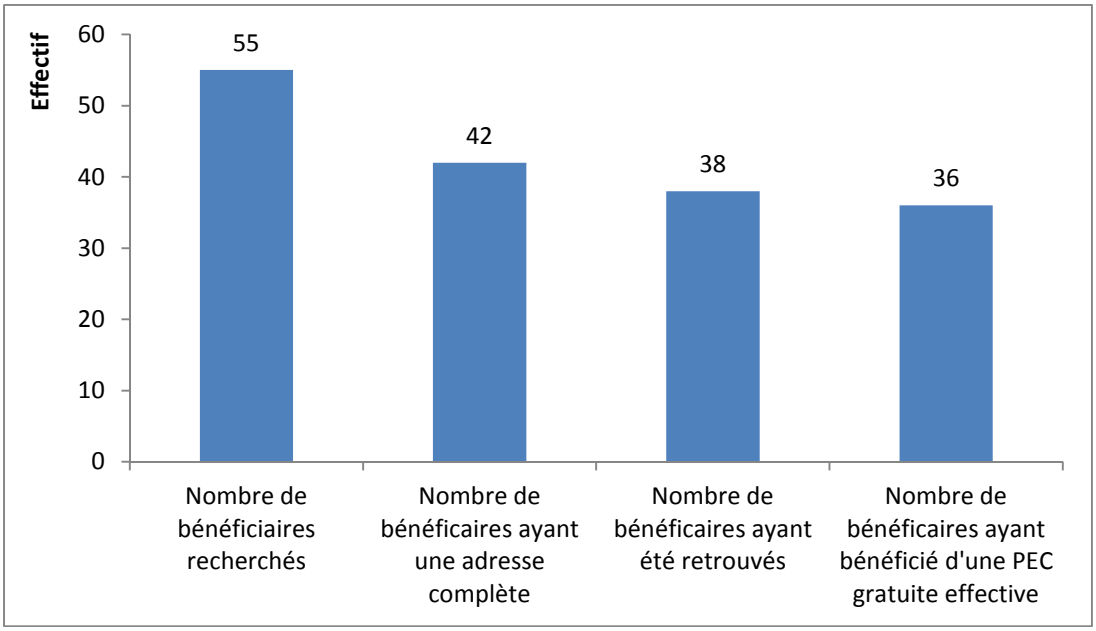
3.2.5 Effectivité de la prise en charge gratuite chez les bénéficiaires déclarés

La vérification de l'effectivité de la prise en charge gratuite des cas a été appréciée à travers des descentes sur le terrain ou des appels téléphoniques des bénéficiaires. Les résultats montrent que :

i) les adresses ne sont pas toujours complètes pour permettre de retrouver les bénéficiaires dans presque toutes les zones sanitaires (42 sur 55 bénéficiaires recherchés). Le numéro de téléphone parfois mentionné a été d'une grande utilité pour la recherche des bénéficiaires ;

ii) 94,7% des bénéficiaires retrouvés (36/38) ont affirmé avoir été pris en charge gratuitement. 5,3% (2/38) des bénéficiaires ont affirmé avoir payé pour leur soin, alors qu'ils sont facturés pour le compte de la prise en charge gratuite.

Le graphique ci-dessous fait le point des bénéficiaires



Graphique 3: Répartition des présumés bénéficiaires de soins gratuits.

3.2.6 Cas de paludisme simples et graves pris en charge gratuitement en 2012 et 2013

Ci-dessous, le point des cas pris en charge gratuitement

Tableau XVI: Cas de paludisme simple et grave pris en charge en 2012 et 2013 chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes

Cibles	Cas	2012	2013
Enfants âgés de moins de 5 ans	Paludisme simple	**48 574**	**22345**
	Paludisme grave	**9 297**	**16 438**
Femmes enceintes	Paludisme simple	**6 888**	**10 374**
	Paludisme grave	**2 507**	**1995**

Le nombre de cas simple de paludisme chez les enfants de moins de cinq ans a connu une diminution et est passé de 48574 à 22345 tandis que le nombre de cas graves a augmenté et est passé de 9297 à 16438. Par contre, chez la femme enceinte les cas simples sont passés de 6888 à 10374 et les cas graves de 2507 à 1995.

3.2.7 Remboursement des frais de prise en charge gratuite aux formations sanitaires en 2013 par l'Etat béninois

Les centres de santé ayant été remboursés par l'Etat sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVII: Pourcentage de centre de santé ayant été remboursé au moins une fois selon le département.

	Remboursement des centres de santé		
Départements	**Nombre de CS**	**% CS remboursé**	**%CS non remboursé**
Borgou	14(9,8%)	11(10,0%)	3(9,1%)
Alibori	17(11,9%)	14(12,7%)	3(9,1%)
Atacora	9(6,3%)	9(8,2%)	0(0,0%)
Donga	14(9,8%)	14(12,7%)	0(0,0%)
Zou	19(13,3%)	19(17,3%)	0(0,0%)
Collines	6(4,2%)	5(4,5%)	1(3,0%)
Mono	12(8,4%)	2(1,8%)	10(30,3%)
Couffo	13(9,1%)	5(4,5%)	8(24,2%)
Atlantique	10(7,0%)	6(5,5%)	4(12,1%)
Littoral	6(4,2%)	5(4,5%)	1(3,0%)
Ouémé	14(9,8%)	11(10,0%)	3(9,1%)
Plateau	9(6,3%)	9(8,2%)	0(0,0%)
TOTAL	143(100,0%)	110(100,0%)	33(100,0%)

Sur 143 centres de santé visités, 33 n'ont pas encore bénéficié de remboursement de frais de prise en charge gratuite lors de l'évaluation.

3.2.8 Remboursements effectués

Le tableau ci-dessous fait le point du montant des remboursements

Tableau XVIII: Montants remboursés en 2013

Montant total 2013 (FCFA)	Montant payé au 31 décembre 2013	Montant en cours de paiement	Montant engagé et Ordonnancé
612837470	322581095	61553445	228702930

Sur un montant total de 612837470 FCFA, 322581095ont été entièrement payés et le reste en cours de paiement, tous sur le financement du budget de l'Etat béninois

3.2.9 Pourcentage de centre de santé rencontrant des difficultés pour la confirmation des cas

Tableau XIX: Difficulté de confirmation des cas de paludisme

Centre de santé en difficulté	Fréquence	Pourcentage
Oui	23	16,4%
Non	117	83,6%
Total	140	100,0%

23 sur 140 centres de santé soit 16,4% ont des difficultés pour confirmer les cas de paludisme.

3.2.10 Effet de la prise en charge gratuite sur la fréquentation des centres de santé

Tableau XX: Effet de la prise en charge gratuite sur la fréquentation des centres de santé

Perception des agents sur la fréquentation	**Fréquence**	**Pourcentage**
Le taux a augmenté	102	83,6%
Le taux a diminué	4	3,3%
Le taux n'a pas varié	16	13,1%
Total	122	100,0%

102 sur 122 soit 83,6% des agents de santé pensent que la prise en charge gratuite a induit une augmentation de la fréquentation des centres de santé.

A l'issue de la présente évaluation qui s'est déroulée dans tous les départements du pays, il apparaît que la gratuité de la prise en charge des cas de paludisme est une réalité et est mise en œuvre dans la majorité des formations sanitaires. Des différents constats majeurs faits, il ressort ce qui suit :

- ✓ Des formations sanitaires appliquent effectivement et correctement la politique de la gratuité de la PEC
- ✓ Une insuffisance de suivi de proximité de la politique tant au niveau zone sanitaire qu'au niveau départemental.
- ✓ Les populations ne sont pas bien informées de la mise en œuvre de la politique de la gratuité de la PEC.

3.3 Discussions

3.3.1 Evaluation de la prise en charge gratuite du paludisme

Au total, 102 centres de santé ont été prévus par évaluation, soit 204. Au total, 252 centres de santé ont été évalués soit 95 en 2012 et 157 en 2013.

3.3.2 Effectivité de la prise en charge gratuite du paludisme

Les formations sanitaires ne pratiquant pas ou ayant relâché la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes est de 35 sur 95 évaluées en 2012 et de 10 sur 157 en 2013. On note une augmentation du nombre de centres de santé dans lesquels la prise en charge gratuite du paludisme est effective qui est passé de 35% en 2012 à 6% en 2013. Cette amélioration notée en 2013 peut s'expliquer par deux paramètres :i) l'année 2012 constituait pour les formations sanitaires la première expérience ; ii) dès la fin de l'année 2012 et au premier trimestre de 2013, le PNLP a démarré la supervision et le suivi systématique trimestriel de la prise en charge gratuite dans les formations sanitaires. Ces observations ont été notées dans les rapports du Burundi et du Sénégal qui mettent en œuvre une initiative similaire de prise en charge du paludisme.

3.3.3 De la méthodologie

La prise en charge gratuite du paludisme a été évaluée dans les centres de santé et dans la communauté, dans les trente-quatre zones sanitaires du pays. La taille de l'échantillon a été déterminée par un choix raisonné permettant de parcourir systématiquement les hôpitaux de zone et au moins un centre de santé dans les autres communes constituant la zone sanitaire. Les agents de santé et les bénéficiaires de la prise en charge gratuite du paludisme ont été questionnés.

3.3.4 Disponibilité des intrants de lutte contre le paludisme

En 2012, 20% des formations sanitaires ont connu des ruptures des intrants de lutte contre le paludisme. Par contre, en 2013, ce chiffre a varié de 4 à 11%.

On pourrait en déduire que le taux élevé de ruptures en intrants en 2012 a influencé la proportion de formations sanitaires n'ayant pas mis en œuvre la prise en charge gratuite des cas. Toutefois, le phénomène de rupture de stock dans les formations sanitaires doit être analysé minutieusement car il existe des cas de ruptures provoquées par les agents de santé eux même.

3.3.5 Effectivité de la prise en charge gratuite chez les bénéficiaires déclarés

Sur un total de 170 bénéficiaires prévus, l'équipe d'évaluation n'a pu rechercher que 55 et trouvé que 38. Cette situation s'explique par le fait que les adresses ne sont pas toujours complètes pour faciliter la recherche des bénéficiaires. Le numéro de téléphone parfois mentionné a été d'une grande utilité pour la recherche des bénéficiaires.

94,7% des bénéficiaires retrouvés (36/38) ont affirmé avoir été pris en charge gratuitement et 5,3% (2/38) des bénéficiaires ont affirmé avoir payé pour leur soin, alors qu'ils sont facturés pour le compte de la gratuité. On pourrait en déduire que malgré les difficultés rencontrées par les agents de santé, ces derniers assurent la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes.

3.3.6 Influence de la prise en charge gratuite sur la fréquentation

83,6% des agents de santé pensent que la prise en charge gratuite a induit une augmentation de la fréquentation des centres de santé. Cela s'explique par le fait que les populations ont eu l'information sur l'initiative et ont voulu en bénéficier.

L'hypothèse H2 indique que la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes est effective dans au moins 90% des formations sanitaires publiques et assimilées. Les résultats obtenus indiquent que la prise en charge gratuite du paludisme a été effective dans 65% des centres de santé en 2012 et dans 94% en 2013. L'année 2013 étant celle qui reflète le plus la situation actuelle, nous pouvons conclure que ***l'hypothèse H2 est vérifiée et que l'objectif N°2 qui est d'Evaluer la mise en œuvre de la stratégie de prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes est atteint***. En effet, la prise en charge gratuite des cas de paludisme a été évaluée dans les formations sanitaires publiques, assimilés et dans la communauté.

A l'issue de la présente évaluation qui s'est déroulée dans tous les départements du pays, il apparaît que la gratuité de la prise en charge des cas de paludisme est une réalité et est mise en œuvre dans la majorité des formations sanitaires. Néanmoins, Il importe de faire les constats majeurs suivants :

- ✓ Des formations sanitaires appliquent effectivement et correctement la politique de la gratuité de la PEC
- ✓ Une insuffisance de suivi de proximité de la mise en œuvre de la prise ne charge gratuite du paludisme tant au niveau des zones sanitaires, aux niveaux départemental et national.
- ✓ Les populations ne sont pas bien informées de la mise en œuvre de la politique de la gratuité de la PEC.

Conclusion partielle

La présente partie du document a permis d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de artemether lumefantrine dans le cas de paludisme simple, puis d'évaluer la qualité et l'effectivité de la prise en charge gratuite du paludisme dans les zones sanitaires du pays. Ces deux études ont permis de montrer également la mise en œuvre des recommandations T3 (Test Treat and Truck) de l'OMS (WHO a, 2012).

Artemether lumefantrine demeure efficace pour la prise en charge des cas de paludisme simple au Bénin et la majorité des centres de santé publique et assimilés utilisent ce médicament pour la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes.

Deuxième partie
Diagnostic Biologique du paludisme

Chapitre 4
Evaluation de la performance des TDR et du Cyscope en référence à la goutte épaisse

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Matériel d'étude.

a) Echantillons :

Ce sont des prélèvements de sang veineux faits sur Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) dans les tubes de 4ml.

b) Réactifs

- Giemsa,
- Méthanol
- Kit TDR

c) Consommables

- Tubes EDTA,
- aiguille vacutainer,
- garrot,
- alcool et coton,
- sparadrap,
- lame,
- portoirs,
- minuterie,
- lames pré-préparée et lamelle.

d) Equipements

- microscope Cyscope®,
- microscope optique

4.1.2 Méthode d'étude

a) Type d'étude

Il s'agit d'une étude prospective transversale à visée descriptive comparant trois différentes méthodes de diagnostic biologique du paludisme. Elle s'est déroulée de juin 2010 à janvier 2011.

b) Population d'étude

Il s'agit des patients adressés par les cliniciens (pour suspicion de paludisme) dans les différents laboratoires impliqués avec une prescription de GE/FS pour la recherche de *Plasmodium.*

c) Critères d'inclusion :

Sont inclus dans notre étude, les patients remplissant les critères d'inclusion suivants :

- Avoir une prescription de GE/FS.
- Consentement écrit ou oral du patient ou d'un parent pour les enfants (voir annexe1).
- Etre âgé de 6 mois au moins.

d) Critères de non inclusion :

- Tous patients qui reçoit ou a reçu un traitement contre le paludisme dans les 14 jours précédant l'étude.
- Refus ou retrait du consentement.

e) Echantillonnage

C'est un échantillonnage basé sur des patients présents les jours d'inclusion.

La taille de l'échantillon a été calculée avec la formule de Schwartz

$n=\varepsilon_\alpha^2 pq/i^2$ avec p=36% Taux de prévalence du paludisme au Bénin [3]

q= 1- p ; q =1-0,36 = 0,64 ; alpha= 5%

ε_{alpha} =1,96

i = précision désirée = 0,05 (puissance)

$$n = \frac{1{,}96 \times 1{,}96 \times 0{,}36 \times 0{,}64}{0{,}05 \times 0{,}05}$$

$$n = 354$$

La taille de l'échantillon est de 354 sujets. Des prélèvements de sang veineux étaient faits sur EDTA pour la confection de GE/FS et la réalisation des autres analyses de confirmation biologique du paludisme. Chaque patient a bénéficié de trois(3) différentes méthodes de diagnostic biologique réalisées à l'aveugle.

f) Déroulement pratique de l'enquête.

Dans la salle de prélèvement du laboratoire, les patients présentant une prescription de GE/FS sont adressés. Ces patients ont été interrogés à l'aide d'un questionnaire structuré renseignant sur l'âge, le sexe, la nationalité, l'utilisation ou non de moustiquaire imprégnée d'insecticide, l'usage ou non de la prophylaxie anti palustre (annexe2). La prise de température a été réalisée chez les enfants de moins de 5 ans. A chaque patient est attribué un numéro d'ordre d'étude correspondant, qui est le même que celui inscrit sur la fiche d'enquête, les lames et cassettes TDR, de chaque patient.

4.1.3 Réalisation des examens biologiques

a) La goutte épaisse, le frottis sanguin et la coloration

Ces examens ont été réalisés conformément aux indications contenues dans le protocole de l'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité de artemether luméfantrine.

b) Le test de diagnostic rapide

Les tubes de sang ont permis de réaliser des Tests de Diagnostic Rapide (TDR) sur les 354 échantillons selon les indications du fabricant. Le TDR spécifique de la protéine PfHRP2/pan, pLDH (HRP2 pour *P. falciparum* et pLDH pour *P. Vivax, P. Malariae et P. Ovale)* de SD BIOLINE Malaria Ag *P.f*/pan, dont le taux de positivité est entre 100 et 200 p/µl de sang a été utilisé.

La technique consiste à :

- prélever 5µl de sang à l'aide de la languette ou d'une micropipette,
- Déposer le sang dans le petit puits, en touchant légèrement le puits,
- déposer 4 gouttes du tampon de réaction dans le grand puits,
- régler la minuterie sur15 minutes,
- laisser migrer,
- Noter les résultats, et jeter la cassette dans la poubelle.

Interprétation des résultats

Résultats Positifs :

- Pour *P. falciparum*, la présence de deux bandes colorées (ligne de test pf et la ligne de contrôle C) ou de trois bandes colorées (ligne de test p.f, ligne de test pan et ligne de contrôle C) dans la fenêtre des résultats indique la présence de l'antigène spécifique de *P. falciparum* quel que soit l'ordre d'apparition des bandes.

- Pour les autres espèces de *Plasmodium* (*P. v, P. m ou P.o*) la présence de deux bandes colorées (ligne de test pan et ligne de contrôle C) dans la fenêtre des résultats indique la présence des antigènes spécifiques des autres espèces de plasmodium.
- Pour une infection mixte *; P.falciparum et P. vivax (ou P. malariae ou P. ovale*) la présence de trois bandes colorées (linge de test *P. falciparum* et pan et ligne de contrôle C) dans la fenêtre des résultats indique la présence des antigènes spécifiques de *P. falciparum* et *P. vivax* (ou *P. malariae ou P. ovale*).

Négatifs : La présence d'une seule bande colorée (ligne de contrôle) démontre que le test a été effectué correctement mais qu'il n'y a pas d'antigène de *P. falciparum* ni pan-spécifique.



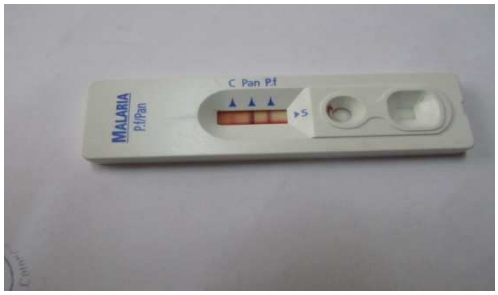


Figure 8 : Cassette d'un TDR négatif **Figure 9 :** Cassette d'un TDR positif

Non valable : Aucune des trois bandes colorées n'est visible, ou bien la présence d'une bande de test sans ligne de contrôle. Soit le test n'a pas été correctement exécuté, soit les réactifs se sont détériorés. Dans ce cas il urge de reprendre le test.

c) Le microscope à fluorescence

Avec les prélèvements de sang (tube EDTA), ce test a été réalisé sur les 354 échantillons selon la procédure décrite dans le manuel d'utilisation du Cyscope®. Les lames réalisées ont été lues à raison d'au moins 100 champs microscopiques. Ce test révèle des résultats qualitatifs. Le Cyscope® Malaria peut être connecté à une caméra numérique**.** La présence de petits points très réfringents indique que le test est positif.

Le seuil de positivité est de 30 à 40 parasites par microlitre de sang. Cependant des faux positifs peuvent être observés.

Principe

La goutte de sang est déposée sur une lame prête à l'emploi contenant le DiAmidino Phenyl Indol (DIAPI), une substance hémolysante lyophilisée qui colore et rend fluorescent l'acide nucléique contenu dans le noyau des parasites ; ce qui confirme la présence des parasites dans le sang du sujet.

Techniques de réalisation:

- prélever 10µl de sang du doigt, ou contenu dans le tube EDTA à l'aide d'une micropipette,
- déposer la goutte de sang sur la lame prête à l'emploi sur laquelle est fixée une substance hémolysante lyophilisée, le DiAmidino Phenyl Indol (DIAPI)
- réaliser un étalement du sang par inclinaison légère de la lame dans une direction,
- attendre 1mn d'incubation et recouvrir la préparation à l'aide d'une lamelle,
- placer la lame sur le support entre l'objectif du Cyscope® et la lumière UV,
- allumer légèrement la lumière ordinaire qui permet de voir les globules rouges,
- allumer la lumière UV permettant de confirmer la présence des parasites dans le sang. On peut régler l'intensité de la lumière si nécessaire,
- la lecture qualitative des lames se fait au grossissement ×40.

Analyse microscopique et interprétation des résultats

Les globules rouges ont une forme discoïdale et apparaissent comme un cercle sous la lumière translucide.

Les globules blancs apparaissent normalement plus grands que les globules rouges et moins fréquents. Ils montrent à la lumière UV, une vive fluorescence de leur noyau. De couleur blanche à la lumière bleue, les globules blancs sont facilement visibles à l'UV. Les globules rouges ne sont pas visibles à l'UV.

Le test positif (présence de parasites) est indiqué par de petits points bleus claire très réfringents. L'absence de ces derniers indique un résultat négatif (absence probable de parasites).

Plusieurs parasites pourraient parasiter un globule rouge. Au cours de l'évolution de la maladie le nombre de parasites augmente. Les plasmodies sont aisément différenciés des globules rouges de par leur petite taille.

4.1.4 Collecte des données

a) Support

Nous avons collecté les données individuelles sur une fiche préalablement établie comportant les informations relatives à chaque patient.

b) Technique de collecte

L'interrogatoire a permis d'avoir des renseignements et des informations relatifs à chaque patient. Après analyses biologiques les résultats de chaque patient sont consignés sur la fiche d'enquête.

Les GE/FS ont été lus par deux techniciens expérimentés de l'Unité d'Enseignement et de Recherche en Parasitologie du CNHU-HKM. Nous avons réalisé simultanément les TDR et l'examen au Cyscope®. Les informations inscrites sur les fiches de collecte de données ont été saisies dans le logiciel EXCEL.

c) Variables

Les fiches d'enquête contiennent les variables dépendants et indépendants.

- **<u>Variables dépendante</u>:**

Variable biologique: Présence ou non de *plasmodium spp* dans les prélèvements sanguins des patients diagnostiqués en fonction du test utilisé.

- **<u>Variables non parasitologiques</u> :**

Variables socio-démographiques et cliniques:

- Age,
- sexe,
- température (enfants<5ans),
- prévention mécanique à l'aide de la moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action (MIILD) ou pulvérisation intra domiciliaire (PID) ou utilisation des larvicides.

d) Analyse des données

Les données obtenues étaient de deux sortes :

- Les données socio-démographiques et cliniques : âge, sexe, température, usage de la moustiquaire ; prophylaxie médicamenteuse ou non.

- Les données parasitologiques : résultats des GE/FS ; résultats des TDR et du Cyscope®.

Les données socio démographiques et cliniques ont été analysées de manière descriptive afin d'avoir une description précise de la population d'étude. Quant aux données parasitologiques, elles ont été analysées de manière qualitative ou quantitative puis comparative pour répondre aux objectifs de l'étude.

Les résultats des TDR et du Cyscope® ont été évalués par rapport à la GE, utilisée comme « gold standard », puis comparés entre eux. Pour évaluer la performance des différentes techniques par rapport à la GE, nous avons calculé la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives de chaque test.

Pour le traitement informatique, un masque de saisie a été élaboré et les données saisies et analysées grâce au logiciel Epi-INFO version 3.5.1. Le test de Khi carré est utilisé pour la comparaison des proportions. Ainsi, les résultats comparés des TDR et du Cyscope® obtenus sont essentiellement sous forme de tableaux. Toutefois, quelques analyses croisées ont été faites pour mieux apprécier les variables de l'étude au sein des sous-groupes et catégories.

Tableau XXI: Récapitulatif indicatif des résultats (Harper, 1999).

	Situation de référence		
Résultats de l'investigation faite	**Test positif**	**Test négatif**	**Total**
Test positif	Vrais positif	Faux positif	VP+FP
Test négatif	Faux négatif	Vrai négatif	FN+VN
Total	Malades	Sains	Effectif total

La sensibilité, la spécificité ainsi que les valeurs prédictives positives(VPP) et négatives(VPN) ont été calculées en utilisant la GE comme méthode de référence (Harper, 1999).

La sensibilité (Se) : est le pourcentage de malades reconnus comme tels par le test (vrai positif). C'est l'aptitude à dépister les vrais positifs.

$$Se = VP / (VP+FN)$$

La spécificité (Sp) : est le pourcentage de non malades reconnus comme tels par le test (vrai négatif). C'est l'aptitude à dépister les vrais négatifs.

$$Sp= VN / (FP+VN)$$

La valeur prédictive positive (VPP) : est le pourcentage de sujets effectivement malades parmi les sujets ayant un test positif. Elle mesure la probabilité conditionnelle pour que la maladie soit présente lorsque le test est positif.

$$VPP= VP / (VP+FP)$$

La valeur prédictive négative (VPN) : est le pourcentage de sujets non malades parmi les sujets ayant un test négatif. Elle mesure la probabilité conditionnelle que la maladie soit absente lorsque le test est négatif.

$$VPN= VN / (FN+VN)$$

Sensibilité et Spécificité donnent une indication du pouvoir discriminant d'un test (pouvoir de classer correctement malades et non malades).

4.1.5 Considérations éthiques

Le protocole élaboré a été soumis au comité d'éthique de la FSS. Un consentement écrit ou oral du patient ou du parent/tuteur fut indispensable à l'inclusion.

4.1.6Limites du travail

Elles sont de trois ordres :

- prise de médicaments anti paludiques dans les 14 jours précédents l'étude,
- refus de faire partir de l'étude,
- distance éloignée entre les laboratoires,
- adaptation au microscope Cyscope® monoculaire.

4.2 Résultats

4.2.1 Caractéristiques de la population étudiée

L'échantillon est composé de 354 patients, dont les caractéristiques ont été étudiées :

a) L'âge

La répartition des patients selon l'âge est récapitulée dans le tableau ci-dessous

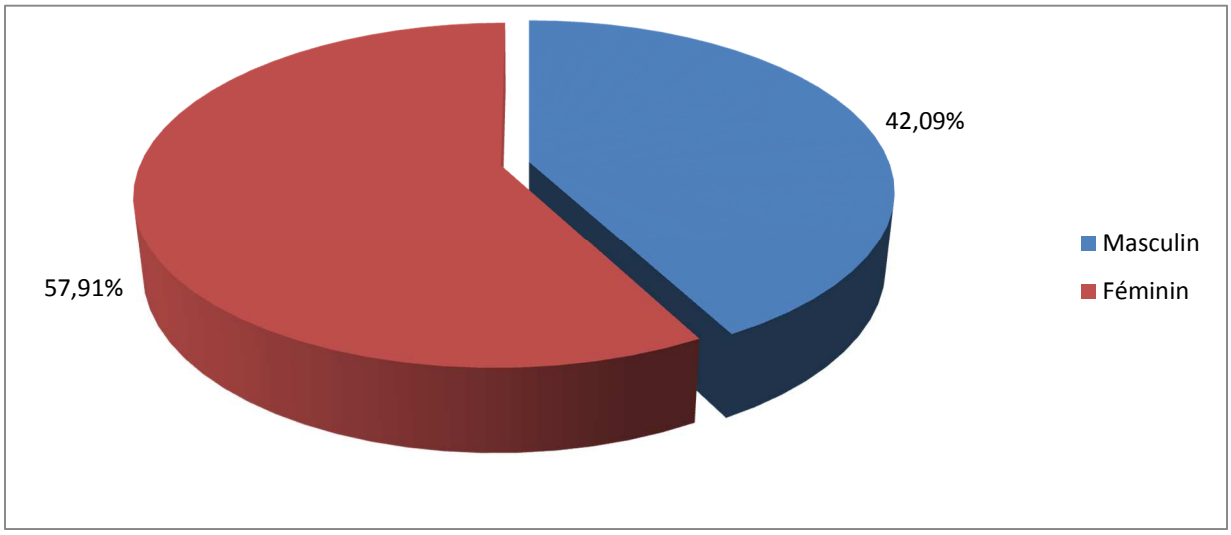
Tableau XXII: Répartition des patients selon l'âge.

Tranche d'âge	Effectif	Pourcentage (%)
6 mois-5 ans	**111**	31,36
5 – 15 ans	56	15,82
16 -35 ans	90	25,42
36 – 55 ans	70	19,77
55 – 82 ans	27	7,63
Total	354	100

Les enfants de moins de 5 ans représentent environ le tiers 31,36% (111/354) de la population d'étude. Cette tranche d'âge est suivie de celle de 16 à 35 ans.

b) Le sexe

La répartition des patients selon le sexe est indiquée dans la figure suivante

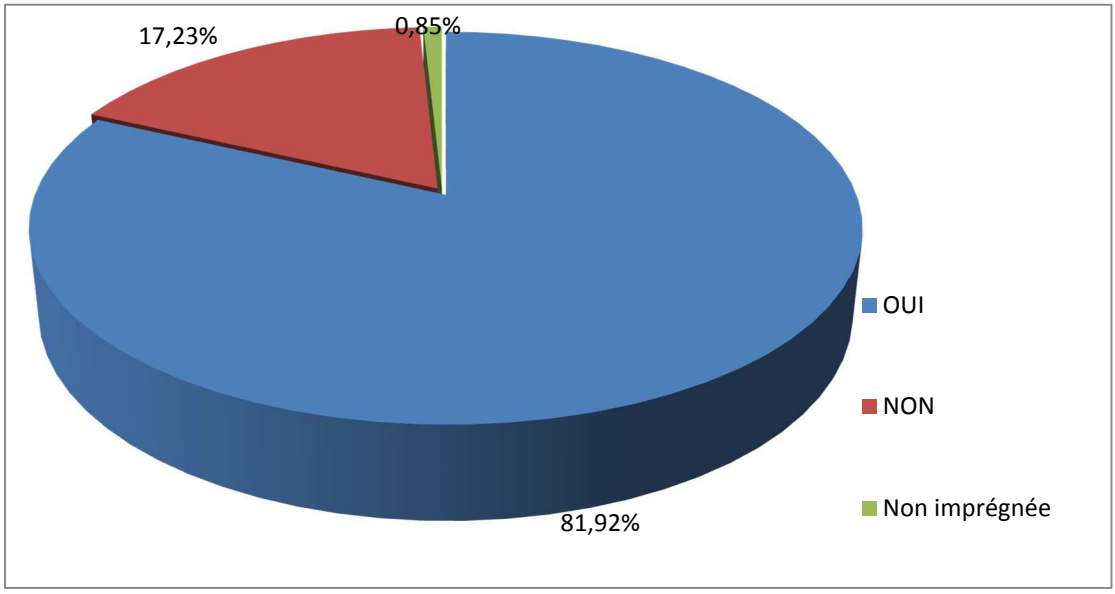


Graphique 4: Répartition des patients selon le sexe

La répartition selon le sexe montre que 57,91% (205/354) des patients étaient de sexe féminin et 42,09% (149/354) étaient de sexe masculin. Le sexe ratio était de 1,38 en faveur du sexe féminin.

4.2.3 Utilisation de la moustiquaire imprégnée

La répartition des patients selon l'utilisation de la moustiquaire imprégnée d'insecticide est mentionnée dans la figure suivante



Graphique 5 : Répartition des patients selon l'utilisation de la moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action.

Parmi les 354 patients inclus de l'étude, 290 (81,92%) ont déclaré dormir sous MIILD. Parmi les 61(17,23%) patients qui ont déclaré ne pas dormir sous moustiquaire, 20 étaient des enfants de moins de 5 ans, soit le tiers de cette population. Trois, soit 0,85% de la population ont déclaré dormir sous la moustiquaire non imprégnée.

4.2.4. Température corporelle chez les enfants de moins de 5ans

Le tableau ci-dessous indique la répartition des enfants de moins de 5 ans en fonction de la température corporelle

Tableau XXIII: Répartition des enfants de moins de 5 ans en fonction de la température corporelle

Température °C	Effectif	Pourcentage (%)
T≥37,5	**88**	79,28
T<37,5	23	20,72
Total	111	100

Parmi les enfants, 88/111 soit 79,28% ont une température supérieure ou égale à 37,5°C.

4.2.5 Caractéristiques cliniques et paracliniques des enfants de moins de 5 ans

Le tableau suivant montre le taux de positivité de la goutte épaisse en fonction de la température chez les enfants de moins de 5 ans.

Tableau XXIV: Répartition de la positivité de la GE en fonction de la température chez les enfants de moins de 5 ans

Température (°C)	GE+	GE-	Total
T≥37,5	35	**53**	88
T<37,5	2	21	23
Total	37	74	111

Chi2 7,92 ; p=0,0048 < 0,05

Il y a une différence statistiquement significative entre l'hyperthermie et la confirmation biologique du paludisme.

Sur les 37 enfants ayant une GE positive (GE+) 35 étaient fébriles. Par contre sur les 74 enfants ayant une goutte épaisse négative (GE-) 53 étaient fébriles. Le taux de confirmation biologique dans cette population était de 33,33% (37/111). Leur DP variait entre 210 et 1210000 p/µl de sang, avec une moyenne de 141.499 p/µl de sang. Par ailleurs près de la moitié avait une forte fièvre et une goutte épaisse négative.

4.2.6 Caractéristiques paracliniques des patients étudiés par rapport aux tests réalisés (GE, Cyscope®)

a) Taux de positivité de la GE, des TDR, et du Cyscope®

Le tableau suivant indique les résultats de chaque test réalisé

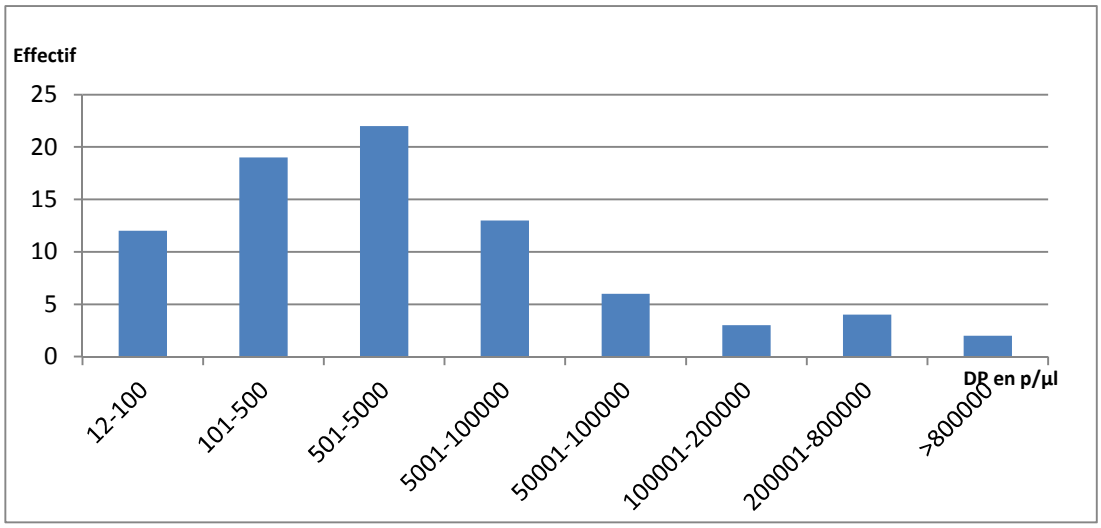
Tableau XXV: Répartition des tests réalisés en fonction des résultats

TEST	GE (p/µl sang)		Cyscope®		TDR	
Résultat	Effectif	(%)	Effectif	(%)	Effectif	(%)
Positifs	81	**22,88**	90	**25,42**	101	**27,40**
Négatifs	273	77,12	264	74,58	253	72,60
Total	354	100	354	100	354	100

A la GE, 81 échantillons ont été trouvés positifs à des parasitémie variant de 12 à 1210000 p/µl de sang, avec une moyenne de 65.820 p/µl de sang. 90 échantillons étaient positifs au Cyscope® contre 101 positifs au TDR. Quel que soit la méthode utilisée dans l'étude, les taux de positivités avoisinent 25%.

b) Densité parasitaire des patients ayant une GE positive.

La répartition des patients selon la parasitémie est présentée par le graphique ci-dessous.



Graphique 6 : Répartition des patients selon la densité parasitaire

La répartition des patients GE+ montre que 22 patients ont une densité parasitaire comprise entre 501 et 50000 p/µl de sang suivi de 19 patients qui ont une densité comprise entre 101 et 500 p/µl de sang.

4.2.7 Performances des différentes techniques utilisées (TDR et Cyscope®) par rapport à la GE.

-**Les TDR**

La GE étant le test de référence pour l'étude, les résultats des TDR discordants avec la GE sont déclarés faux positifs ou faux négatifs.

Le tableau ci-dessous montre les résultats de la GE et des TDR.

Tableau XXVI: Comparaison entre les résultats de la GE et des TDR

Résultats	GE+	GE-	Total
TDR+	72	**29**	101
TDR-	09	244	253
Total	81	273	354

Chi2 = 187,65 ; $p < 10^{-7}$; RP = 20,04 ; $IC_{95\%}$ [10,43 ; 38,52]

RP= Rapport de probabilité

Il y a une concordance significative entre les résultats de la GE et ceux des TDR. La probabilité pour qu'un sujet dépisté GE+, soit dépisté TDR-, est 20 fois plus élevée que la probabilité qu'il soit dépisté TDR-.

Les résultats croisés des deux tests montrent 72 échantillons positifs à la fois pour les deux tests et 244 négatifs, avec 29 faux positifs et 9 faux négatifs.

Cela se traduit par une sensibilité (Se) de :

$$Se = \frac{72}{72 + 9}$$

$$Se = 88{,}88\%$$

et une spécificité (Sp) de :

$$Sp = \frac{244}{244+29}$$

$$Sp = 89{,}37\%$$

Une sensibilité de 88,88% et une spécificité de 89,37% ont été observées par les TDR. La valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative étaient respectivement 71,29% et 96,44%.

- **Le Cyscope®**

Le tableau suivant montre les résultats de la GE et du Cyscope®

Tableau XXVII : Comparaison entre les résultats de la GE et du Cyscope®

Résultats	GE+	GE-	Total
CYS+	74	**16**	90
CYS-	**07**	257	264
Total	81	273	354

Chi2 = 240, 83; $p < 10^{-7;}$ RP = 31, 01; IC95% [14, 84; 64, 81]

RP= Rapport de probabilité

Il y a une concordance statistiquement significative entre les résultats obtenus par la GE et ceux obtenus par le Cyscope®. La probabilité pour qu'un sujet dépisté GE+ soit dépisté positif par le Cyscope®, est 31 fois plus élevée que la probabilité qu'il soit dépisté CYS.

Les résultats croisés des deux tests nous montrent 74 échantillons positifs à la fois pour les deux tests et 257 négatifs, avec 16 faux positifs et 7 faux négatifs. Cela se traduit par une sensibilité (Se) de :

$$Se = \frac{74}{74 + 7}$$

$$\text{Se} = 91{,}36\%$$

et une spécificité (Sp) de

$$Sp = \frac{257}{257 + 16}$$

$$Sp = 94{,}14\%$$

Une sensibilité de 91,36% et une spécificité de 94,14% ont été observées par le Cyscope®. La valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative étaient respectivement 82,22% et 97,35%.

- **TDR et Cyscope®**

Le tableau suivant indique les résultats des TDR et du Cyscope®

Tableau XXVIII : Comparaison entre les résultats des TDR et du Cyscope®.

Résultats	TDR+	TDR-	Total
CYS+	81	**9**	90
CYS-	**20**	244	264
Total	101	253	354

Chi2 = 223, 62; $p < 10^{-7;}$ RP = 11, 88; $IC_{95\%}$ [7,75 ; 18,21]

RP= Rapport de probabilité

Il y a une concordance statistiquement significative entre les résultats obtenus par TDR et ceux obtenus par Cyscope®.

La probabilité pour qu'un sujet dépisté TDR+, soit CYS+ est 11,88 fois plus élevée que la probabilité qu'il soit dépisté CYS-. La probabilité entre ces deux tests est 2 à 3 fois moins importante que celle entre l'une d'entre eux et la GE. Parmi les 101 TDR+ environ les 1/5ème étaient négatifs au Cyscope®. Par contre parmi les 253 TDR-, seul 9 étaient positifs au Cyscope®.

4.3 Discussion

4.3.1 Evaluation de la performance des TDR et du Cyscope® versus GE dans le diagnostic biologique du paludisme

Le diagnostic biologique étant la porte d'entrée du processus de prise en charge des cas de paludisme, il a été procédé à une évaluation de la performance des tests de diagnostic rapide du paludisme en comparaison avec le test microscopique à immunofluorescence Cyscope et à la goutte épaisse.

4.3.2 De la méthodologie

L'évaluation de la performance des TDR et du Cyscope versus goutte épaisse est une étude prospective transversale à visée descriptive comparant trois différentes méthodes de diagnostic biologique du paludisme. La taille de l'échantillon a été calculée avec la formule de Schwartz avec une prévalence de 36%. Elle est de 354 sujets et est supérieure à celle de Hassan et coll (Hassan, 2010) au Soudan, et de Yavo et coll (Yavo, 2002) en Côte d' Ivoire, qui avaient réalisé leurs études respectivement sur 293 et 196 patients. Sousa-Figueiredo et coll (Sousa-Figueiredo, 2010) en Ouganda ont inclus dans leur étude 1532 patients. Au Bénin, Dasseya avait réalisé en 2009 une étude qui portait sur 82 patients. Cette différence de taille est fonction des données épidémiologiques de chaque pays et des objectifs de chaque étude

4.3.3 Intérêt de l'étude

Le diagnostic biologique du paludisme prend une part importante dans la prise en charge précoce, rapide et efficace, des infections palustres à *P. falciparum* et dans l'utilisation rationnelle des antipaludiques. En effet, le recours systématique aux antipaludiques en cas de fièvre est souvent à la base du développement de la résistance du Plasmodium falciparum aux antipaludiques. L'étude a pour but de faire une évaluation de la performance des TDR, et du Cyscope® versus GE dans le diagnostic biologique du paludisme. L'utilisation des techniques de diagnostic rapide n'exigent pas de compétence particulière du point de vue de sa réalisation. Cette étude vise aussi à promouvoir les méthodes biologiques de diagnostic rapide pour les dépistages de masse des cas de paludisme simple.

4.3.4 Outil de diagnostic

Au cours de l'étude, la microscopie à fluorescence (Cyscope®) de Partec, a été utilisé comme technique; un TDR qui détecte à la fois l'antigène HRP2 et pLDH de *Plasmodium falciparum* et la Goutte Epaisse /Frottis Sanguin comme méthode de référence. Le choix a été porté sur ce type de TDR, car il faisait partie des tests utilisés par le PNLP pour le

diagnostic du paludisme dans les centres de santé périphériques du Bénin. Quant au Cyscope®, il s'agissait d'expérimenter une nouvelle méthode de diagnostic rapide du paludisme. Ces outils de diagnostic diffèrent de ceux utilisés par Yavo et al en Côte d'Ivoire. En effet, ces derniers ont comparé quatre méthodes de diagnostic biologique: la GE, le FS, la méthode QBC, et un test rapide le TDR (Parasight F), car ce sont les méthodes les plus utilisées en Côte d'Ivoire. En Ouganda, Sousa-Figueiredo et coll ont comparé trois méthodes : la GE/FS, le TDR (Paracheck-Pf) et le Cyscope®. Au Soudan, Hassan et coll ont comparé la GE/FS et le Cyscope® afin d'expérimenter le Cyscope®. La GE/FS a été utilisée comme méthode de référence dans tous ces pays suivant la recommandation de l'OMS (OMS 2008). Seule l'étude réalisée au Bénin en 2009 par Dasseya en 2009 comparait trois méthodes de diagnostic: la GE, le TDR et la PCR comme méthode de référence.

4.3.5 Des caractéristiques paracliniques

a) La goutte épaisse (GE)

Dans l'étude, le taux de portage des formes asexuées à la GE était de 22,88% (81/354) et la Densité Parasitaire moyenne de 65820 p/µl de sang.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par plusieurs auteurs notamment au Bénin, où Dasseya avait obtenu une GE: 19,05% et au Soudan où Hassan et al avaient obtenu: GE/FS 19,5%.

En Côte d'Ivoire Yavo et al ont obtenu pour la GE 18,30%. Les taux de portage des trophozoïtes étaient relativement faibles pour des cas présumés du paludisme.

37 enfants de moins de 5ans sur 111 faisant la fièvre ont été confirmés positifs pour le diagnostic du paludisme par la GE avec une DP moyenne de 141.499 p/µl de sang. Il y a donc une différence statistiquement significative, entre le nombre de cas de présomption du paludisme et la confirmation biologique. Nous en déduisons que toute fièvre ne doit pas systématiquement être assimilée au paludisme même si le Bénin est une zone d'endémie. Les deux enfants asymptomatiques GE positives avaient une DP de 180 et 5560 p/µl de sang. Il peut s'agir des enfants qui ont une forte immunité parasitaire ou sous traitement. Le recours au diagnostic biologique éviterait à 60,23% (53/111) des enfants fébriles, le traitement présomptif du paludisme. Cette pratique est à la base des résistances aux antipaludiques.

Les faibles taux de portage pourraient être liés à l'effet des antipaludiques sur la parasitémie des patients traités pour paludisme les 15 jours précédant les examens biologiques.

Par contre, le taux élevé de portage (47,90%) en Ouganda s'expliquerait par le fait que cette étude avait inclus beaucoup de sujets vulnérables. Ces faibles taux pourraient être liés à une meilleure observation des mesures de lutte contre cette maladie.

b) De la performance des TDR et du Cyscope® par rapport à la GE:

Les faibles taux de positivité obtenus avec les TDR et le Cyscope® semblent être liés à leur sensibilité par rapport à la technique de référence et à la DP minimale à la GE. Dans l'étude, la DP minimale était de 12 parasites/µl de sang. Ces taux sont similaires à ceux obtenus au Soudan et en Côte d'Ivoire. Par contre en Ouganda les taux de positivité étaient très élevés certainement à cause de la DP minimale élevée: Cyscope® (77,25%) et TDR 46,05% (Paracheck -Pf). Ces taux élevés de portage de trophozoïtes s'expliqueraient par le fait que cette étude a inclue beaucoup de patients vulnérables. Par ailleurs, ces sujets résidaient pour la plupart dans les régions du Lac Albert et du Lac Victoria, zone hyper endémique.

La baisse de sensibilité observée avec le TDR et le Cyscope® par rapport à la GE peut s'expliquer, par le seuil de détection des différentes techniques (TDR:100-200 parasites/µl, Cyscope®:30-40 parasites/µl et GE:10-20 parasites/µl) ou par les conditions de stockage et de conservation des TDR et des réactifs. Les travaux de Hassan et coll au Soudan et ceux de Sousa-Figueiredo et coll en Ouganda avaient révélé respectivement pour le Cyscope® les sensibilités de 98,20% et 89,40% et les spécificités de 98,3% et 33,70%. Les VPP et VPN obtenues par ces auteurs étaient respectivement de 93,30% et 99,60% puis 54,95% et 73,65% au Soudan et en Ouganda.

Une variable de confusion potentielle pourrait être une co-infection avec la schistosomose (Sousa-Figueiredo JC, 2010). Des discordances inter-laboratoires entre les résultats de la GE (référence) existeraient, comme l'a décrit Wongsrichanalai et coll en 2006. Presque toutes les lames positives de l'étude par la GE ont été *Plasmodium falciparum*. Cela avait été déjà démontré, que le *.falciparum* est de loin l'espèce la plus dominante à Cotonou (Kinde-Gazard, 2000).

Les cassettes des TDR ayant montré 3 bandes justifient que ce type de TDR détecte les antigènes des parasites non *P. falciparum*.

c) Les Tests de Diagnostic Rapide

En ce qui concerne les TDR, différents auteurs ont montré que la sensibilité des TDR diminue si la densité parasitaire baisse et augmente quand cette dernière augmente. Le niveau de sensibilité est de 95% à une DP de 100p/µl de sang (WHO, 2007). Ce qui justifie les faux négatifs obtenus. De plus, ils ont montré que les antigènes sont facilement

détectés lorsque la parasitémie est élevée et que la sensibilité et la spécificité du TDR étaient meilleures chez les sujets ayant une faible immunité concomitante (Wongsrichanala 2007 ; Forney JR, 2007). Notre étude note une bonne concordance entre les résultats de la GE et des TDR utilisés qui sont crédités d'une sensibilité évaluée à 88,88% et d'une spécificité de 89,37%.

Ce type de TDR permet de diagnostiquer une infection mixte à *plasmodium spp*. Ces résultats diffèrent de ceux de Yavo et al en Côte d'Ivoire (Yavo W, 2002) qui ont utilisé le TDR parasight (HRP2) avec une sensibilité de 100% et spécificité de 88,10%. Sousa-Figueiredo et al en Ouganda ont trouvé avec le TDR paracheck-*P.f* (HRP2) une sensibilité de 95,15% et une spécificité de 97,15%. Les valeurs observées par ces deux auteurs sont dues au fait que, dans leurs études les DP minimales à la GE étaient comprises entre 100 et150p/µl de sang.

Une détérioration des TDR due à une mauvaise conservation n'est pas exclue, car deux de nos échantillons faux négatifs avaient une DP de 240 p/µl. En effet, les températures optimales de conservation des TDR doivent se situer entre 4 et 30°C et l'humidité ne doit pas être supérieure à 70% (Fernando SD, 2004). Les TDR (HRP2, pLDH) utilisés doivent être conservés entre 1°C et 40°C selon les indications du fabricant. Les autres faux négatifs étaient des échantillons dont la parasitémie était très faible à la goutte épaisse.

Par contre, les résultats faux positifs par le TDR pouvaient s'expliquer par ce test qui détecte l'Ag HRP2. En effet, cet antigène persiste dans le sang deux semaines après la guérison. Ce qui explique que le TDR soit positif alors que la GE est négative. Le taux élevé de faux positifs avec ce test serait dus à la persistance dans l'organisme de l'antigène HRP2 malgré l'absence de trophozoïtes. Par ailleurs, Humar et al avaient détecté les antigènes circulants chez 68% des patients, 7 jours après le début du traitement et, dans 27% des cas, 28 jours après. Toujours pour expliquer les résultats faux positifs, l'hypothèse de l'implication de facteurs rhumatoïdes (IgM) ne serait pas à exclure, puisque l'immunoglobuline monoclonale fixée dans le puit de ce TDR est une IgG. Ce risque d'erreur est très variable selon le contexte (Bartoloni A, 1998; Mishra B, 1999) Il n'existerait pas avec ICT Malaria Pf® puisque l'immunoglobuline monoclonale utilisée est une IgM.

Des faux positifs ont été également observés dans des cas de syndromes inflammatoires, de phlébites ou d'hépatites virales (Bernier-Princhart MP, 2000).

Une attention particulière doit donc être accordée aux conditions de stockage et de transport de TDR, à la formation, à son utilisation afin de maximiser les performances de ces tests pour atteindre le seuil de 95% recommandé par l'OMS.

Le personnel de santé doit être informé de la possibilité des résultats faux positifs qui n'affectent en rien la qualité des TDR. D'autres études devraient être initiées, pour évaluer les conditions de stockage et de transport des TDR dans les formations sanitaires et dépôts. La rapidité et la fiabilité d'exécution, l'accessibilité financière des TDR, gratuits en général dans nos contrées restent suffisamment efficientes par rapport à la GE dont le coût pratiqué dans les formations sanitaires du pays parait élevé pour les patients.

d) Le Cyscope®

Concernant le Cyscope, les résultats obtenus présentent une bonne concordance et une bonne sensibilité (91,36%) par rapport à la goutte épaisse (référence). Cette sensibilité est plus élevée que celle des TDR utilisés, conformément au seuil de détection de chaque technique. La sensibilité, et la spécificité obtenues avec le Cyscope® s'expliquent par le nombre de faux positifs et de faux négatifs obtenus par rapport à la goutte épaisse. Dans l'étude, certaines lames ayant une faible parasitémie étaient négatives (faux négatifs) par le Cyscope® compte tenue du seuil, ce qui explique que les DP inferieurs à 30 p/µl ne sont pas détectées par la fluorescence. En outre, le test au Cyscope® utilise l'Acridine Orange qui colore les acides nucléiques notamment des autres parasites sanguicoles (Ambroise-Thomas P, 1965). Ainsi, les résultats faux positifs pourraient s'expliquer par la présence de plusieurs types de parasites dans le sang. De même, la présence de certaines molécules fluorescentes circulant dans le sang au cours d'un traitement n'est pas exclue.

En plus, les particules de poussières, une bactériémie transitoire ou bactéries/levures dans la zone de piqûre peuvent être confondues avec une infection palustre. D'où la nécessité de nettoyer soigneusement la partie à piquer avant le prélèvement sanguin.

Le plus probable est que, les lames préparées et laissées à la température ambiante pendant quelques heures pourraient conduire à la dégradation rapide des globules blancs pouvant être confondus au *plasmodium*. En effet contrairement aux lames de GE/FS, les lames du Cyscope® malaria de Partec ne peuvent être conservées.

La sensibilité obtenue dans l'étude est plus faible que celle trouvée au Soudan (98,20%) et un peu plus élevée que celle de l'Ouganda (89,40%).

L'utilisation de la fluorescence dans le diagnostic du paludisme révèle une simplicité de réalisation et de lecture surtout lorsque le nombre de parasites comptés par microlitre est supérieur à 10 (DP>300p/µl). Cet appareil dispose d'une autonomie fonctionnelle de plus 24heures, d'où son utilité en zone rurale où l'électricité est inexistante. Elle possède cependant des limites à savoir l'impossibilité de calculer la densité parasitaire et de faire le diagnostic de l'espèce.

La discordance observée entre les résultats des TDR et du Cyscope® s'explique par le fait que les TDR détectent les antigènes des parasites alors que le Cyscope® ne détecte que les parasites de *plasmodium.*

En dépit des progrès fort rapides en biologie moléculaire, la goutte épaisse demeure pour l'OMS un examen diagnostic de routine et de référence.

Les difficultés qui se posent dans la réalisation d'une bonne goutte épaisse sont identifiées: la goutte épaisse est opérateur dépendant, la difficulté de lecture en cas de polyparasitémie, le non-respect de la procédure de réalisation de l'examen depuis la confection de la lame jusqu'à la coloration et l'inexistence d'électricité dans les zones rurales. La goutte épaisse couplée au FS peut utilement compléter le TDR ou le Cyscope® en particulier pour identifier l'espèce plasmodiale et calculer la DP. Les tests rapides du paludisme (TDR, Cyscope®) rendent le diagnostic accessible aux cliniciens. Pour augmenter son impact sur les traitements antipaludiques, elles doivent être disponibles en permanence dans les zones sanitaires, et conservés dans de bonnes conditions.

Ces techniques de diagnostic rapide ont l'avantage d'être simples, rapides et fiables. Leur utilisation ne nécessite pas d'investissements en équipements lourds, ni une source d'électricité. Ils ne nécessitent qu'un minimum de formation. Ce qui permettra de mettre à la disposition des populations et des agents de santé un outil de diagnostic accessible, rapide, fiable et de bonne qualité.

La goutte épaisse et le test au microscope à immunofluorescence Cyscope® sont plus sensibles que les tests de diagnostic rapide, donc l'hypothèse H3 est vérifiée et l'objectif N°3 est atteint.

Chapitre 5
Evaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum*

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Cadre d'étude

Les sites de collecte sont constitués d'écoles primaires publiques et des hôpitaux Saint Luc et Béthesda situés dans les 8ème et 10ème arrondissements de la commune de Cotonou (dans le département du Littoral).

Les sites de manipulation sont constitués des laboratoires des formations sanitaires de collecte et du laboratoire de parasitologie du CNHU-HKM (Centre National Hospitalier et Universitaire-Hubert Koutoukou MAGA) où ont été réalisés des GE/DP, le dosage de l'hémoglobine, la réalisation des Confettis et des laboratoires du CERPAGE et du CLIP où ont été réalisés des travaux de biologie moléculaire.

5.1.2 Matériel de laboratoire

Les différents consommables, réactifs et appareils utilisés sont présentés en annexe.

5.1.3 Population d'étude

Elle est constituée des enfants asymptomatiques et souffrant de paludisme simple inclus en milieu scolaire ou reçus en consultation dans les sites de collecte, pendant la période d'étude et répondant aux critères d'inclusion et de non inclusion.

a) Critères d'inclusion

Pour l'inclusion dans l'étude, le sujet a satisfait aux critères suivants :

Paludisme asymptomatique:

- température axillaire ≤ 37°5C ;
- Goutte Epaisse positive à *Plasmodium falciparum,* quelle que soit la densité parasitaire ;
- Consentement éclairé des directeurs d'écoles et des parents ;
- Résidence dans la localité depuis 6 mois au moins ;

Paludisme simple:

- Age compris entre 6 mois et 15 ans
- température axillaire > 37°5 C à l'entrée ou dans les 24 heures précédentes ;
- infection mono spécifique à *Plasmodium falciparum* avec une parasitémie ≥ 1000 trophozoïtes/µl de sang ;
- absence de signes généraux de gravité du paludisme (incapacité à boire; vomissements répétés ; convulsions ; léthargie ; incapacité à tenir assis ou debout) ;

- consentement éclairé des parents d'enfants ;
- résidence dans la localité depuis 6 mois au moins.

b) Critères de non inclusion

Dans les cas suivants le sujet n'a pas été inclus dans l'étude :

- Taux d'hémoglobine < 5 g/L.
- Présence d'une maladie grave débilitante.
- Présence d'une autre cause évidente de fièvre.

5.1.4 Méthode d'étude

a) Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude transversale descriptive et analytique qui vise à

i) caractériser les populations de *Plasmodium falciparum* rencontrées chez les enfants sains et les enfants atteints du paludisme simple

ii) déterminer la prévalence des mutations ponctuelles sur le gène dhps (en position 436, 437 et 540) dans les populations de *Plasmodium falciparum* rencontrées chez les enfants sains et les enfants atteints du paludisme simple dans le département du Littoral

L'enquête s'est déroulée de Mai 2010 à Février 2011 comprenant une phase de terrain de Mai 2010 à Août 2010. Cette phase de terrain correspond à la grande saison pluvieuse en République du Bénin.

b) Echantillonnage

-Taille de l'échantillon

Pour déterminer la taille de notre échantillon, nous avons utilisé la formule de Schwartz :

$$n = \sum^2 pq/i^2$$

$\sum$= marge d'erreur = 1,96

p = incidence du paludisme simple dans le département du Littoral = 14,8 % **[3]**

q = 1-p = 85,2%

i = précision désirée= 6%

$$\mathbf{n}= \frac{1,96\times1,96\times0,148\times0,852}{0,06\times0,06} = \mathbf{134}$$

-Technique d'échantillonnage

La taille de notre échantillon est donc de 134 ; mais nous n'avons pu inclure que 131 enfants dont 40 enfants souffrant d'un paludisme simple et 91 enfants ayant un paludisme infestation donc asymptomatiques.

Les sujets asymptomatiques ont été recrutés dans 15 écoles publiques choisies au hasard sur un total de 29 écoles recensées dans les 8ème et 10ème arrondissements. Dans chaque école, les prélèvements ont été réalisés des plus jeunes aux plus âgés jusqu'à ce que l'effectif calculé soit atteint.

L'effectif total des écoliers dans ces 15 écoles est de 4223 enfants. Sur les 1200 enfants sélectionnés 94 ont porté ce parasite sans manifester de signe de paludisme; 3 ont par la suite fait de la fièvre et ont été déplacés du groupe des asymptomatiques vers le groupe des malades.

Au niveau des centres de santé, 37 enfants ont été inclus dans l'étude suivant l'ordre dans lequel ils se sont présentés.

-Variables

Les variables étudiées sont:

- ✓ Variable dépendante
  - o La présence ou non d'une mutation au niveau du gène dhps de *P. falciparum*
- ✓ Variables indépendantes
  - o Variables socio-démographiques et cliniques:
    - L'âge
    - Le sexe
    - La résidence.
    - Le poids.
    - La taille
  - o Variables para cliniques
    - La densité parasitaire.
    - Le taux d'hémoglobine

5.1.5 Déroulement de l'étude

L'enquête s'est déroulée de Mai 2010 à Février 2011, en deux phases :

a) Préparation de l'enquête

- Elaboration des fiches

- Fiches de consentement éclairé
- Fiche d'enquête

- Formation des agents de santé participant à l'étude

b) Enquête proprement dite

Des supervisions régulières ont été conduites par un superviseur pendant toute la durée de l'enquête.

Il a été créé un poste dit clinique et un poste dit laboratoire.

◆ **Poste clinique.**

Il est composé d'un médecin et d'infirmiers aussi bien dans les écoles que dans les centres de santé. Ils ont réalisé un examen clinique complet de tous les enfants. Ceux qui ont rempli les critères d'inclusion et dont les directeurs d'école et l'association des parents d'élèves ou le tuteur ont donné leur accord ont été retenus.

Chaque sujet a été identifié par un numéro indiquant l'ordre dans lequel il a été examiné. Les données sont consignées sur des fiches d'observation individuelles et standardisées et les enfants orientés vers le poste laboratoire.

◆ **Poste laboratoire**

Ce poste est composé d'un technicien de laboratoire. Il a pour mission de réaliser les prélèvements veineux pour la réalisation de la GE/FS, du taux d'hémoglobine et des confettis pour la PCR.

Les examens biologiques ont été réalisés au laboratoire de parasitologie du CNHU-HKM pour les enfants prélevés dans les écoles. Les prélèvements dont la goutte épaisse a été positive avec un taux d'Hb > à 5 g/dl ont servi à réaliser des confettis.

Pour les sujets recrutés dans les centres de santé les mêmes bilans ont été réalisés dans les laboratoires des centres de santé et un contrôle de qualité de la GE a été effectué au laboratoire de parasitologie du CNHU-HKM.

Tous les sujets inclus dans les centres de santé ont été traités par de l'arteméther-luméfantrine ou de l'artésunate amodiaquine qui sont les molécules retenues par le PNLP pour le traitement curatif du paludisme simple. Les enfants mis sous traitement ont été revus au 3ème puis au 7ème jour avec contrôle de la densité parasitaire.

Ceux inclus dans les écoles qui ont fait par la suite de la fièvre ou qui ne sont pas retournés à l'école parce que malades, ont été retrouvés et traités avec les mêmes molécules, puis déclassés du groupe des sujets asymptomatiques vers celui des sujets malades.

c) Collecte des données

Pour chaque sujet inclus dans l'étude, les opérations suivantes ont été effectuées :

- Enregistrement des renseignements socio-demographiques et cliniques
- Prélèvement veineux des sujets
- Réalisation de la GE/FS
- Dosage de l'hémoglobine
- Confection des confettis
- Extraction de l'ADN plasmodique
- Réalisation de la PCR-RFLP

d) Renseignements socio-demographiques

Ils ont été collectés dans les sites de collecte au moyen d'une fiche individuelle d'enquête. Le recueil de ces informations a été fait par la technique d'interview, directe ou indirecte.

e) Prélèvement veineux

Le sang veineux a été recueilli dans un tube de prélèvement contenant de l'EDTA comme anticoagulant.

◆ Technique

Elle consiste à :

- Attacher le garrot au-dessus du lieu de prélèvement c'est-à-dire au niveau du pli du coude; le patient faisant le point
- Désinfecter le lieu de prélèvement avec un tampon d'alcool à 70 % ;
- Inscrire la date, le nom et le numéro du patient sur le tube de prélèvement ;
- Introduire avec précaution l'aiguille dans la veine et prélever le volume de sang nécessaire ; le patient desserre le point
- Après le retrait de l'aiguille, déposer un coton sec sur le lieu de prélèvement et détacher le garrot.

5.1.6 Réalisation de la GE/FS

L'association GE/FS a permis l'identification de l'espèce plasmodiale et la détermination de la densité parasitaire.

5.1.7 Confection des confettis

Technique :

Du papier filtre comportant 5 cercles de 12mm de diamètre est imprégné de 50 µL de sang prélevé par spot.

Les confettis sont séchés à l'air libre pendant 12h (ou une nuit), conservés dans des sacs plastiques individuels puis dans des emballages à sangle étanche (contenant un dessiccateur, gel de silice, et un témoin d'humidité à température ambiante jusqu'à la réalisation des tests génotypiques) et transportés aux laboratoires du CERPAGE et du Centre de Lutte Intégré contre le paludisme.

Il faut noter que chaque confetti est étiqueté en mentionnant la date de confection, les initiales des nom et prénoms de l'individu et son numéro d'identification, selon la figure suivante :

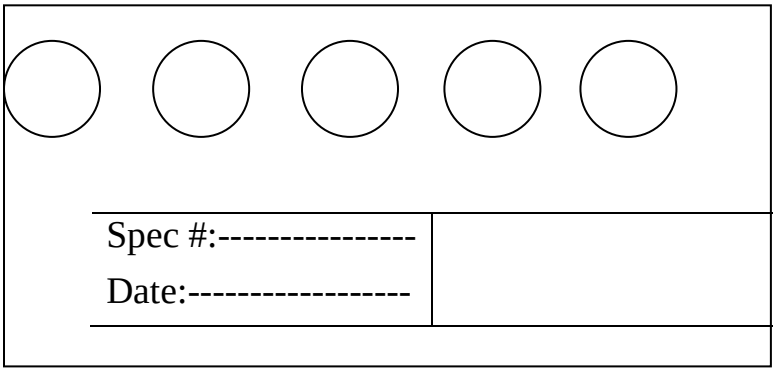


Figure 10: Illustration d'un confetti

5.1.8 Extraction de l'ADN plasmodique

- ✓ **Principe**

Il s'agit d'un protocole de lyse des cellules sanguines et d'extraction de l'ADN après piégeage d'éventuels inhibiteurs et/ou cofacteurs d'enzymes pouvant dégrader l'ADN.

- ✓ **Technique**

L'ADN de *P. falciparum* a été extrait par la méthode au chelex-100 à partir des confettis réalisés.

Cette méthode consiste à :

- Couper le morceau de papier filtre séché qui est imbibé de sang et le placer dans un tube Eppendorff de 1,5 ml
- Ajouter 1 ml de tampon PBS (pH 7,2 à 7,4) puis 50 µl de saponine 10 %
- Vortexer et laisser incuber à 4ºC durant la nuit

- Centrifuger à 4°C et à 11300 g pendant 5 s puis jeter le surnageant
- Ajouter 1 ml de tampon PBS (pH 7,2 à 7,4) et laisser incuber à 4ºC pendant 30mn
- Centrifuger à 4°C et à 11300 g pendant 5 sec puis jeter le surnageant
- Ajouter 100 µl d'eau bio mol puis 50 µl de chelex-100 20 %
- Placer le tube dans un bloc chauffant à 95-100ºC pendant 10 mn.
- Centrifuger à 4°C et à 13800 g pendant 5 mn
- Transférer 100 à 150 µL de surnageant dans un autre tube
- Centrifuger à 4°C et à 13800 g pendant 10 mn
- Transférer à nouveau le surnageant dans un autre tube

Conserver à –20º C la suspension d'ADN jusqu'à son utilisation

5.1.9 Amplification des séquences spécifiques d'ADN

Principe

Le principe de cette technique moléculaire est d'utiliser de manière répétitive une des propriétés des ADN polymérases qui est celle de pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir de couple d'amorces. La réaction correspond à la succession d'un certain nombre de cycles comportant chacun trois étapes: une dénaturation, une hybridation et une élongation.

Tous les éléments nécessaires à la réaction pour un échantillon ont été incorporés dans les puits d'une plaque de 96 puits qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape de la PCR. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement par un programme dans un thermocycleur. La figure ci-dessous montre la configuration d'un puits.

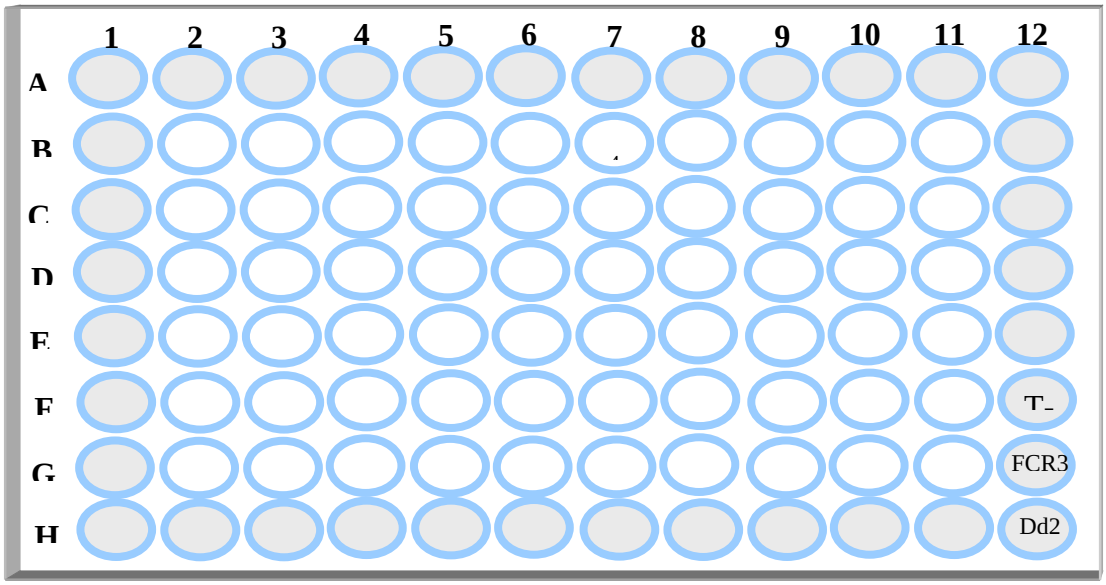


Figure 11 : Schéma d'une plaque de 96 puits

Légende :

T- : témoin négatif

FCR3 : souche sauvage

Dd2 : souche mutante

5.1.10 Marqueurs moléculaires pour la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine

Le tableau ci-dessous présente le mélange réactionnel

Tableau XXIX: Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR des gènes pfcrt K76T et pfmdr1N86Y

Réactifs	Concentration	Volume à prélever (µl)
H20	-	15,8
Primer sens	10µM	0,5
Primer antisens	10µM	0,5
Tampon Buffer($MgCl_2$)	10X	2,5
dNTP	10mM	0,5
Taq polymérase	5U/µl	0,2
Solution d'ADN	Inconnue	5
Final volume	-	25

Ce mélange a été incubé dans un thermocycleur sous le programme décrit dans le tableau II pour pfcrt et III pour pfmdr1. Pour la deuxième PCR les paires d'amorces utilisées sont

différentes de celles de la première dans les deux cas. On complète au mélange réactionnel de la deuxième PCR 5µl du produit de la première avant de passer au thermocycleur sous le programme définit ci-dessous.

Tableau XXX: Programme d'amplification utilisé et séquences des primers pour l'analyse du gène pfcrt K76T

Gène et étape de la PCR	Primes (5'-. *3')*	Programme d'amplification
pfcrt-T76 PCR1	CRT-l : (21bp) GACG AGCG *TTAT* AGAGAATTA CRT-2 : (20bp) C CAGTAGTTCTTGTAAGACC	94°C×5min (94°C×30s 47°C ×l min *72°C x* 1,5min) x40 cycles 72°C x 3min Conservation à 4°C
pfcrt-T76 PCR2	CQR-A- (21bp) TGTGC *TCA*TGTG TTT*AAACTT* CQR-B : (23bp) *CAAAACTATAGTTACCAA*TTTTG	94° Cx5min (94 ° Cx30s 52°Cx2min 72°Cx l min) x30cycles 72°C x 3min Conservation à 4°C

Tableau XXXI: Programme d'amplification utilisé et séquences des primers pour l'analyse du gène pfmdr1N86Y

Gène et étape de la PCR	Primes (5'-. *3')*	Programme d'amplification
pfmdr1N86 PCR1	MDR1 : (21pb) ATGGGGTAAAGAGCAGAAAGA MDR2 : (23pb) AACGCAAGTAATACATAAAGTCA	Confère tableau II
pfmdr1N86 PCR2	MDR3 : (22pb) TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA MDR4 : (21pb) ATAAACCTAAAAAGGAACTGG	Confère tableau II

a) Digestion des produits d'amplification

Elle a été réalisée pour chaque gène étudié grâce à une enzyme qui de façon spécifique coupe l'ADN en son site de reconnaissance.

- **Par Apo1**

La digestion du gène pfcrt a été faite à une température de 50°C pendant 6 heures au thermocycleur. L'enzyme Apo 1 ne coupe que la souche sauvage FCR3, la souche mutante (Dd2) restant intacte.

Afin de digérer le produit de la nested PCR. 10µl d'une solution réactionnelle avec Apol a été réalisée (Tableau IV). A cette solution réactionnelle nous avons ajouté 10µl du produit d'amplification de la nested PCR. L'ensemble (20µl) déposé dans un puits d'une plaque a été incubé à 50°C dans le thermocycleur. A 50°C, Apol possède une activité optimale.

Tableau XXXII: Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec AP0l

	Concentration	**Volume à prélever (µL)**
H20		6,8
Neb3	10X	2,0
BSA	100 X	0,2
APOI (NEB)	10 U/µL	1,0
Produit de Nested PCR	Inconnu	10
Volume final		20,0

Site de digestion de l'enzyme Apo1 :

5'…R ▼AATT Y…3'

3'…Y TTAA ▲R…5'

Légende : R= A ou G ; Y= C ou T

- **Par AflIII :**

La digestion du gène pfmdr1 a été faite à une température de 37°C pendant 6 heures dans un bain marie. L'enzyme AflIII ne coupe ici que la souche mutante (Dd2), la souche sauvage FCR3 restant intacte.

Afin de digérer le produit de la nested PCR ,10µl d'une solution réactionnelle avec AflIII a été réalisé (Tableau V). A cette solution réactionnelle nous avons ajouté 10µl. du produit

d'amplification de la nested PCR. L'ensemble (20µl) contenu dans un puits a été incubé à 37°C dans un bain marie. A 37°C, AflIII possède une activité optimale.

Tableau XXXIII : Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec AflIII

	Concentration	**Volume à prélever (µL)**
H20	-	5,8
Neb3	10X	2,0
BSA	100 X	0,2
AflIII	5 U/µL	2,0
Produit de Nested PCR	Inconnu	10
Volume final		20,0

Site de digestion de l'enzyme AflIII :

5'…A ▼C R Y G T…3'

3'…T G Y R C ▲A…5'

Légende : R= A ou G ; Y= C ou T

b) Révélation de produit d'amplification :

La révélation a été faite après l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Electrophorèse:

La migration a été réalisée sur gel d'agarose à 2% selon la procédure suivante:

• Dissoudre 1,7g d'agarose dans 85 ml de TBE à 1X

• Bouillir ce mélange pendant 3min dans un four à micro-onde;

• Ajouter 6 µl de bromure d'éthidium dans l'agarose fondu;

• Couler le gel dans la moule et attendre sa solidification;

• Enlever les peignes et placer le gel avec le moule dans le bac de migration contenant le TBE à 1X ; le gel doit être immergé;

• Découper le papier parafilm :

• Placer sur le parafilm 3 µl de colorant pour chaque échantillon à migrer;

• Placer 4µl du marqueur de poids moléculaire dans le premier et le dernier puits;

• Mélanger 8µl de produit de digestion au colorant puis le loger dans le puits;

• Faire migrer entre 80 à 90 volts pendant 1,5 à 2 heures;

• Sortir le gel du moule et le placer sous l'appareil à UV pour la photographier;
• Marquer devant chaque bande le numéro de l'échantillon correspondant.

c) Interprétation de la photographie :

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes conformes à celles attendues. Nous avions observé la conformité de la taille du produit attendu ainsi que celle des témoins positifs.

- **Pfcrt :**

L'enzyme Apo1 ne coupe que les souches de génotypes sauvages dont notre souche sauvage FCR3. Les bandes de la même taille que le témoin sauvage (100 et 34pb) correspondent aux souches sensibles à la chloroquine.

Par contre celles qui ont la même taille que le témoin résistant (134 pb) correspondent aux souches résistantes à la chloroquine, Les bandes qui apparaissent à la fois au niveau des deux témoins correspondent aux souches mixtes.

- **Pfmdr1 :**

Ici l'enzyme AflIII ne coupe que les souches résistantes mutantes dont Dd2 . La souche sauvage objective une bande de 521 pb (produit de la deuxième PCR) tandis que celle mutante montre deux bandes à 226 et 295 pb.

5.1.11 Marqueurs moléculaires pour la résistance de *Plasmodium falciparum* à la Sulfadoxine pyriméthamine

Réalisation de la PCR-RFLP

Les études moléculaires ont été faites dans les locaux des laboratoires du CERPAGE et du CLIP.

Il s'agissait de réaliser le génotypage des allèles Pfdhps au niveau des codons 436, 437 et 540 en utilisant une technique de biologie moléculaire : la PCR-RFLP.

Le matériel biologique qui a servi à cette étude moléculaire était l'ADN plasmodial extrait à partir des confettis réalisés.

- ✓ **Principe**

-PCR nichée ou « Nested PCR »

Nous avons utilisé la méthode de PCR nichée pour l'amplification des séquences d'ADN de *P falciparum.*

Cette variante de la PCR, consiste en une série consécutive de deux PCR au moyen de deux paires différentes d'amorces.

Les fragments d'ADN amplifiés au cours de la PCR I contiennent les séquences qui seront appariées avec la deuxième paire d'amorce. Cette deuxième amplification rend la technique plus sensible

Le résultat de l'amplification est la production d'un amplicon en quantité telle qu'il est macroscopiquement visible.

- Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction ou RFLP

La digestion enzymatique utilise des enzymes de restriction, à nombre élevé de sites de coupure ; puis la révélation des produits de digestion est faite par électrophorèse simple.

Technique

- PCR nichée

- ✓ **Amplification**

Le volume du mélange réactionnel préparé est fonction du nombre de produits à amplifier [nombre d'échantillons + 2 témoins positifs (souche sauvage FCR3 et souche mutante DD2) + 1 témoin négatif].

Les composants des mélanges réactionnels par échantillon pour la PCR I et la PCR II sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau XXXIV: Composition des mélanges réactionnels d'amplification par échantillon pour les PCR I et II

	Réactifs	**Concentration de la solution stock**	**Concentration finale**	**Volume (µL) à prélever**
PCR I	Tampon PCR*	10 X	1 X	2,5
	H_2O BM	-	-	16,3
	$dNTP_{mix}$	10 mM de chaque dNTP	200 µM de chaque dNTP	0,5
	Taq polymerase	5 U/ µL	0,04 U/ µL	0,2
	Amorce sens: R2	25 µM	0.25 µM	0,25
	Amorce antisens: R/	25 µM	0.25 µM	0,25
	Volume total = 20 µL			
PCR II	Tampon PCR*	10 X	1 X	5
	H_2O BM	-	-	37,6
	$dNTP_{mix}$	10 mM de chaque dNTP	200 µM de chaque dNTP	1
	Taq polymerase	5 U/ µL	0,04 U/ µL	0,4
	Amorce sens: K	25 µM	0.25 µM	0,5
	Amorce antisens: K/	25 µM	0.25 µM	0,5
	Volume total = 45 µL			

Tampon PCR* 1 X (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH8.3), 1,5mM de $MgCl_2$)

Lors de la PCR I, 5 µl d'ADN extrait à partir des confettis réalisés sont ajoutés au mélange réactionnel (pour atteindre un volume final de 25 µl) dans un puits (plaque à PCR de 96 puits) spécifique de chaque échantillon.

Au cours de la PCR II, nous avons ajouté 5 µl d'amplicon de PCR I au mélange réactionnel (pour atteindre un volume final de 50 µl) dans un puits (plaque à PCR de 96 puits) spécifique de chaque échantillon.

L'amplification s'est ensuite effectuée dans un thermocycleur de type Applied Biosystem selon des programmes spécifiques à chaque couple d'amorce comme indiqué ci-dessous.

Tableau XXXV: Tableau récapitulatif des amorces et des programmes d'amplification.

	Amorces (nom, longueur, séquence) : 5' 3'→	**Programme d'amplification**
PCR I	R2 (20pb): AAC-CTA-AAC-GTG-CTG-TTC-AA R/ (21pb): AAT-TGT-GTG-ATT-TGT-CCA-CAA)	94°C x 5mn ; (94°C x 1 mn ; 55°C x 1 mn ; 72°C x 1mn) x 40 ; 72°C x 10mn
PCR II	K (30pb): TGC-TAG-TGT-TAT-AGA-TAT-AGG-ATG-AGC-ATC K/ (31pb): CTA-TAA-CGA-GGT-ATT-GCA-TTT-AATGCA- AGA-A	94°C x 5mn ; (94°C x 1 mn ; 60°C x 1 mn ; 72°C x 1mn) x 40 ; 72°C x 10 mn

Les différentes étapes du programme d'amplification sont les suivantes: Dénaturation initial ; (Dénaturation ; Hybridation ; Elongation) × Nombre de cycles ; Elongation terminale.

Nous avons utilisé des amorces précédemment décrites par DURAISIGN (Duraisingh, 1998)**.** Les produits obtenus après amplification sont utilisés immédiatement ou conservés à + 4°C dans le réfrigérateur en attendant la migration et la révélation.

- RFLP

✓ **Digestion enzymatique**

Elle a été faite dans un thermocycleur, à une température de 37°C et durant un temps d'incubation de 6h. Les enzymes utilisées sont : Mnl I (coupant les souches sauvage et mutante au niveau du codon 436), Ava II (coupant la souche mutante au niveau du codon 437), Fok I (coupant les souches sauvage et mutante au niveau du codon 540).

Le volume du mélange réactionnel préparé est fonction du nombre de produits à digérer. Les composants des mélanges réactionnels de digestion enzymatique par échantillon sont présentés dans le Tableau ci-dessous.

Tableau XXXVI: Composition des mélanges réactionnels de digestion enzymatique par échantillon

Gène	Codon	Réactifs	Concentration de la solution stock	Concentration finale	Volume (µL) à prélever
pfdhps	436	H_2O BM	-	-	7,4
		Neb 4	10 X	1 X	2,0
		BSA	100 X	1 X	0,2
		Mnl I	5 U/ µL	0,1 U/ µL	0,4
		Volume total = 10 µL			
	437	H_2O BM	-	-	7,8
		Neb 4	10 X	1 X	2,0
		Ava II	10 U/ µL	0,1 U/ µL	0,2
		Volume total = 10 µL			
	540	H_2O BM	-	-	7,5
		Neb 4	10 X	1 X	2,0
		Fok I	4 U/ µL	0,1 U/ µL	0,5
		Volume total = 10 µL			

Pour chacune des 3 digestions enzymatiques par échantillon, 10 µl d'amplicon de la PCR II sont ajoutés au mélange réactionnel (pour atteindre un volume final de 20 µl) dans un puits (plaque à PCR de 96 puits) spécifique de chaque échantillon.

- ✓ **Révélation des produits de digestion enzymatique**

Elle consiste en une électrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une visualisation sous lumière UV.

- ✓ Electrophorèse

- Pour réaliser le gel d'agarose à 2 % : dissoudre 1,7 g d'agarose dans 85 ml de TBE 1X par chauffage (au four à micro-ondes) pendant 3 mn.
- Laisser refroidir le gel puis ajouter 6 µl de BET 1%
- Couler le gel dans la cuve à électrophorèse en veillant à bien imprégner les peignes.
- Laisser solidifier à la température ambiante puis enlever les peignes
- Dans chaque puit du gel placé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TBE (Trizma Borie acid EDTA) 1X, un mélange de 8 µl de chaque produit de digestion et de 3 µl de colorant de charge est déposé.
- L'électrophorèse a été réalisée à une intensité de 75 mA sous une tension de 120 délivré par un générateur.

Parallèlement à l'ADN des patients, un marqueur de poids 100 pb et les témoins ont été migrés pour l'interprétation des bandes.

- ✓ Visualisation à l'UV et interprétation des résultats

Après avoir égoutté le gel, il a été placé sur une table à lumière UV.

Les photos de gel ont été prises avec une caméra montée dans une chambre noire et visualisées sur ordinateur.

Les produits amplifiés puis digérés apparaissent sous forme de bandes dont les tailles sont exprimées en nombre de paires de base (en référence au standard qu'est le marqueur de taille de 100 pb) et sont caractéristiques des allèles (sauvages et mutés) du gène **(**Duraisingh 1998**,** Kublin 2002). La taille attendue pour l'amplicon de PCR II est de 438 pb. Les bandes attendues sont exprimées pour chaque enzyme dans le tableau ainsi que les sites de coupure.

Tableau XXXVII: Bandes attendues

Enzyme de restriction	**Sites de coupure**	**Souches sauvages**	**Nombre et taille (en pb) des bandes des souches sauvages**	**Souches mutantes**	**Nombre et taille (en pb) des bandes des souches mutantes**
Mnl I	5′...CCTC $(N)_7$▼...3′ 3′...GGAG $(N)_6$▲...5′	Ser436	2 bandes: 278 + 121	436Ala	2 bandes : 317 + 121
Ava II	5′...G▼GWCC...3′ 3′...CCWG▲G...5′	Ala437	1 bande : 438 (pas de coupure)	437Gly	1 bande: 404
Fok I	5′...GGATG$(N)_9$▼...3′ 3′...CCTAC$(N)_{13}$▲...5′	Lys540	1 bande: 405	540Glu	2 bandes: 320 + 85

Les bandes de la même taille que celles des souches sauvages correspondent aux souches sensibles de *P. falciparum* à la sulfadoxine.

Les bandes de la même taille que celles des souches mutantes correspondent aux souches résistantes de *P. falciparum* à la sulfadoxine.

Par contre les bandes qui apparaissent à la fois au niveau de celles des souches sauvages et mutantes correspondent à un mélange de souches sensibles et résistantes à la sulfadoxine.

5.1 .12 Traitement des données

Les fiches d'enquête ont été systématiquement vérifiées sur le terrain à la fin de chaque journée. Les prélèvements sont rangés et transportés vers le laboratoire où ils ont fait

l'objet d'une vérification rigoureuse. Les lames de GE/FS sont lues par des techniciens expérimentés sur place puis lues à nouveau au laboratoire de parasitologie du CNHU-HKM pour un contrôle de qualité. Les confettis sont emballés classés et stockés avec un dessiccateur. Les données ont été saisies dans le logiciel Excel 2003 puis converties sur Epi-INFO version 3.5.1

Les tests statistiques utilisés sont le chi carré qui recherche le lien statistiquement significatif entre les variables qualitatives et le test de probabilité exact de Fischer lorsque les conditions d'utilisation du chi carré n'étaient pas remplies. L'obtention d'une probabilité p inférieure ou égale à 0,05 était en faveur de l'existence d'un lien statique entre les variables comparées.

5.1.13 Considérations éthiques

La présente étude porte sur le volet moléculaire du test d'efficacité thérapeutique organisé avec l'appui financier du PNLP et technique de l'UER de parasitologie et de mycologie. Un protocole a donc été soumis au comité d'éthique de la Faculté des Sciences de la Santé.

Les participants ont été informés des objectifs et des buts de l'étude. Les parents des sujets sélectionnés ont été informés que leur participation à l'étude est entièrement volontaire et que les informations recueillies par l'équipe de chercheurs sont strictement confidentielles. Il leur a été également permis de mettre fin à tout moment à leur participation s'ils le désirent.

Une fiche a été élaborée pour recueillir le consentement éclairé des parents des sujets sélectionnés et des directeurs des écoles primaires publiques enquêtées, après explication des objectifs et du déroulement de l'étude. Pour les parents ne pouvant lire la langue française, une traduction du contenu de la fiche de consentement a été faite dans la langue locale en présence ou non d'un témoin.

La confidentialité des données recueillies a été respectée.

5.2 Résultats

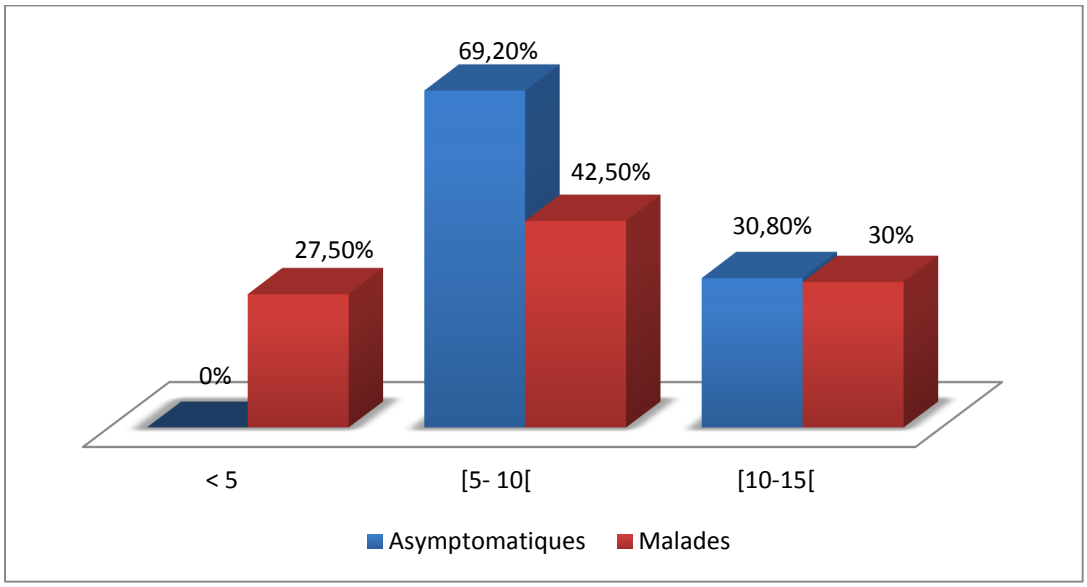
5.2.1 Caractéristiques générales de la population

a) Taille de l'échantillon

Au terme de l'étude, 131 enfants dont 91 asymptomatiques (69,5 %) et 40 malades (30,5%) ont été retenus et répartis.

b) Données sociodémographiques

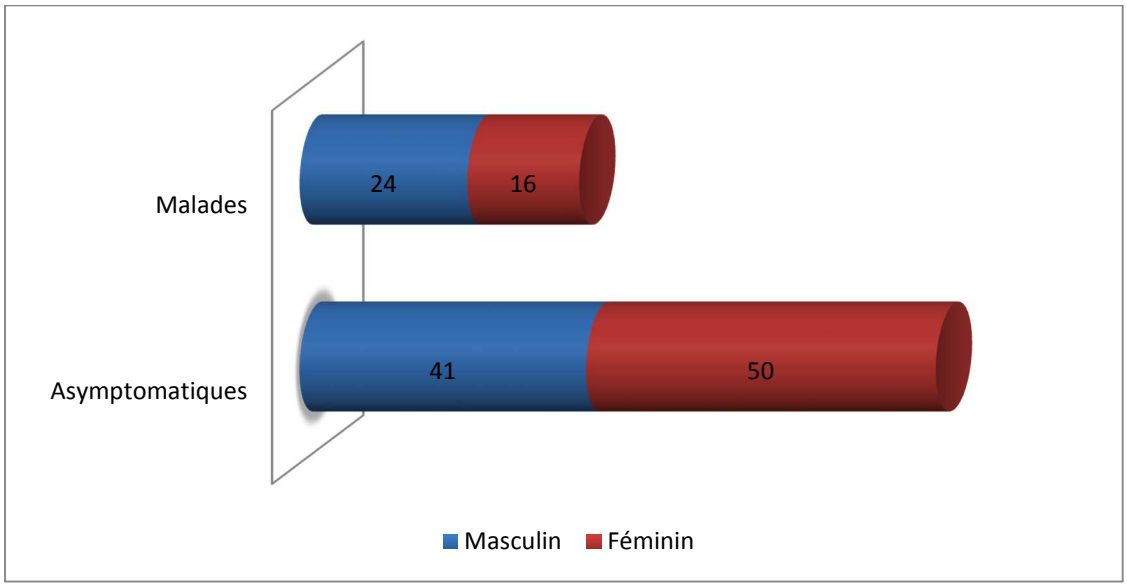
-Age



Graphique 7: Distribution des enfants retenus dans l'étude selon l'âge et le statut clinique

La moyenne d'âge est de 8,2 ans dans le groupe des enfants asymptomatiques avec des âges extrêmes de 5 et 14 ans et 7,6 ans dans le groupe des enfants malades avec des âges extrêmes de 2 et 14 ans.
La majorité (70%) des enfants malades ont un âge inférieur à 10 ans.

-Sexe



Chi^2=2,2 p=0,13

Graphique 8: Distribution des enfants retenus dans l'étude selon le sexe et le statut clinique

Parmi les 131 enfants retenus dans l'étude, 65 (49,6 %) sont de sexe masculin et 66 (50,4%) de sexe féminin.
Dans le groupe des asymptomatiques, 41 sont de sexe masculin et 50 de sexe féminin soit un sexe ratio F/M de 1,2 contre un sexe ratio F/M de 0,67 dans le groupe des malades.

5.2.2 Caractéristiques des enfants à l'inclusion

a) Caractéristiques cliniques

✓ Signes fonctionnels :

Les symptômes prédominants à l'inclusion pour les sujets souffrant du paludisme simple sont la fièvre et l'asthénie. Il a été observé quelques rares cas de vomissements et de céphalées.

✓ Signes généraux :

Les sujets asymptomatiques ont une température moyenne de 37,1°C tandis que les malades ont une température moyenne de 38,8°C.

b) Caractéristiques paracliniques : la densité parasitaire

Tableau XXXVIII: Répartition de la densité parasitaire en fonction du statut clinique

Densité parasitaire (tropho/µL)	**Asymptomatiques (n=91)**	**Malades (n=40)**
Valeur minimale	12	1000
Valeur maximale	16000	160000
Moyenne	1605,46	27671,3

La densité parasitaire varie de 12 à 16000 trophozoïtes/µl chez les asymptomatiques avec une moyenne de 1605,46 trophozoïtes /µl par enfant tandis qu'elle varie de 1000 à 160000 trophozoïtes/µl chez les malades avec une moyenne de 27671,3. trophozoïtes/µl par enfant.

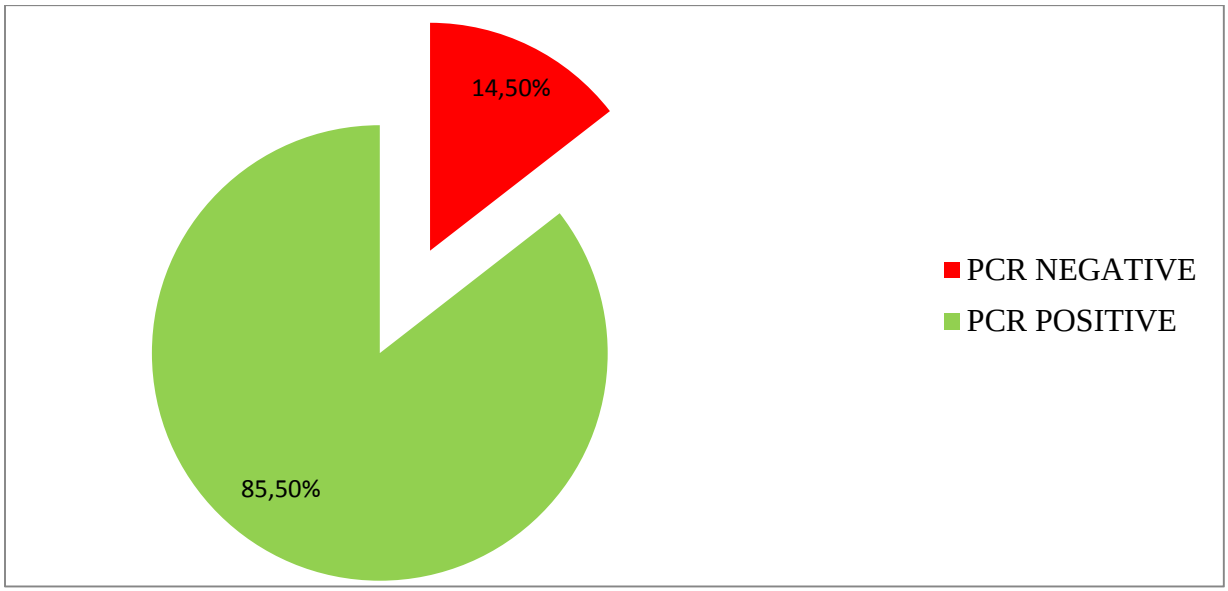
5.2.3 Taux de portage de *Plasmodium falciparum*

Sur 1200 enfants sélectionnés, 91 sont porteurs de *Plasmodium falciparum* soit un taux de portage de 7,6 % dans le département du Littoral.

5.2.4 Résultats des marqueurs de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine

a) Résultats de la PCR RFLP

La PCR RFLP a été réalisée sur 131 sujets malades et asymptomatiques pour chacun des marqueurs moléculaires de résistance pfcrt et pfmdr1 du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine. 14,5% (19/131) des échantillons n'ont donné aucune bande après visualisation des produits de digestion sur gel d'agarose pour les deux gènes étudiés.



Graphique 9: Résultats de la PCR RFLP

b) Photo d'un gel illustrant les résultats

La photographie ci-après représente l'image d'un gel avec la présence de plusieurs bandes et des marqueurs de taille (M) des bandes disposés à chaque extrémité du gel.

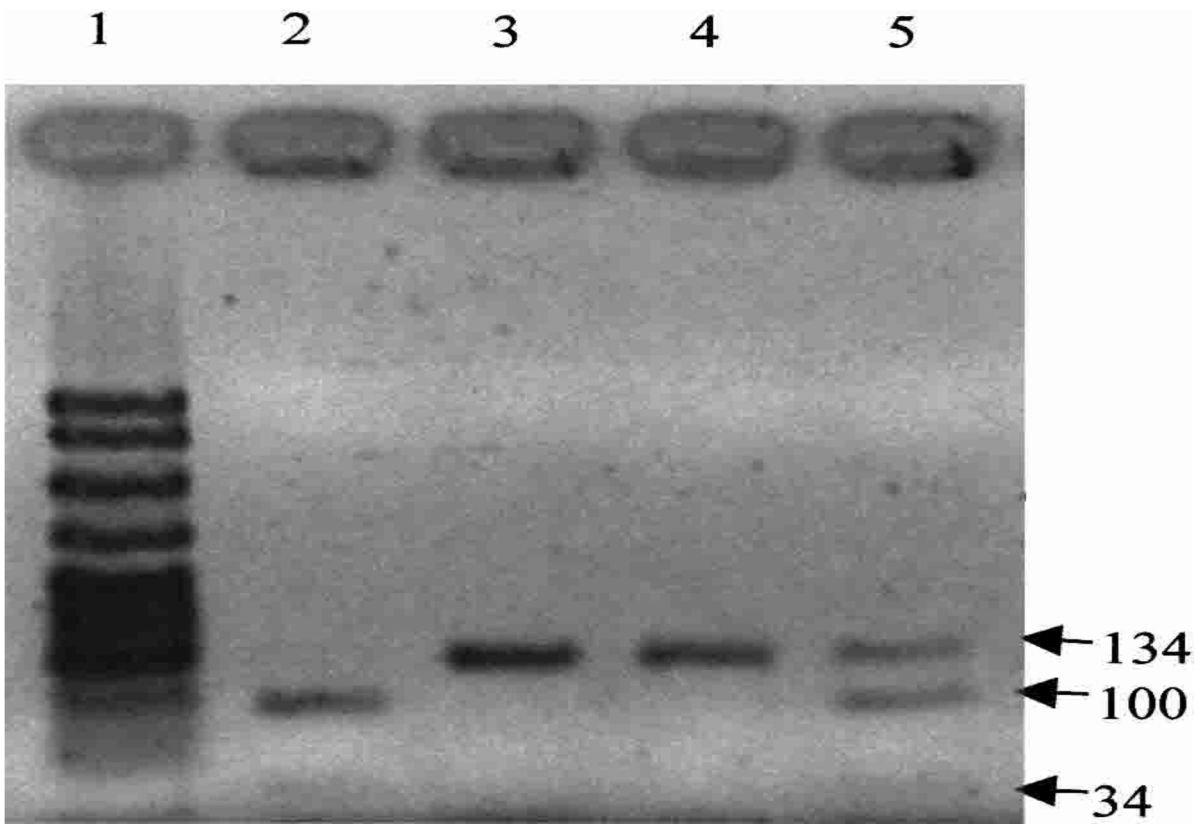


Photo 2: Photo du Gel d'agarose pour le gène pfcrt visualisé après coloration au bromure d'éthidium.

c) **Interprétation**

Puits 1 : dépôt du marqueur de taille

Puits 2, 3, 4, 5 : dépôts des échantillons

L'échantillon 2 a permis d'observer deux bandes dont une à 100 pb et l'autre à 34 pb : il s'agit donc d'une souche sauvage donc porteur de l'allèle pfcrt K76.

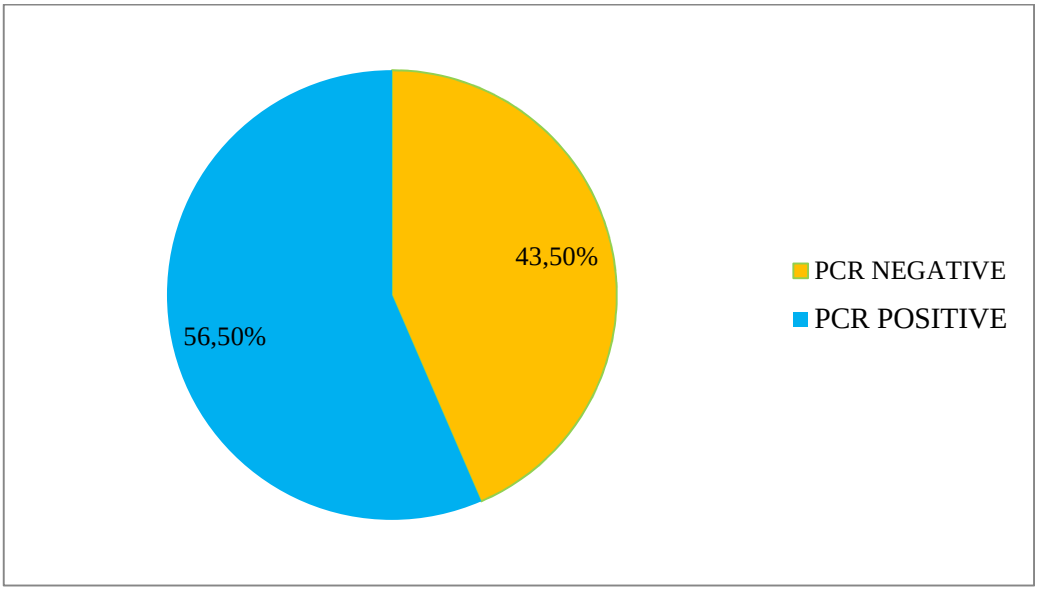
Sur les échantillons 3 et 4 on visualise une bande de 134 pb : il s'agit de souches mutantes présentant l'allèle pfcrt T76.

Quant à l'échantillon 5, 3 bandes de taille 134, 100 et 34 pb sont apparus: il s'agit de souches mixtes c'est-à-dire comportant à la fois les souches sauvages d'allèle pfcrt K76 et les souches résistantes d'allèle pfcrt T76.

Le gel pour le gène pfmdr1 présente la même allure.

5.2.5 Résultats obtenus après digestion pour le gène pfcrt

a) Résultats de la PCR RFLP

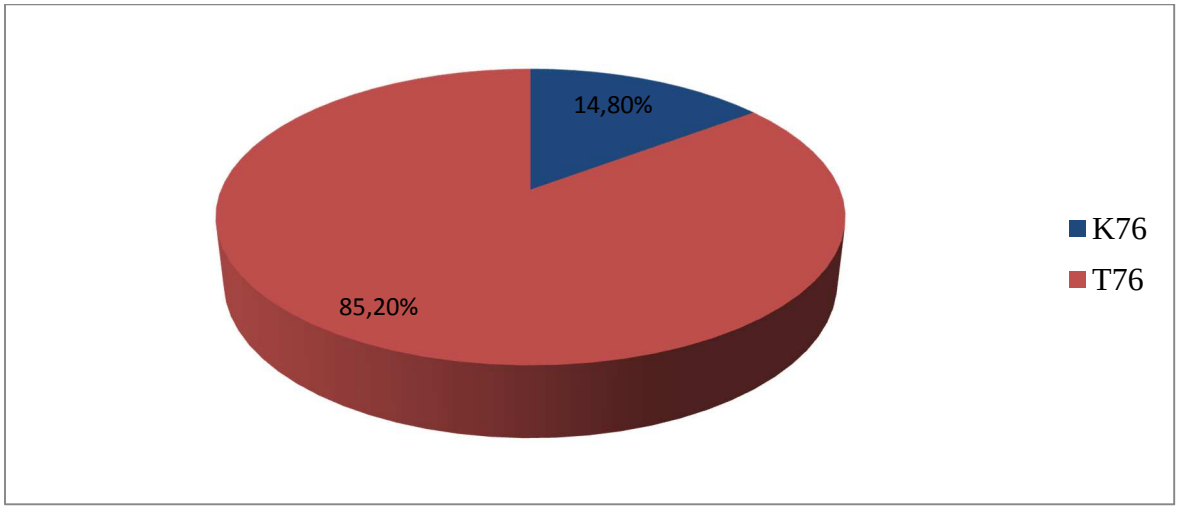


Graphique 10: Résultats de la PCR pour le gène pfcrt

La PCR était négative pour 43,50% (57/131) des échantillons et positive pour 56,50% (74/131) de ces échantillons. Sur les 57 échantillons négatifs 52 sont ceux d'enfants asymptomatiques. La prévalence du gène pfcrt au sein donc de la population d'étude est de 56,50%.

Au total, nous avions réalisé les manipulations sur 39 échantillons d'enfants asymptomatiques et 35 échantillons d'enfants souffrant de paludisme simple, échantillons positifs à la 2ème PCR.

b) Prévalence de la mutation pfcrt T76 dans la population d'étude



Graphique 11: Distribution de la mutation T76 dans la population d'étude

Sur les 74 échantillons ayant donné un résultat positif à la RFLP PCR, 85,2% (63/74) sont porteurs de la mutation T76. La prévalence donc de la mutation au sein de la population d'étude est de 85,2%.

c) Prévalence de la mutation pfcrt T76 selon le statut clinique

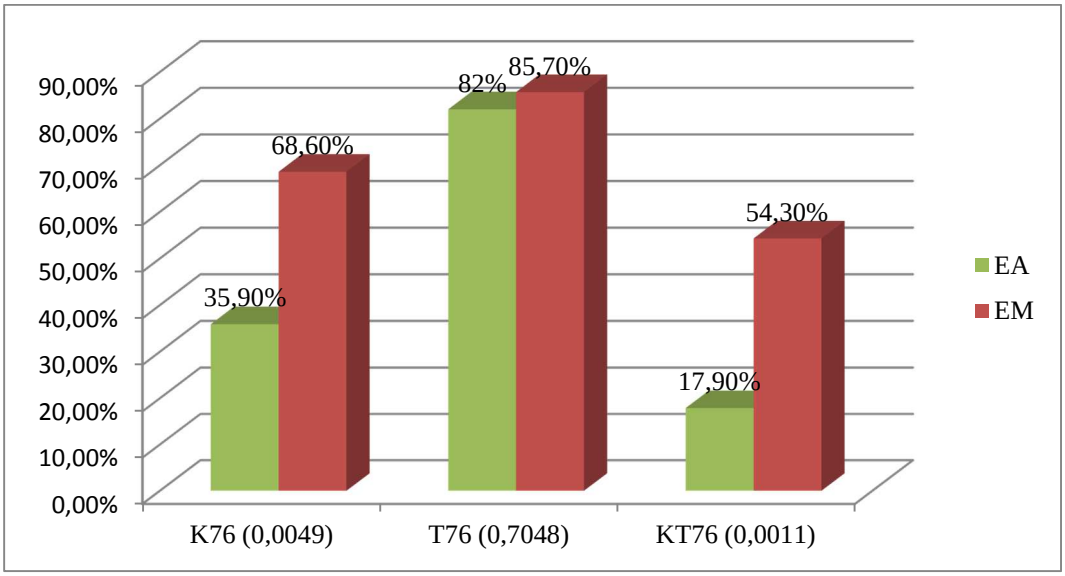
La prévalence de la mutation T76 est indiquée dans le tableau ci-dessous

Tableau X XXIX: Prévalence de la mutation T76 selon le statut clinique

Statut clinique					
Allèles pfcrt	**Asymptomatiques(39)**		**Malades (35)**		
	Effectif	%	Effectif	%	p
T 76	33	82,0	30	85,7	0,7048
KT 76	7	17,9	19	54,3	**0,0011**

La prévalence de l'allèle muté T76 est relativement élevée au sein des deux populations d'étude soit 82% (33/39) d'une part au sein du groupe des enfants asymptomatiques et 85,7% (30/35) d'autre part au sein du groupe des enfants malades (p=0,7048).
Enfin, la répartition des souches mixtes est de 17,9% (19/39) chez les enfants asymptomatiques et de 54,3% (19/35) dans le groupe des enfants malades (p=0,0011).

d) Répartition des allèles de pfcrt selon le statut clinique

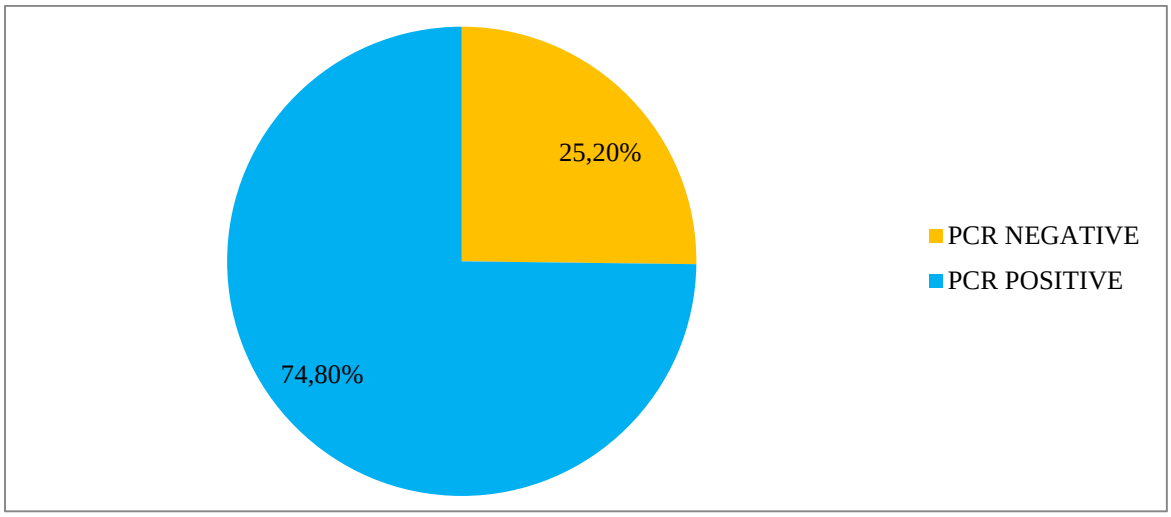


Graphique 12: Distribution des allèles de pfcrt selon le statut clinique

Selon le statut clinique, on note globalement dans les deux groupes cliniques une prévalence élevée de la mutation T76 contrairement à celle de l'allèle sauvage K76.

e) Résultats obtenus avec le gène pfmdr1

-Résultats de la PCR RFLP

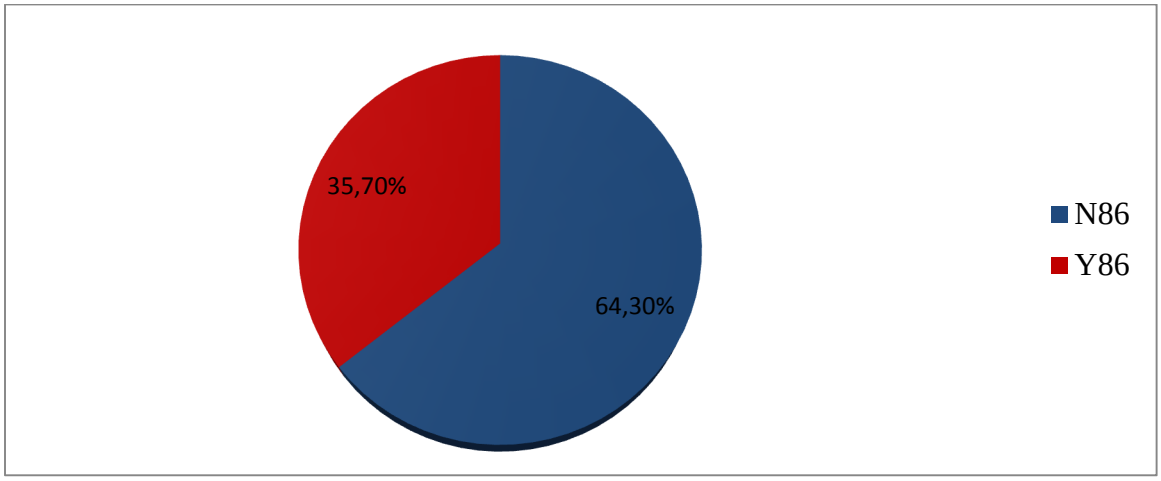


Graphique 13: Résultats de la PCR pour le gène pfmdr1

La PCR était négative pour 25,20% (33/131) des échantillons et positive pour 74,80% (98/131) de ces échantillons. Sur les 33 échantillons revenus négatifs 25 sont ceux d'enfants asymptomatiques. La prévalence donc du gène pfmdr1 au sein de la population d'étude est de 74,80%.

Au total, l'évaluation a porté sur 66 échantillons d'enfants asymptomatiques et 32 d'enfants souffrant de paludisme simple. La prévalence du gène pfmdr1 au sein donc de la population d'étude est de 74,80%.

f) Prévalence de la mutation pfmdr1 Y86 dans la population d'étude



Graphique 14: Distribution de la mutation Y86 dans la population d'étude

Sur les 98 échantillons ayant donné un résultat positif à la PCR RFLP 35,7% (35/98) sont porteurs de la mutation Y86. La prévalence donc de la mutation au sein de la population d'étude est de 35,7%.

g) Prévalence de la mutation pfmdr1 Y86 selon le statut clinique

Le tableau ci-dessus indique la prévalence

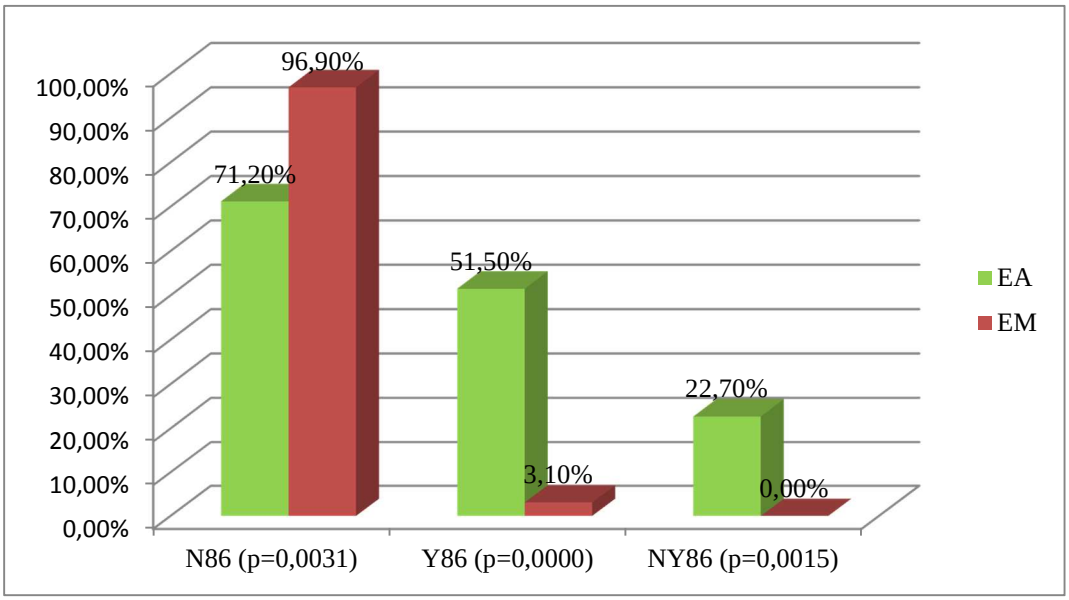
Tableau XL: Prévalence de la mutation Y86 selon le statut clinique

	Statut clinique				
Allèles pfmdr1	**Asymptomatiques (66)**		**Malades (32)**		
	Effectif	%	Effectif	%	p
Y 86	34	51,5	1	03,1	**0,0000**
NY 86	15	22,7	0	00,0	**0,0015**

La prévalence de l'allèle muté Y86 est de 51,5% (34/66) d'une part au sein du groupe des enfants asymptomatiques et 3,1% (1/32) d'autre part au sein du groupe des enfants malades (p=0,0000).

Enfin, la répartition des souches mixtes est de 22,7% (15/66) chez les enfants asymptomatiques et nulle dans le groupe des enfants malades (p=0,0015).

h) Répartition des allèles de pfmdr1 selon le statut clinique



Graphique 15 : Distribution des allèles de pfmdr1 selon le statut clinique

Selon le statut clinique, on note une prévalence relativement élevée de l'allèle sauvage N86 au sein de notre population d'étude contrairement à celle de l'allèle muté Y86.

i) Répartition des doubles mutations T76-Y86 en fonction du statut clinique

Le tableau ci-dessous montre la répartition des mutations.

Tableau XLI: Répartition des mutations T76 et Y86 selon le statut clinique

Double mutant	**Statut clinique**		
T76 Y86	**EA**	**EM**	**TOTAL**
Oui	12	1	**13**
Non	62	37	**99**
TOTAL	**74**	**38**	**112**

Test de FISCHER Exact, p = 0,0276

La prévalence de double mutant dans toute la population ayant été positive à la PCR RFLP chez les deux gènes est de 13/ 112 soit 11,6%.

Par ailleurs, on note une différence statistiquement significative entre la proportion de double mutant chez les asymptomatiques et la proportion de double mutant chez les malades : 12/ 74 = 16,2% contre 1/38 = 2,6%.

5.2.5 Résultats des marqueurs de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la Sulfadoxine pyriméthamine

5.2.5.1 Résultats de la PCR-RFLP

a) Taux de positivité du gène Pfdhps

Tableau XLII: Répartition des échantillons en fonction du taux de positivité du gène Pfdhps au niveau des codons 436, 437 et 540.

Codon	Positivité (n=131)	
	n	%
436	66	50,4
437	66	50,4
540	64	48,9

Des 131 échantillons collectés, 50,4% ont présenté des résultats interprétables au niveau des codons 436 et 540 et 48,9% au niveau du codon 437.

b) Photo d'un gel illustrant les résultats

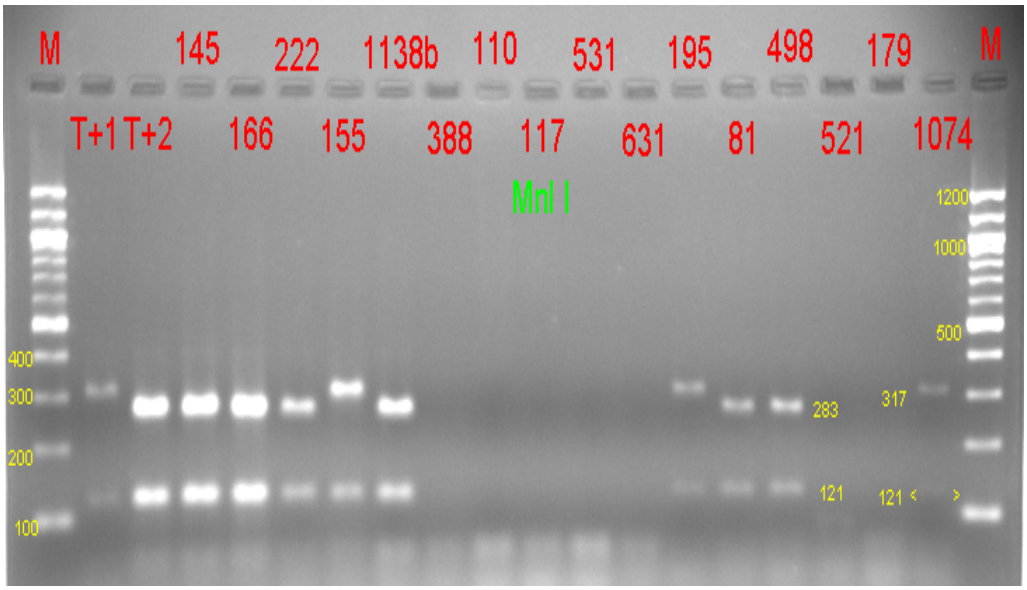


Photo 3: Photo d'un gel après digestion par Mnl I

M : marqueur de poids 100 pb

T+1 (souche DD2) : témoin mutant

T+2 (souche FCR3) : témoin sauvage

155, 195, 1074 : souches mutantes

145, 166, 222, 1138b, 81, 498: souches sauvages

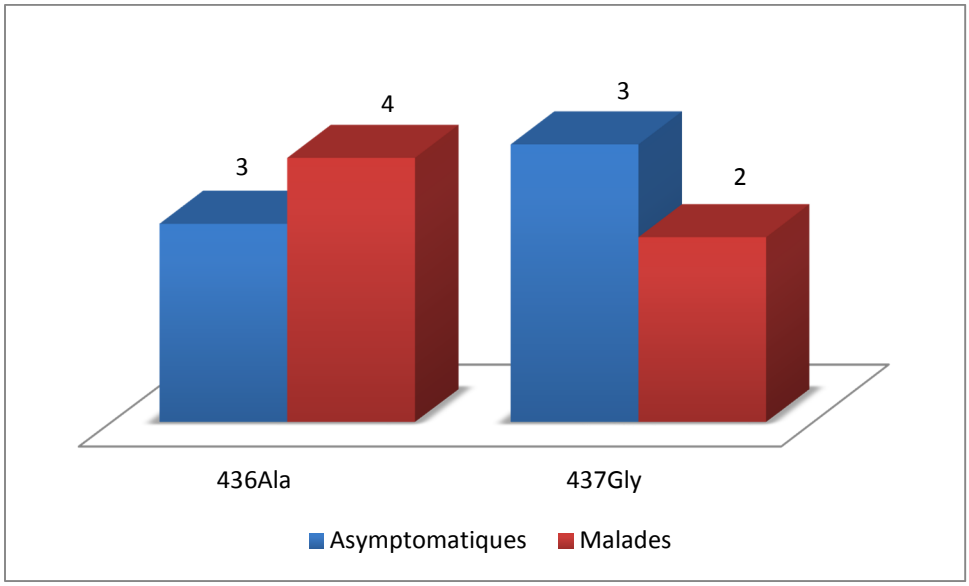
c) Prévalence des mutations au niveau des codons 436, 437 et 540

Tableau XLIII: Répartition des échantillons en fonction des mutations au niveau des codons 436, 437 et 540

Codon	Présence de Mutation		Absence de mutation	
	n	%	n	%
436 (n=66)	7	10,6	59	89,4
437 (n=66)	5	7,6	61	92,4
540 (n=64)	0	0	64	100
436-437 (n=66)	1	1,5	65	98,5

La prévalence des mutations au niveau des codons 436, 437 et 540 est respectivement de 10,6% ; 7,6% et de 0,0%.
La prévalence de la double mutation au niveau des codons 436 et 437 est de 1,5%.

d) Prévalence des mutations au niveau des codons 436 et 437 dans chaque groupe clinique

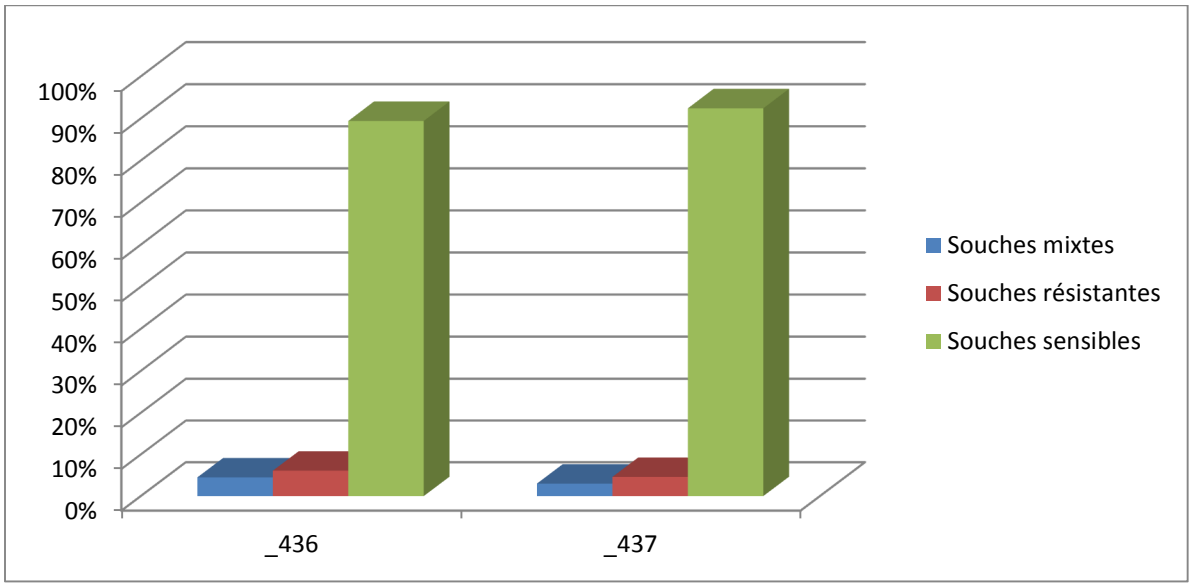


Test exact de Fischer : p=0,442 (pour **436Ala)** p=0,654 (pour **437Gly)**

Graphique 16: Distribution des mutations au niveau des codons 436 et 437 dans chaque groupe clinique

Au niveau du codon 436, les mutations se retrouvent plus chez les malades (4 cas sur 7) tandis qu'au niveau du codon 437, les asymptomatiques présentent plus la mutation (3 cas sur 5).
Cette différence entre le statut clinique et la présence d'une mutation au niveau du codon 436 ou du codon 437 n'est pas statistiquement significative :
(p=0,442 ; p=0, 654).

e) Distribution des génotypes des souches plasmodiales au niveau des codons 436 et 437



Graphique 17: Distribution des génotypes des souches plasmodiales au niveau des codons 436 et 437

Les souches sensibles (présentant les allèles sauvages) au niveau des codons 436 et 437 sont représentées respectivement à des taux de 89,4% et 92,4%.
Pour les souches résistantes (présentant les allèles mutés) au niveau des codons 436 et 437, les taux respectifs sont de 6,1% et 4,6%.
En ce qui concerne les souches mixtes (présentant les allèles sauvages et mutés) au niveau des mêmes codons, les taux sont de 4,5% et 3%.

5.3 Discussions

Evaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires pfcrt, pfmdr1 de résistance du Plasmodium falciparum à la chloroquine et Pfdhps de résistance de Plasmodium falciparum à la Sulfadoxine chez les enfants dans le département du Littoral au Bénin

5.3.1 De l'intérêt de l'étude

Le choix de la Sulfadoxine se justifie d'une part par des taux élevés de résistance de P falciparum à l'association Sulfadoxine-Pyriméthamine au Sud du Bénin soit 50 % [8], tandis qu'une résistance in vitro à la Pyriméthamine de 61,8 % à été retrouvée par WAKPO à Allada [9]. D'autre part parce qu'elle est recommandée par l'OMS en association avec la Pyriméthamine en TPI chez les femmes enceintes.

La résistance à cette molécule est médiée par des mutations ponctuelles au niveau des codons 436, 437, 540, 581 et 613. Ces différentes mutations sont prépondérantes en Afrique de l'Est mais en Afrique de l'Ouest, les mutations les plus rencontrées sont celles observées au niveau des codons 436, 437 et 540 [87].

5.3.2 De la méthodologie

l'évaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la Sulfadoxine est une étude transversale descriptive et analytique qui vise à i) caractériser les populations de *Plasmodium falciparum* rencontrées chez les enfants sains et les enfants atteints du paludisme simple ii) déterminer la prévalence des mutations ponctuelles sur le gène dhps (en position 436, 437 et 540) dans les populations de *Plasmodium falciparum* rencontrées chez les enfants sains et les enfants atteints du paludisme simple dans le département du Littoral. La taille de l'échantillon est de 134 ; elle est légèrement inférieure à celle calculée mais est statistiquement valable. Comparé aux études antérieures, l'échantillon est proche de ceux de JELINEK et coll. en 1999 en Ouganda, d'AUBOUY et coll. en 2003 au Gabon qui ont recherché la prévalence des mutations des gènes Pfdhfr et Pfdhps respectivement chez 122 et 124 enfants; de DJAMAN et coll. qui ont recherché chez 150 sujets, la prévalence des mutations ponctuelles des gènes Pfdhfr, Pfdhps, Pfcrt et Pfmdr-1, à Abidjan en Côte d'ivoire en 2010 (Djaman, 2010).

En revanche il est supérieur à ceux de TAHAR et coll. (Tahar, 2007) à São Tomé et principe en 2007**,** de NFOR et coll. à Ndu au Cameroun en 2007 (Nfor, 2007) qui ont recherché la prévalence des mutations des gènes Pfdhfr et Pfdhps chez respectivement 59 sujets et 100 enfants. Cette différence de taille peut s'expliquer par la période de

recrutement des patients qui se trouve être la période de forte transmission du paludisme au Bénin (Mai à Août).

Le choix de la sulfadoxine se justifie d'une part par des taux élevés de résistance de *Plasmodium falciparum* à l'association sulfadoxine pyriméthamine au Bénin (Aubouy A, 2007 et PNLP, 2002), tandis qu'une résistance *in vitro* à la pyriméthamine de 61,8 % a été retrouvée par Wakpo à Allada (Wakpo A, 2008)**.** D'autre part parce qu'elle est recommandée par l'OMS en association avec la pyriméthamine en TPI chez les femmes enceintes.

La résistance à cette molécule est médiée par des mutations ponctuelles au niveau des codons 436, 437, 540, 581 et 613. Ces différentes mutations sont prépondérantes en Afrique de l'Est mais en Afrique de l'Ouest, les mutations les plus rencontrées sont celles observées au niveau des codons 436, 437 et 540 (Lumb V, 2009). Cette évaluation vient donc rapporter la façon dont se comportent ces mutations au sein des porteurs asymptomatiques du *Plasmodium falciparum*.

5.3.3 La zone d'étude et période d'étude

Le choix de la zone d'étude a tenu compte de la prévalence élevée du paludisme simple (14,8%) dans le département du Littoral qui couvre l'aire géographique de Cotonou. En effet, la transmission du paludisme est très élevée dans ce département, du fait de l'intensité des précipitations dans la région durant la saison pluvieuse et de sa situation géographique dont le niveau est en dessous de celui de la mer, entre le lac Nokoué et l'Océan Atlantique.

Les 8ème et 10ème arrondissements ont été choisis car les hôpitaux Béthesda et Saint Luc y sont respectivement situés. De même, il importait que les souches étudiées soient de la même aire géographique. Ces hôpitaux ont été retenus en raison de leur accessibilité géographique et de leur taux de fréquentation élevé. Pour ces mêmes raisons, les écoles publiques où ont eu lieu le recrutement des enfants asymptomatiques ont été choisies dans la même zone.

Il est important de préciser que cette étude a été menée sur une période de trois mois et nous pensons que la plupart des souches présentant des mutations au sein des gènes pfcrt et pfmdr1 circulant sur ce site ont été détectés.

5.3.4 Techniques de mise en œuvre

L'examen paraclinique utilisé pour confirmer le diagnostic de monoinfection à *Plasmodium falciparum* dans l'étude est la GE/FS, recommandée par l'OMS et appliquée

dans la plupart des études épidémiologiques du fait de son coût de réalisation bas, de la combinaison sensibilité-spécificité élevées et de sa simplicité.

La technique d'extraction de l'ADN utilisée est celle au chelex-100, retrouvée dans plusieurs études du fait de sa grande sensibilité et de sa moindre toxicité **(**Bereczky S, 2005**).**

Pour l'analyse des marqueurs moléculaires de résistance pfcrt et pfmdr1, la technique de la Nested PCR ou PCR "nichée" (pour augmenter la sensibilité de la technique de la PCR) couplée à la RFLP a été utilisée. Cette méthode a été utilisée par Djimdé et coll en 2001 au Mali, Mahamat H et coll en 2008 au Burkina faso et Figueiredo et coll en 2008.

Ces deux gènes ont été choisis pour conduire l'étude car des recherches antérieures ont démontré qu'il existe une relation significative entre l'existence à leur niveau d'une mutation et la résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine. Leur présence couplée est donc intéressante pour la mise en évidence de la chloroquino- résistance sur un site donné.

Parmi les différentes techniques utilisées pour rechercher la prévalence des mutations ponctuelles au niveau des différents codons du gène pfdhps, nous avons choisis la PCR-RFLP pour plusieurs raisons. Il s'agit d'une part d'une méthode couramment utilisée du fait de sa grande spécificité et de la relative facilité de sa mise en œuvre, du point de vue de l'équipement et du coût des réactifs. D'autre part, elle permet de rechercher simultanément plusieurs mutations (Wilson PE, 2005). La PCR nichée a été effectuée pour augmenter la sensibilité de la technique d'amplification.

5.3.5 Des résultats obtenus

5.3.5.1 Les résultats de l'enquête sociodémographique pour l'évaluation de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine

La moyenne d'âge était de 8,2 ans pour les enfants asymptomatiques et 7,6 ans pour les enfants malades. (Mann Whitney U : $p > 0,01$). La différence entre les moyennes d'âge observée dans les deux groupes n'est pas statistiquement significative. Il existe donc une homogénéité au sein des deux groupes d'enfants par rapport à l'âge.

L'échantillon se caractérise par une distribution équitable des deux sexes dans les deux groupes avec un sexe ratio de 1,2 chez les enfants asymptomatiques en faveur du sexe féminin et de 1,5 chez les enfants malades en faveur de celui masculin. ($Chi^2 : p > 0,05$).

Dans plusieurs études portant sur le paludisme, les enfants de moins de 5 ans sont souvent plus représentés. Aubouy et coll. ont retrouvé un âge moyen de 3,9 ans (Aubouy A, 2003) tandis que chez Tekete et coll. il est de 2,92 ans dans le groupe des sujets traités par la SP en 2009.

Les différences observées entre les deux groupes par rapport aux autres résultats ne pourront donc être ni liées à l'âge, ni au sexe. Les résultats sont en adéquation avec les travaux menés par Susan et coll au Sénégal en 2002.
Dans la population d'étude 50,4% des enfants sont de sexe féminin. Ce résultat est supérieur à celui d'Aubouy et coll qui ont retrouvé 43% d'enfants de sexe féminin en 2003**.** La distribution relativement équitable des 2 sexes dans la population d'étude est superposable à celle retrouvée dans la population béninoise en 2008.
Il n'existe pas de différence statistiquement significative (p= 0,13) entre le sexe et le statut clinique.

5.3.5.2 Résistance de *Plasmodium falciparum* à la Chloroquine

a) Résultats de la PCR

Il y a eu 19 échantillons sur 131 pour lesquels la Goutte Epaisse est positive et la PCR négative.
Cette discordance pourrait s'expliquer par le fait que les amorces n'ont pu s'apparier comme elles le devraient sur les régions des gènes de résistance pfcrt et pfmdr1, ou peut-être par la présence de l'hémoglobine ou du Chelex qui sont reconnus comme des éléments inhibiteurs de la PCR.

b) **Prévalence de la mutation T76 au sein du gène pfcrt**

Au sein de la population d'étude (112 enfants dont la PCR RFLP est positive pour les deux gènes), la prévalence de la mutation T76 est de 85,2%. Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Figueiredo et coll en 2005 en Angola qui montraient une proportion très élevée de souches mutantes 93,9% pour le gène pfcrt au sein de leur population d'étude.
Ensuite pour le groupe clinique, on note une forte proportion de souches mutantes T76 respectivement de 82% au sein du groupe des enfants asymptomatiques et de 85,7% dans le groupe des enfants malades. Ce gène pfcrt étant plus associé à la résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine ; ce résultat permettrait de prédire un taux d'échec thérapeutique à cette molécule relativement élevé dans le groupe des enfants malades. De plus, la prévalence élevée de la mutation chez les enfants asymptomatiques pourrait s'expliquer par la prise incontrôlée de la molécule malgré son retrait du marché chez ces enfants lors d'accès antérieurs maltraités à la chloroquine. En effet, bien qu'étant asymptomatiques au recrutement ; ces enfants au vue de leur âge auraient eu à faire déjà plusieurs épisodes de paludisme.

Tout ceci favoriserait davantage une augmentation des souches résistantes à la chloroquine du fait de la pression médicamenteuse continue. Cela pourrait aussi s'expliquer par l'adoption dans les nouvelles politiques de lutte contre le paludisme simple des CTA comportant des drogues de structure similaire à la chloroquine telle que l'Amodiaquine et la Pipéraquine (amino-4-quinoleine) source de résistance croisée et donc de maintien de la chloroquino-résistance. Nous supposons donc que l'utilisation extensive de molécules appartenant à la même famille que la chloroquine pourrait maintenir la pression sur la mutation T76 du gène pfcrt (ZHANG GQ, 2009).

c) Prévalence de la mutation Y86 au sein du gène pfmdr1

Contrairement à la forte prévalence de la mutation T76, il a été constaté un faible taux 35,7% de la mutation au niveau du codon 86 du gène pfmdr1 au sein de la population d'étude. Le résultat est similaire à l'étude menée en chine en 2009 par Zhang et collaborateurs.

Les études sur la relation entre la mutation Y86 et la résistance à la chloroquine ont donné des résultats contradictoires. En effet, des dernières études menées en Chine par Guan et al en 2005, il n'a été démontré aucun lien entre la mutation Y86 et la résistance à la chloroquine. Il a plutôt été rapporté que cette mutation Y86 serait plus associée à une diminution de la sensibilité du *Plasmodium falciparum* à la Méfloquine et à l'artémisinine (Duraisingh, 2000). Par conséquent le faible taux noté peut supposer que la sensibilité à la Méfloquine et à l'artémisinine doit être étroitement surveillée au Bénin. Aussi la surveillance de la résistance à la chloroquine doit elle se baser plus sur le marqueur moléculaire de résistance pfcrt.

d) Prévalence des doubles mutations T76-Y86

La prévalence de la double mutation T76-Y86 dans la population d'étude est de 11,6%. Suivant le statut clinique, on note que la prévalence est relativement élevée chez les enfants asymptomatiques (16,2%) que chez les sujets malades (2,6%).

Notons que, le fait de porter cette double mutation ne sous-entend pas un plus fort taux d'échec thérapeutique à la chloroquine puisque suivant ce qui a été dit précédemment, le gène pfmdr1 n'est pas un marqueur très spécifique de la résistance à la chloroquine.

5.3.6 Résistance de *Plasmodium falciparum* à la Sulfadoxine

a) Taux de portage de *Plasmodium falciparum*

Le taux de portage de *Plasmodium falciparum* de 7,6% dans notre population est inférieur à celui de 61%, observé par NTOUMI et coll au Gabon en 2001.
Cette différence pourrait être liée à une meilleure observation des mesures de lutte contre le paludisme, d'une part, à savoir l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides et, d'autre part à l'accessibilité économique des antipaludiques.
Elle pourrait également être liée au fait que la transmission du paludisme au Bénin serait plus faible que celle du Gabon qui est un pays jouissant d'un climat équatorial caractérisé par une forte pluviométrie continue et donc une transmission intense et permanente. Le taux de portage élevé au Gabon peut s'expliquer aussi par la méthode de diagnostic utilisée.
En effet, les auteurs ont utilisé la microscopie optique combinée à la PCR, dont la sensibilité serait deux fois plus élevée selon certaines études (Mockenhaupt FP**,** 2000 ; Nsobya S L, 2008).

b) Taux de positivité du gène pfdhps

Le taux de positivité au niveau des codons 436, 437 et 540 du gène Pfdhps de la population d'étude varie de 48,9% à 50,4%.
Ces taux sont inférieurs à ceux de plusieurs auteurs à savoir :
- Djaman et coll ont obtenu 70,7% en Côte d'ivoire en 2010.
- Ahmed et coll ont obtenu 75% par une variante de la PCR-RFLP, la MS-PCR en 2004 ;
- Bonnet et coll. ont obtenu 75,1% par PCR-SSOP en 2007
- Aubouy et coll, ont obtenu 88,7% par PCR en temps réel en 2005.

Ce taux de positivité relativement bas peut s'expliquer d'une part, par la forte proportion dans la population d'études de sujets asymptomatiques ayant une densité parasitaire inférieure à 200 trophozoïtes/µl comparativement aux populations d'études de Djaman et coll, Ahmed et coll, Bonnet et coll ayant comme critère d'inclusion une densité parasitaire supérieure à 1000 trophozoïtes/µl.
D'autre part, par le fait que la sensibilité des amplifications du gène Pfdhps est peu élevée comparativement à celle du gène Pfdhfr (88,4%) rapporté par Bonnet et coll , (91,3%) rapporté par Ahmed et coll. et des gènes pfdhfr, pfcrt et pfmdr-1 (96%) rapporté par Djaman et coll.

c) **Prévalence des mutations au niveau des codons 436, 437 et 540**

La prévalence des mutations au niveau des codons 436 et 437 dans l'étude est respectivement de 10,6% et de 7,6%.

Les résultats diffèrent de ceux rapportés par différents auteurs :

- Bonnet et coll. qui signalent en Guinée des prévalences respectives de 27,2 et 33,3% au niveau des codons 436 et 437.
- Ndiaye et coll. rapportent au Sénégal une prévalence des mutations au niveau des codons 436 et 437 respectivement de 21 et de 40%.
- Aubouy et coll. rapportent au Gabon une prévalence des mutations au niveau des codons 436 et 437 respectivement de 28,2 et de 57,3%.
- Dicko et coll. à Kolokani au Mali ont retrouvé une prévalence de mutation de 20% au niveau du codon 437**.**
- Staedke et coll. à Kampala en Uganda ont retrouvé une prévalence de mutation de 24% au niveau du codon 437**.**

Il n'est pas aisé de lier ces taux bas à la faible résistance de *Plasmodium falciparum*. En effet pendant que la mutation au niveau du codon 437 est fortement associée aux échecs thérapeutiques (Kublin J G, 2002 Triglia T, 1998 ; Talisuna 2004), la mutation au niveau du codon 436 joue un rôle moins clair dans l'émergence des échecs thérapeutiques, car peu d'études portant sur le codon 436 ont été réalisées du fait de sa faible prévalence, en Afrique (Alker A P, 2008).

De même les mutations au niveau du gène Pfdhps ne sont pas les premières à apparaître dans l'émergence de la résistance à la SP (Lumb V, 2009, Roper C, 2003). Seule une étude ultérieure complémentaire pour rechercher les mutations au niveau du gène Pfdhfr pourrait aider à conclure vis-à-vis de la résistance du parasite à la Sulfadoxine-Pyriméthamine dans notre population d'étude. Cette étude ultérieure permettrait de mieux fixer les relations de cause à effet entre les 50 % de résistance *in vivo* à la SP au Sud du Bénin révélés par Aubouy et coll (Aubouy, 2007).

Parmi les facteurs qui pourraient expliquer les mutations observées, il faut noter une pression médicamenteuse liée à l'utilisation de la SP, même si elle n'a jamais été utilisée comme antipaludique de première ligne, mais plutôt de deuxième intention dans le traitement curatif du paludisme simple.

Par contre d'autres sulfamidés tel que le Trimétoprime-Sulfamétoxazole (Cotrimoxazole) les plus souvent prescrits aux enfants souffrant de gastro- entérites ou dans le traitement

des affections opportunistes chez les PV- VIH peuvent induire une pression médicamenteuse.

Néanmoins, il serait aussi difficile de lier cette pression médicamenteuse à l'utilisation de la Sulfadoxine-Pyriméthamine donnée à la femme enceinte en TPI, car cette utilisation réduirait plutôt la pression médicamenteuse exercée sur le parasite. Dans le même ordre d'idée Dicko et coll. à Kolokani au Mali ont démontré que le TPI (chez les enfants) à la SP ne constitue pas un facteur favorisant d'émergence de résistance (Dicko A, 2010).

Enfin ces mutations peuvent également être dues aux brassages des populations humaines et anophéliennes entre le Bénin et les pays voisins (présentant des taux de mutation modérées ou élevées) (Djaman A J, 2002, PLOWE C V, 2007).

Aucune mutation n'a été retrouvée au niveau du codon 540 dans notre population d'étude. La présence de la mutation au niveau du codon 540 selon l'aire géographique d'étude. Ainsi une étude multicentrique en Afrique réalisée en 2004 a révélé que cette mutation est rare en Afrique de l'Ouest tandis qu'en Afrique de l'Est, elle est souvent rencontrée (Picot S, 2009).

En effet Djaman et coll en Côte d'ivoire, Ndiaye et coll au Sénégal, Aubouy et coll, au Gabon**,** Dicko et coll. au Mali qui ont retrouvés des taux respectivement, de 0 %, 0 %, 0 % et 1 % tandis que Staedke et coll. à Kampala en Uganda ont retrouvé une prévalence de 43 %.

Par ailleurs, des études ont montré que la mutation 540 lorsqu'elle existe est fortement associée aux échecs thérapeutiques**.**

En ce qui concerne la double mutation au niveau des codons 436 et 437, elle est relativement faible dans notre population d'étude, soit 1,5%. La preuve d'une responsabilité de cette double mutation dans les échecs thérapeutiques n'a pas été faite.

Par contre il a été prouvé qu'en Afrique de l'Est, les mutations au niveau des codons 437 et 540 du gène Pfdhps, associées à la triple mutation au niveau des codons 51, 59, 108 du gène Pfdhfr prédisent des échecs thérapeutiques à la Sulfadoxine- Pyriméthamine notamment au Kenya, au Malawi et en Ouganda (Picot S, 2009 ; Omar SA, 2001 ; Staedke 2004).

d) Prévalence des mutations au niveau des codons 436 et 437 dans chaque groupe clinique

Aucun lien statistiquement significatif n'existe entre le groupe clinique et la présence d'une mutation au niveau du codon 436 ou 437.

Notre étude se rapproche de celle de Gesase et coll. en Tanzanie qui n'ont pas lié les échecs thérapeutiques à la SP observés au statut clinique (Gesase S, 2009).

La densité parasitaire peut influer sur l'émergence des mutations. Alker et coll. au Congo ont démontré que les mutations Pfdhps ont un impact plus élevé sur les échecs thérapeutiques à la SP chez les enfants ayant une DP élevée. Ainsi pour les enfants ayant une DP inférieure à 45 trophozoïtes /µl, le risque d'échec thérapeutiques était de 37 % en cas de double mutation au niveau des codons 437 et 540 et de 21 % en absence de mutation au niveau de ces codons.

Par contre chez les enfants ayant une DP supérieure à 45 parasites /µl, le risque d'échec thérapeutiques était de 58 % et de 8 % respectivement pour les enfants ayant les deux mutations ou n'ayant pas de mutation au niveau de ces codons (Alker A P, 2009).

e) Distribution des génotypes des souches plasmodiales au niveau des codons 436 et 437

La prévalence des souches mixtes dans notre étude est, au niveau des codons 436 et 437 respectivement de 4,5 % et 3 %.

Cette valeur est inférieure à celle de 6,4 % au niveau de chaque codon 436 et 437 retrouvée par Aubouy et coll au Gabon et à celle de 22% observée au niveau du codon 437 par Nfor et coll. à Ndu au Cameroun (Nfor E N, 2003).

Ces faibles prévalences des souches mixtes, au niveau de chaque codon 436 et 437, observées dans notre étude traduisent une transmission relativement modérée dans le département, confirmée par la prévalence du paludisme de 17,4% (Ministère de la sante, 2008) et le taux de portage de *P falciparum* qui est de 7,6%.Tout ceci peut s'expliquer par l'adhésion de la population aux différentes méthodes de lutte contre le paludisme mis en place par le ministère de la santé, en l'occurrence l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides. Cette corrélation a été précédemment faite par Pearce et coll (Pearce R J, 2003).

Conclusion partielle

La deuxième partie de la recherche porte sur l'évaluation des TDR et Cyscope en référence à la goutte épaisse et la seconde sur l'évaluation des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine pyrimethamine et à la chloroquine.

Le diagnostic biologique du paludisme, en dehors de la GE, peut être réalisé grâce aux techniques de diagnostic rapide qui apparaissent comme fiables rapides et moins onéreuses. Il ressort également qu'un taux élevé de fièvres supposées palustres reste non confirmé par la biologie. Les deux techniques de diagnostic rapide (TDR et Cyscope®) avec leur sensibilité et leur spécificité, les conditions d'utilisation assez faciles, et les coûts assez raisonnables peuvent être vulgarisées comme outil de diagnostic en zone d'endémie et dans les zones périphériques dépourvues d'électricité. Les performances obtenues avec le TDR réalisable en 20 minutes et le Cyscope® en 8 minutes, sont bonnes. Cependant d'autres études à grande échelle sur le Cyscope® sont nécessaires avant sa vulgarisation dans les formations sanitaires du pays. Ces techniques contribueront à améliorer la prise en charge thérapeutique et à gérer la pharmacorésistance du *Plasmodium* aux nouveaux antipaludiques.

L'étude sur « la prévalence des mutations ponctuelles du gène pfdhps dans le département du Littoral » a révélé que :

Le taux de portage de *Plasmodium falciparum* dans le département du Littoral est de 7,6% ; la prévalence des mutations au niveau des codons 436, 437 est encore faible au niveau du site d'étude. La sulfadoxine conserve donc une relative efficacité sur les souches de *Plasmodium falciparum* dans le département du Littoral.

La présence de la double mutation au niveau des codons 436 et 437 ne nous permet pas de prédire d'une augmentation ou non du taux d'échec thérapeutique à la sulfadoxine. La prévalence des souches mixtes au niveau des codons 436 et 437 est respectivement de 4,5% et 3% ce qui traduit une transmission relativement modérée du paludisme dans ce département conformément à l'étude de Pearce et coll.

Il n'a pas été mis en évidence, de relation directe entre le statut clinique et la présence de mutation au niveau des codons 436 et 437.

En ce qui concerne la chloroquine, les résultats de la PCR montrent d' une part une forte proportion au sein des deux groupes cliniques asymptomatiques, malades respectivement de 84,6% et 85,7% pour l'allèle muté pfcrt T76; d'une proportion de mutants Y86 également élevée 51,50% dans le groupe des enfants asymptomatiques contre 3,10% chez les malades et d'autre part de la présence statistiquement significative de souches mixtes au sein des deux populations d'étude. Aussi les doubles mutants T76-Y86 sont représentés de façon non négligeable dans ces deux populations d'étude.

Des études ultérieures sur un échantillon plus large pourraient conduire à de meilleures conclusions.

Troisième partie
Prévention du paludisme

Chapitre 6
Evaluation post campagne de distribution des MIILD pour la couverture universelle en 2011

6.1 Matériels et méthodes

6.1.1 Enquête auprès des ménages

a) Type d'enquête et méthode d'échantillonnage

Il s'agit d'une étude transversale quantitative qui a couvert les douze départements et qui a comporté les volets:

- couverture des ménages en MIILD au cours de la campagne de distribution gratuite en Juillet 2011;
- raisons de non réception de MIILD par certains ménages;
- utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) par les groupes vulnérables (enfants de moins de 5 ans, femmes enceintes);
- couverture des ménages en MII après la campagne gratuite de juillet 2011.

La méthode d'échantillonnage qui a été utilisée est celle de sondage par grappes à deux degrés de type OMS. Les données ont été analysées par département. Dans chacun des départements, une liste alphabétique des villages par commune et un cumul des populations des villages et quartiers de ville ont été établis.

Au niveau de chaque département, on a procédé à la sélection de 40 grappes. Pour tirer les grappes, les données de population du 3ème recensement général de la population et de l'habitation (RGPH3) réalisé au Bénin en 2002 ont été utilisées. Les populations par village ou quartier de ville ont été cumulées et un pas de sondage calculé. Le tirage de la première grappe a été fait en utilisant un nombre au hasard.

Le 2ème degré a consisté au choix des ménages. Dans la grappe, le premier ménage à enquêter provient d'une liste de ménages qui ont été choisis de façon aléatoire à partir du registre de recensement de la localité mis en place pendant la distribution des coupons. Le premier ménage retrouvé dans la liste précédente est la porte d'entrée dans la grappe. L'ensemble d'une grappe a été complété en progressant de proche en proche suivant un pas de 10 dans les milieux urbains (Cotonou, Porto-Novo, Parakou, Bohicon, Abomey, Djougou, Natitingou, Kandi…..) et un pas de 5 en milieu rural.

b) Cibles et taille de l'échantillon

La taille attendue de l'échantillon par département est de 40 grappes de 10 ménages soit 400 ménages, qui ont été enquêtés par département ce qui correspond à 4800 ménages pour l'ensemble des 12 départements que compte le pays.

c) Informations recueillies

Pour l'enquête de couverture en MIILD et les raisons de non réception deux questionnaires d'enquête ont été utilisés pour interviewer individuellement les chefs ménages ou leurs représentants. Les informations suivantes ont été recueillies: âge, sexe, raisons de non réception de MIILD, canaux d'information, les coupons, l'utilisation des MIILD par les groupes vulnérables, le nombre de personnes par ménage, le nombre de MIILD par ménage, le nombre de MII par ménages après la campagne et les raisons de non réception.

L'enquête auprès des ménages permettra d'atteindre les objectifs d'évaluation de la couverture de la population.

6.1.2 Enquête au niveau des services de santé

a) Echantillonnage des centres de santé

L'enquête a été effectuée dans un seul centre de santé par commune. Il a été tenu compte des spécificités de Cotonou et de Porto-Novo soit un complément de 8 centres de santé portant l'effectif des centres de santé enquêtés à 85. Dans les centres de santé il a été interviewé le chef de poste du centre de santé ou son représentant susceptible de répondre aux questions liées à la campagne de distribution de MIILD en Juillet 2011.

b) Informations collectées

Un questionnaire d'enquête a été utilisé pour interviewer les responsables des centres de santé. Les informations recueillies ont concerné l'organisation, la coordination, la mobilisation sociale, la micro planification, le financement, la mobilisation des ressources, la logistique, les sources d'information sur la campagne, les stocks de MIILD restants, la gestion des déchets.

c) Collecte des données

Les enquêteurs ont été recrutés par département sur proposition des responsables de chaque DDS à raison de quatre enquêteurs par département et un contrôleur. Ils sont : infirmiers, Sages-femmes, assistants-sociaux et socio-anthropologues. Les contrôleurs ont été des médecins chefs de commune. Dans le souci d'éviter des biais liés à la collecte des informations, les enquêteurs ont été déployés dans un département autre que celui de leur provenance ou d'exercice.

La validation du protocole a permis de faire une synthèse de la conduite à tenir par les enquêteurs et contrôleurs sur le terrain. Cette synthèse est matérialisée dans un

document: le « manuel des enquêteurs ». Il donne la conduite à tenir sur le terrain pour la collecte des données (identification du 1er ménage de chaque grappe et indications complémentaires pour le remplissage des fiches d'enquête). Il résume les informations sur la collecte et aborde les diverses situations auxquelles les enquêteurs pourraient être confrontés.

Le manuel a servi de support de base pour la session de formation et a été présenté aux équipes suivant les étapes ci-dessous:

- Connaître les objectifs de l'enquête de couverture vaccinale.
- Maîtriser la structure des questionnaires à utiliser pour la collecte des données et l'importance de chaque élément contenu dans ces questionnaires.
- Maîtriser les méthodes d'identification des ménages: 1er ménage d'abord et les ménages suivants après.
- Connaître comment conduire un entretien avec les chefs ménages pendant l'enquête.
- Connaître la façon d'enregistrer correctement les données collectées sur les formulaires.
- Connaître les rôles et les responsabilités de chaque membre de l'équipe de collecte.

La formation organisée au profit de 48 enquêteurs et 12 contrôleurs, s'est déroulée le vendredi 25 novembre 2011 dans les locaux du Chant d'Oiseau de Cotonou sous la supervision des consultants. Elle a connu la participation effective du Coordonnateur National du PNLP et de son Adjoint du même que le Chef service Suivi / Evaluation dudit programme.

6.1.3 Pré test et finalisation des outils:

Organisés en équipe de 4 enquêteurs avec à la tête un contrôleur et par provenance, les participants ont effectué le prétest des outils l'après-midi de la journée de formation. Douze (12) villages des 7ème, 11ème et 12èmearrondissements de Cotonou ne contenant pas de grappes à enquêter pour l'évaluation proprement dite ont été les sites de pré-test pour la fiche N°1 et N°2. Les outils finalisés ont été ensuite multipliés et mise à la disposition des membres des équipes avec le matériel logistique pour le départ dans les départements.

6.1.4 Déroulement de la collecte

L'enquête s'est déroulée du 28 Novembre au 03 Décembre 2011 conformément au chronogramme retenu. Il est à observer que les équipes des départements de l'Alibori ont poursuivi la collecte des données jusqu'au lundi 5 Décembre 2011.

Dans chaque département, les données ont été collectées par deux équipes de deux enquêteurs et un contrôleur. Dans chaque grappe les enquêteurs ont été appuyés par un guide ou un crieur public identifié dans la localité en collaboration avec le délégué du village ou avec l'aide du chef poste de centre de santé. Chaque équipe a couvert en moyenne deux (4) grappes par jour selon les localités. Il faut mentionner les difficultés de démarrage les premiers jours de l'enquête dans les départements de l'Ouémé, du Plateau, de l'Alibori qui ont accusé un retard du fait des formalités administratives à la DDS.

Les techniques utilisées pour la collecte de données sont les interviews directes structurées et l'observation après l'obtention du consentement du chef de ménage.

6.1.5 Ressources humaines

Pour la réalisation de l'étude, les ressources humaines ci-après ont été mobilisées :

- 03 consultants (un médecin de santé publique, un statisticien, un socio-anthropologue);
- 04 superviseurs nationaux;
- 48 enquêteurs;
- 12 contrôleurs de terrain;
- 04 agents de saisie;
- 16 chauffeurs;
- 480 guides de terrain.

6 .1.6 Assurance qualité de la collecte des données

Des contrôleurs au nombre de douze (12) (à raison d'un contrôleur pour deux équipes) ont effectué la validation des données collectées au niveau de chaque grappe. Un rapport de contrôle est produit par chaque superviseur de proximité et par commune, de même un rapport synthèse sur la collecte des données a été élaboré. Ils ont vérifié entre autre: i) le respect de la méthodologie de recrutement des ménages, la complétude des fiches d'enquête.

6.1.7 Traitement et analyse des données

Après contrôle de l'exhaustivité des fiches de collecte transmis par les équipes provenant des différents départements, il a été procédé:

- à la formation des agents de saisie
- à la codification
- à la saisie
- au contrôle des données saisies
- au traitement

a) Formation des agents de saisie

Quatre agents qualifiés habitués à la saisie des données ont été briefés sur la saisie des données à l'aide du logiciel EPIDATA. Les différentes fonctionnalités du LOGICIEL nécessaires pour la saisie ont été enseignées aux agents. La formation des agents a duré 2 jours. Un test a été réalisé en fin de briefing pour s'assurer de l'assimilation et de la compétence des agents.

b) Codification

La codification des modalités de quelques variables a été réalisée par les agents de saisie formés. Cette étape a permis aussi de faire une vérification de la complétude des informations recueillies par les agents de collecte.

c) Saisie

La saisie des données a été faite avec le logiciel EPIDATA.

L'assurance qualité a été fortement recherchée au cours de la saisie à travers:

- la réalisation de la double saisie des questionnaires

La double saisie a été systématiquement faite pour toutes les fiches de collecte de données afin de rendre conformes des données saisies à celles qui figurent sur les questionnaires.

- le contrôle des données lors de la saisie

Des modules de contrôles et de validité des données ont été introduites dans les masques de saisie afin d'éviter les erreurs de cohérences internes entre variables.

Enfin, la réalisation d'un programme d'apurement des données pour débarrasser la base constituée d'informations inexactes qui auraient échappé aux étapes précédentes.

d) Analyse des données

Les données ainsi apurées ont été transférées dans un fichier Microsoft Access puis en Excel pour y subir des traitements nécessaires suivant un plan d'analyse initialement proposé par le consultant pour le calcul des indicateurs et la production des rapports.

6.1.8 Collecte des données sur les emballages de MIILD

Les emballages de MIILD ont été collectées dans les trente-quatre zones sanitaires par des camions ayant effectué plusieurs tours de ramassage. Au niveau de chaque bureau de zone sanitaire, 6 manœuvres sont recrutés pour aider l'équipe de convoyage à charger les emballages vides. Ces emballages sont ensuite convoyés vers le site de destruction à Pahou (Ouidah) où 6 manœuvres assurent le déchargement. A chaque chargement et déchargement un membre de l'équipe de recherche était présent pour suivre les opérations avec le PNLP. A la fin du ramassage, les emballages ont été broyés. Les broyats seront utilisés pour fabriquer des produits utiles pour la société.

6.2 Résultats évaluation post campagne MIILD 2011

Le présent chapitre présente les résultats issus de l'évaluation rapide de la campagne de distribution des MIILD sur l'ensemble du territoire national, avec un échantillon de 4800 ménages.

6.2.1 Caractéristiques de l'échantillon

L'ensemble des 4800 ménages attendus ont participé à l'enquête. Les données collectées ont intéressé le sexe des chefs de ménages, leur âge, la zone d'installation des ménages, la taille moyenne des ménages, le nombre moyen de personnes dans les ménages enquêtés qui ont dormi sous moustiquaire imprégnée la veille de l'enquête, les caractéristiques des enfants de moins de 5 ans et des femmes enceintes dans les ménages.

Ainsi 45% des chefs ménages qui ont été interrogés sont de sexe féminin et 55% de sexe masculin. Au total 2991 ménages enquêtés soit 62% résident en milieu rural et 38% en milieu urbain.

Tableau XLIV: Répartition des chefs ménages enquêtés suivant le sexe et le milieu de résidence.

Zone \ sexe	Féminin		Masculin		TOTAL
	N	**%**	**N**	**%**	
Rurale	1219	41	1772	59	2991(62%)
Urbaine	954	53	855	47	1809(38%)
TOTAL	**2173**	**45**	**2627**	**55**	**4800**

Environ trois chefs de ménages sur quatre ont entre 15 et 49 ans soit 72%. L'âge moyen est de 41 ans.

Tableau XLV: Répartition des chefs ménages enquêtés suivant l'âge et le département

Trancha âge Département	15 – 49 ans	50 ans et plus	Age moyen
Atacora	289	111	42
Donga	276	124	44
Alibori	294	106	40
Borgou	286	114	42
Collines	311	89	41
Zou	272	128	42
Mono	299	101	41
Couffo	277	123	42
Ouémé	292	108	40
Plateau	254	146	45
Atlantique	304	96	40
Littoral	310	90	39
Total	**3464**	**1336**	**41**

La taille moyenne des ménages enquêtés a été de sept (7) avec des variations ; la taille minimale a été de cinq (5) dans les départements de l'Alibori, de l'Ouémé, du Zou et du Littoral. La taille maximale de dix (10) membres au niveau des ménages a été enregistrée dans le département du Borgou.

Tableau XLVI: Taille moyenne des ménages, suivant le département**.**

Département	Taille moyenne des ménages	IC inf.	IC sup.
Atacora	6	5,89	6,72
Donga	7	6,91	7,42
Alibori	5	5,09	6,36
Borgou	10	8,95	12,68
Collines	6	6,04	7,29
Zou	5	5,17	6,97
Mono	6	5,46	6,60
Couffo	9	8,17	10,92
Ouémé	5	5,12	6,17
Plateau	6	5,63	7,32
Atlantique	7	6,50	7,89
Littoral	5	5,06	6,11
Total	**7**	**6,45**	**7,04**

Pour les 4800 ménages enquêtés, 3182 ont comporté des enfants de moins de 5 ans soit 66%. Le nombre moyen d'enfant de moins de 5 ans par ménage a été de un (1) enfant avec un maximum de deux (2) dans les départements de Borgou et du Couffo.

Tableau XLVII: Caractéristiques des enfants de moins de 5 ans par département et milieu de résidence

	% ménages aves au moins un enfant de moins de 5 ans			Nombre moyen d'enfant de moins de 5 ans par ménage		
Département	**%**	**IC inf.(%)**	**IC sup. (%)**		**IC inf.**	**IC sup**
Atacora	65	63,86	66,14	1	0,95	1,15
Donga	72	70,83	72,67	1	1,27	1,53
Alibori	63	62,06	64,44	1	0,94	1,13
Borgou	67	66,19	68,31	2	1,62	2,10
Collines	74	73,16	74,85	1	1,11	1,31
Zou	60	58,70	61,30	1	0,82	1,00
Mono	63	61,54	63,96	1	0,90	1,09
Couffo	72	70,83	72,67	2	1,40	1,71
Ouémé	64	63,09	65,41	1	0,95	1,53
Plateau	62	60,25	62,75	1	0,92	1,13
Atlantique	72	71,09	72,91	1	1,15	1,38
Littoral	62	60,77	63,24	1	0,82	1,00
Total	**66**	**65,98**	**66,61**	**1**	**1,16**	**1,25**

Les ménages comportant des femmes enceintes représentent 14% (652/4800). La proportion la plus faible (10%) a été enregistrée dans les départements de l'Atacora et du Plateau et la plus élevée a été notée dans le département du Borgou (19%).

Tableau XLVIII: Caractéristiques des femmes enceintes au sein des ménages enquêtés

	% de ménages avec au moins une femme enceinte		Nombre moyen de femme par ménage
Départements	**effectifs**	**%**	**Effectifs**
Atacora	39	10	0,1
Donga	50	13	0,1
Alibori	54	14	0,1
Borgou	74	19	0,2
Collines	68	17	0,2
Zou	48	12	0,1
Mono	55	14	0,1
Couffo	72	18	0,2
Ouémé	50	13	0,1
Plateau	40	10	0,1
Atlantique	60	15	0,2
Littoral	42	11	0,2
Total	**652**	**14**	**0,2**

6.2.2 Couverture des ménages en MIILD par la campagne

Les données collectées dans les 4800 ménages ont concerné : i) la distribution des coupons, ii) la proportion des ménages qui ont reçu au moins une MIILD durant la campagne et celle qui ont reçu pour la 1ère fois une MIILD, iii) la proportion de ménages ayant reçu le nombre requis de MIILD.

a) Informations sur la réception des coupons

Elles ont été validées dans 4290 cas soit une couverture de 89%. La plus faible couverture est observée dans l'Ouémé (80%) et la plus élevée dans le département de la Donga (97%). En milieu rural elle a été de 92% contre 86% dans les milieux urbains. Le tableau ci-dessous présente le récapitulatif des résultats avec les intervalles de confiance à 95%.

Tableau XLIX: Répartition des ménages qui ont reçu un coupon

Département	Effectif	%
Atacora	383	96
Donga	387	97
Alibori	365	91
Borgou	373	93
Collines	369	92
Zou	357	89
Mono	337	84
Couffo	356	89
Ouémé	321	80
Plateau	349	87
Atlantique	366	92
Littoral	327	82
Total	**4290**	**89**
Milieu de résidence		
Milieu rural	2743	92
Milieu urbain	1547	86

b) Couverture en MIILD des ménages au cours de la campagne 2011

Les résultats ont concerné les ménages qui ont reçu au moins une MIILD au cours de la campagne et ceux qui ont reçu pour la 1ère fois une MIILD.

- Sur la cible enquêtée, 4147 ménages ont reçu au moins une MIILD au cours de la campagne de distribution gratuite de moustiquaires de 2011 soit 86% ; la proportion la plus élevée a été de 95% dans les départements de la Donga, puis la plus faible de 77% dans l'Ouémé ;
- et 2691 sur les 2991 ménages enquêtés en milieu rural ont reçu au moins une MIILD durant la campagne de distribution soit 90% ;
- En milieu urbain cette proportion a été de 80% (1456/1809)
- Environ la moitié des ménages enquêtés ont reçu pour la 1ère fois une MIILD soit 51% des cas ;
- Cette proportion a été de 55% en milieu rurale contre 44% en milieu urbain
- On observe des variations importantes dans les départements pour la proportion des ménages qui ont reçu leur 1ère MIILD au cours de la campagne avec une couverture de 21% dans le Littoral contre 85% dans le département de l'Atacora. Le tableau ci-dessous fait le point de la répartition des ménages couverts par la

distribution de MIILD avec un intervalle de confiance à 95%.(voir compléments en annexe 4)

Tableau L: Répartition des ménages couverts en MIILD par département et par milieu de résidence

	Ménages qui ont reçu au moins une MIILD pendant la campagne de 2011		Ménages qui ont reçu leur 1ère MIILD pendant la campagne de 2011	
départements	**Effectifs**	**%**	**Effectifs**	**%**
Atacora	375	94	338	85
Donga	379	95	259	65
Alibori	357	89	223	56
Borgou	358	90	187	47
Collines	369	92	152	38
Zou	345	86	185	46
Mono	317	79	193	48
Couffo	354	89	266	67
Ouémé	307	77	153	38
Plateau	342	86	245	61
Atlantique	348	87	152	38
Littoral	296	74	84	21
Total	**4147**	**86**	**2437**	**51**
Milieu de résidence				
Rurale	2691	90	1647	55
Urbaine	1456	81	790	44

L'indicateur de la campagne qui est la proportion de ménages ayant reçu le nombre requis de MIILD est donné par le tableau ci-dessous.

De l'analyse du tableau, il ressort que 56% des ménages ont obtenu un nombre requis de MIILD au cours de la campagne 2011. La proportion la plus élevée (67%) est obtenue dans le département de l'Atacora et la plus faible (42%) dans l'Ouémé.

Tableau LI: Répartition des ménages ayant reçu un nombre requis de MIILD par département et suivant milieu de résidence au cours de la campagne de 2011

	Ménages ayant reçu un nombre requis de MIILD au cours de la campagne 2011			
Département	**Effectif**	**%**	**IC inf.(%)**	**IC sup.(%)**
Atacora	268	67	62,4	71,6
Donga	231	58	52,9	62,6
Alibori	231	58	52,9	62,6
Borgou	219	55	49,9	59,6
Collines	262	66	60,8	70,2
Zou	218	55	49,6	59,4
Mono	208	52	47,1	56,9
Couffo	201	50	45,4	55,1
Ouémé	167	42	36,9	46,6
Plateau	243	61	56,0	65,5
Atlantique	213	53	48,4	58,1
Littoral	221	55	50,4	60,1
Total	**2682**	**56**	**54,5**	**57,3**
Milieu de résidence				
rurale	1736	58	56,3	59,8
urbaine	946	52	50,0	54,6

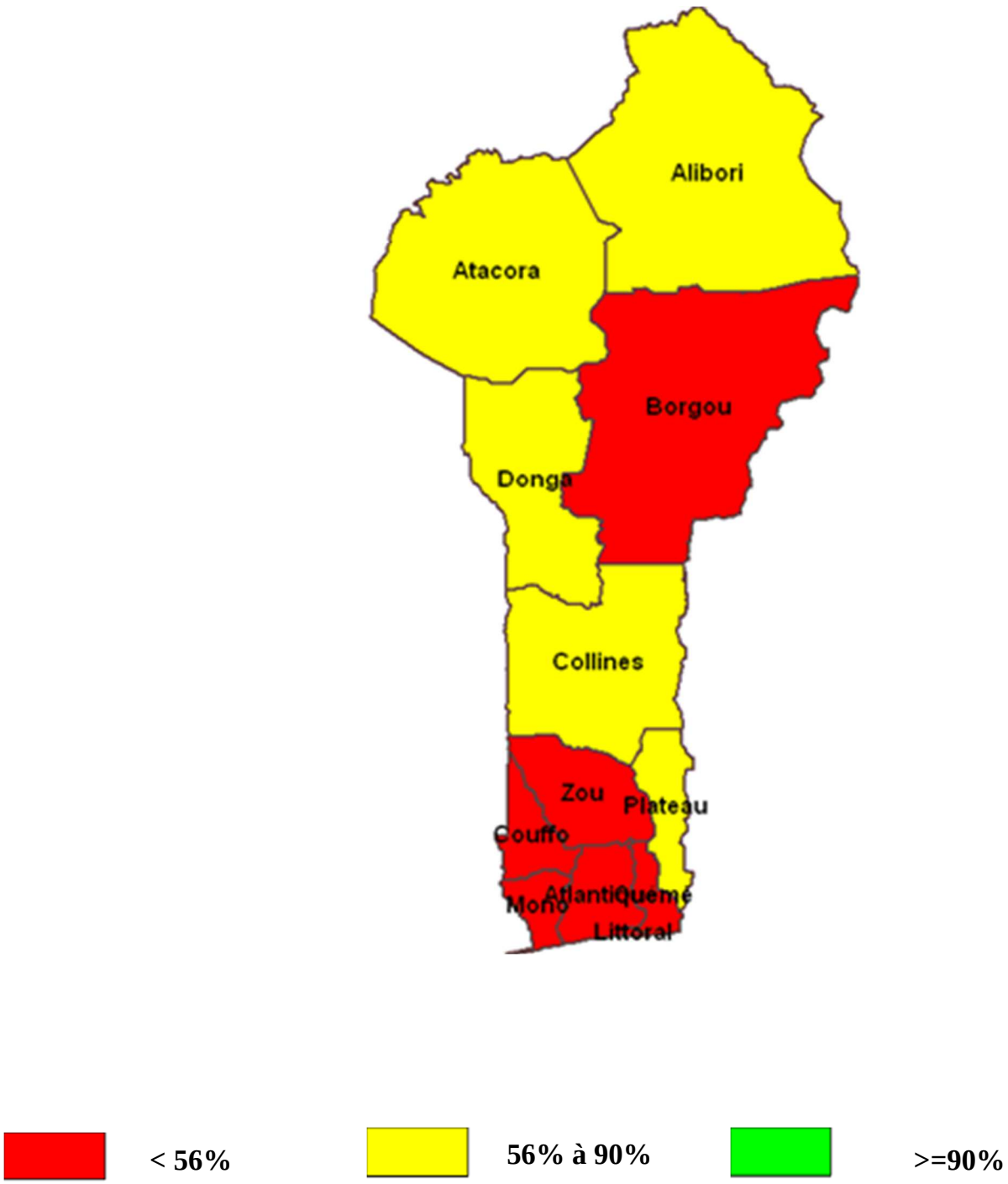


Figure 12: Répartition des ménages enquêtés suivant le nombre requis en MIILD

6.2.3 Possession et utilisation des MIILD après la campagne 2011

a) Possession de moustiquaire imprégnée à longue durée d'action

- ✓ **Possession de MIILD par les ménages**

Le tableau ci-dessous fait le point des indicateurs de performance: i) le nombre total de MIILD disponible dans les ménages avant la campagne de juillet 2011 ii) le nombre total de MIILD reçu par les ménages au cours de la campagne de juillet 2011 iii) la possession de MIILD dans les ménages après campagne de juillet 2011 iv) le Coefficient de Variation.

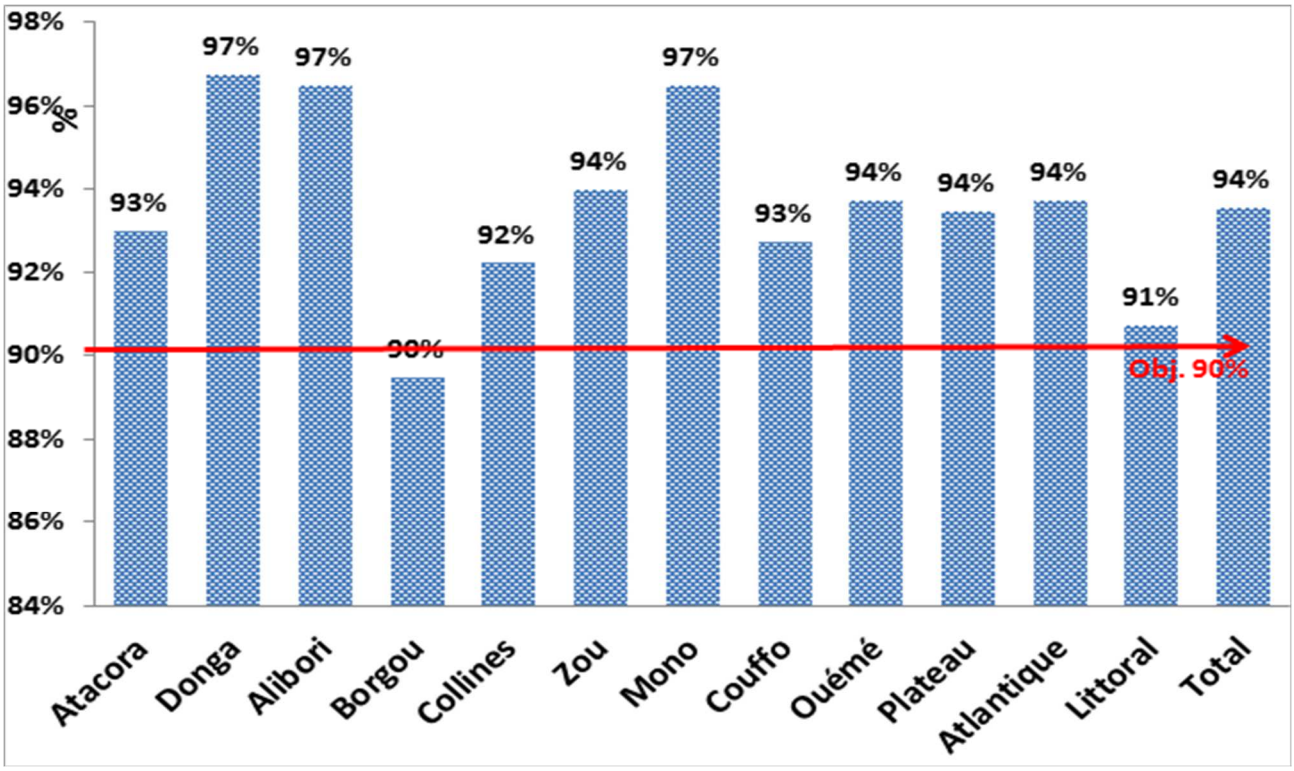
- Le nombre total de MII dans les ménages (y compris ceux obtenus pendant la campagne) a été multiplié par cinq (5) à l'issue de la campagne de 2011. Notons que la possession de MIILD dans le département de l'Atacora a été multipliée par 20 ;
- Selon les ménages qui ont été enquêtés 13 163 MIILD ont été distribuées ; ce qui a fait passer la possession en MIILD après la campagne à 16 294 MIILD dont environ 50% ce sont retrouvées en milieu rural avec un coefficient de variation moyen de cinq (5).

Tableau LII: Possession des MIILD par les ménages selon les départements et le Milieu de résidence de résidence

Département	Nombre total de MIILD reçu par les ménages au cours de la campagne	Possession de MIILD dans les ménages après campagne	Nombre total de MIILD disponible dans les ménages avant la campagne	Coefficient de Variation
Atacora	1193	1254	61	20,6
Donga	1304	1507	203	7,4
Alibori	944	1211	267	4,5
Borgou	1579	1992	413	4,8
Collines	1177	1525	348	4,4
Zou	935	1224	289	4,2
Mono	907	1198	291	4,1
Couffo	1342	1492	150	9,9
Ouémé	792	1114	322	3,5
Plateau	1080	1238	158	7,8
Atlantique	1110	1505	395	3,8
Littoral	800	1034	234	4,4
Total	**13163**	**16294**	**3131**	**5,2**
Zone				
rurale	8673	10658	1985	5,4
urbaine	4490	5636	1146	4,9

Après la campagne de distribution gratuite de juillet 2011, les données d'enquête ont montré que:

- 94% des ménages disposent d'au moins une MII ;
- tous les départements ont une couverture en MIILD des ménages au-delà de 90%.
- cette couverture a été de 95% dans les ménages en milieu rural et 92% dans les ménages en milieu urbain.



Graphique 18: Possession des MII dans les ménages suivant les départements après la campagne de 2011

✓ **Possession dans les groupes vulnérables**

Le tableau suivant fait le récapitulatif du niveau de possession de MII dans les ménages suivant les groupes vulnérables.

- 98% des ménages avec femmes enceintes possèdent au moins une MII ; cette couverture a été de 99% en milieu rural contre 96% en milieu urbain
- 97% des ménages avec au moins un enfant de moins de 5 ans disposent au moins d'une MII ; cette proportion a été semblable dans le milieu de résidence rural et urbain.

Tableau LIII : Possession des MII parmi les ménages avec femmes enceintes et enfants de moins de 5 ans après la campagne.

Départements	% de ménages possédant au moins une MII après la campagne de 2011		% de ménages possédant au moins une MII parmi les ménages avec une femme enceinte		Ménages possédant au moins une MII parmi les ménages avec au moins un enfant de moins de 5 ans	
	Effectif	**%**	**Effectif**	**%**	**Effectif**	**%**
Atacora	376	93%	38	97%	244	94%
Donga	388	97%	49	98%	279	97%
Alibori	387	97%	52	96%	250	99%
Borgou	359	90%	74	100%	269	100%
Collines	374	92%	68	100%	291	98%
Zou	377	94%	47	98%	233	97%
Mono	386	97%	55	100%	246	98%
Couffo	372	93%	70	97%	278	97%
Ouémé	377	94%	50	100%	243	95%
Plateau	374	94%	38	95%	239	97%
Atlantique	377	94%	59	98%	275	95%
Littoral	377	91%	39	93%	230	93%
Total	**4524**	**94%**	**639**	**98%**	**3077**	**97%**
Milieu de résidence						
rural	2844	95%	443	99%	1946	97%
urbain	1680	92%	196	96%	1131	96%

b) Répartition des ménages possédant au moins une MII et ceux possédant le nombre requis

On observe d'une manière générale dans tous les départements un écart important (environ 30 points) entre la proportion de ménages possédant au moins une MIILD et ceux qui possèdent un nombre requis de MIILD après la campagne.

Environ sept (7) ménages sur dix (10) disposent d'au moins une MII pour deux membres ; la couverture la plus faible pour cet indicateur a été enregistrée dans le département du Couffo (57%). Cet indicateur universel a été de 70% en milieu rural contre 64% en milieu urbain. Les graphiques ci-dessous indiquent les résultats obtenus.

Tableau LIV: Indicateurs de couverture universelle par milieu de résidence et par département

Départements	% de ménages possédant au moins une MII après la campagne de 2011	% de ménages disposant au moins une MII pour deux membres après la campagne de 2011
Atacora	93%	71%
Donga	97%	71%
Alibori	97%	70%
Borgou	90%	68%
Collines	92%	80%
Zou	94%	68%
Mono	97%	63%
Couffo	93%	57%
Ouémé	94%	62%
Plateau	94%	68%
Atlantique	94%	66%
Littoral	91%	69%
Total	**94%**	**67%**
Milieu de résidence		
rural	95%	69,5%
urbain	92%	64,2%

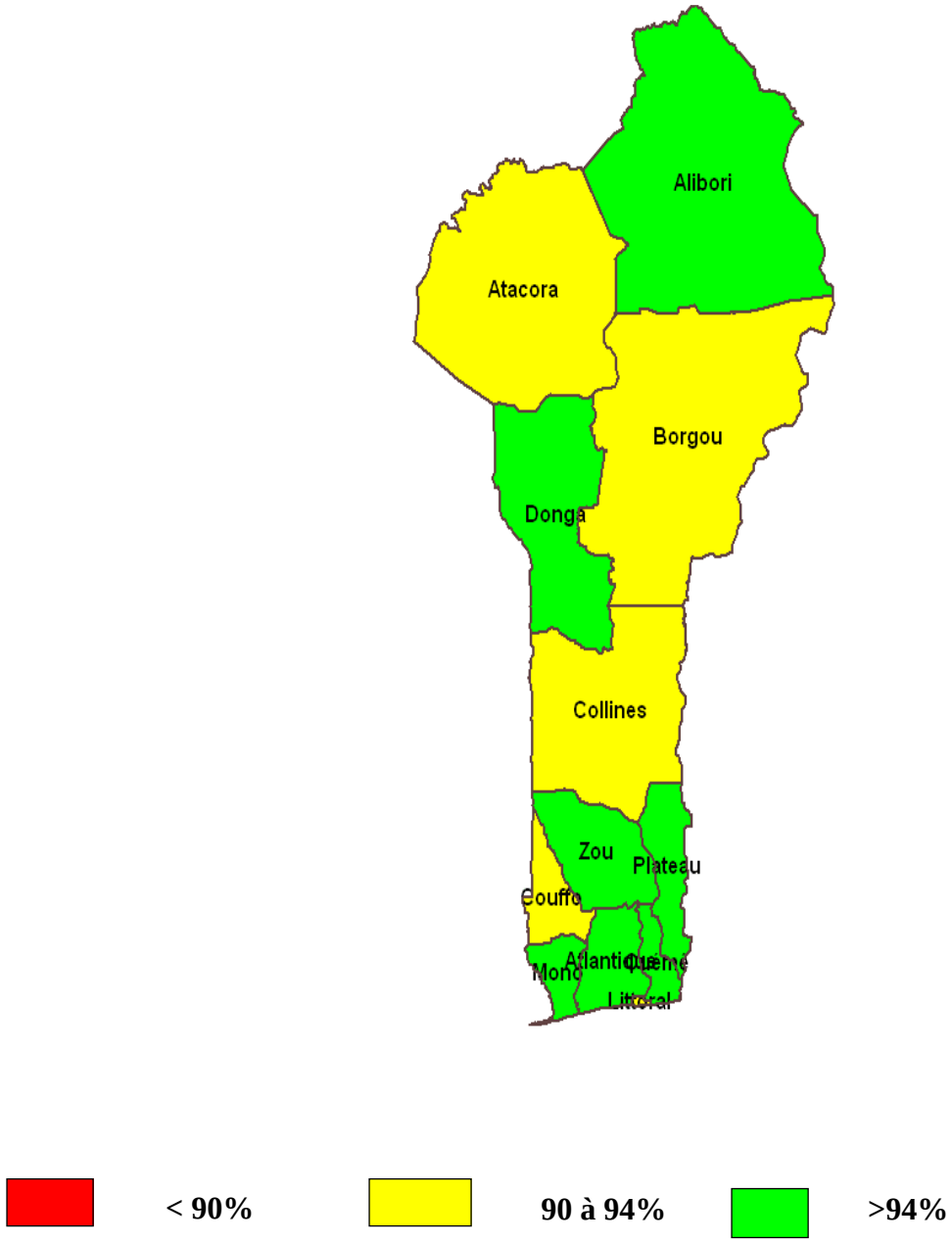


Figure 13 : Répartition de ménages possédant au moins une MII après la campagne de 2011.

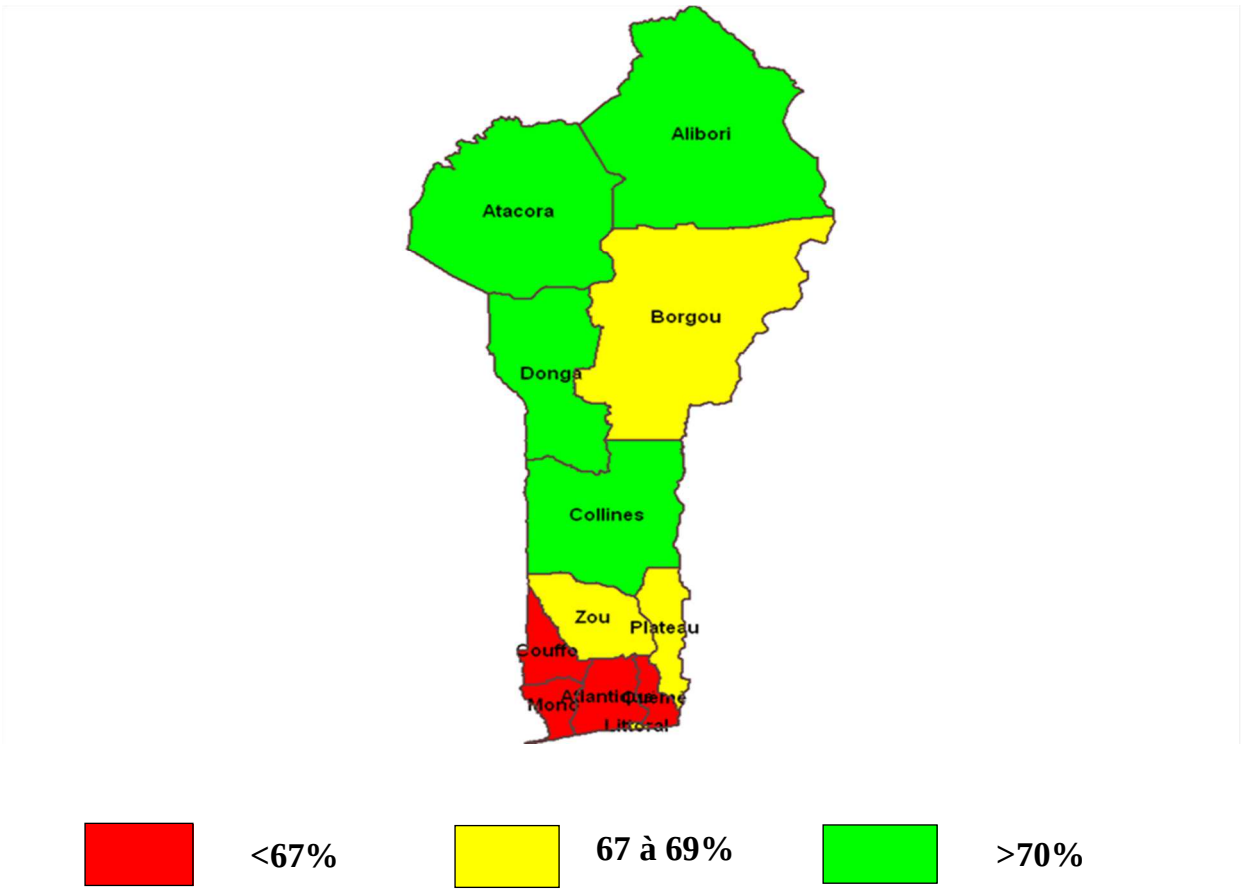
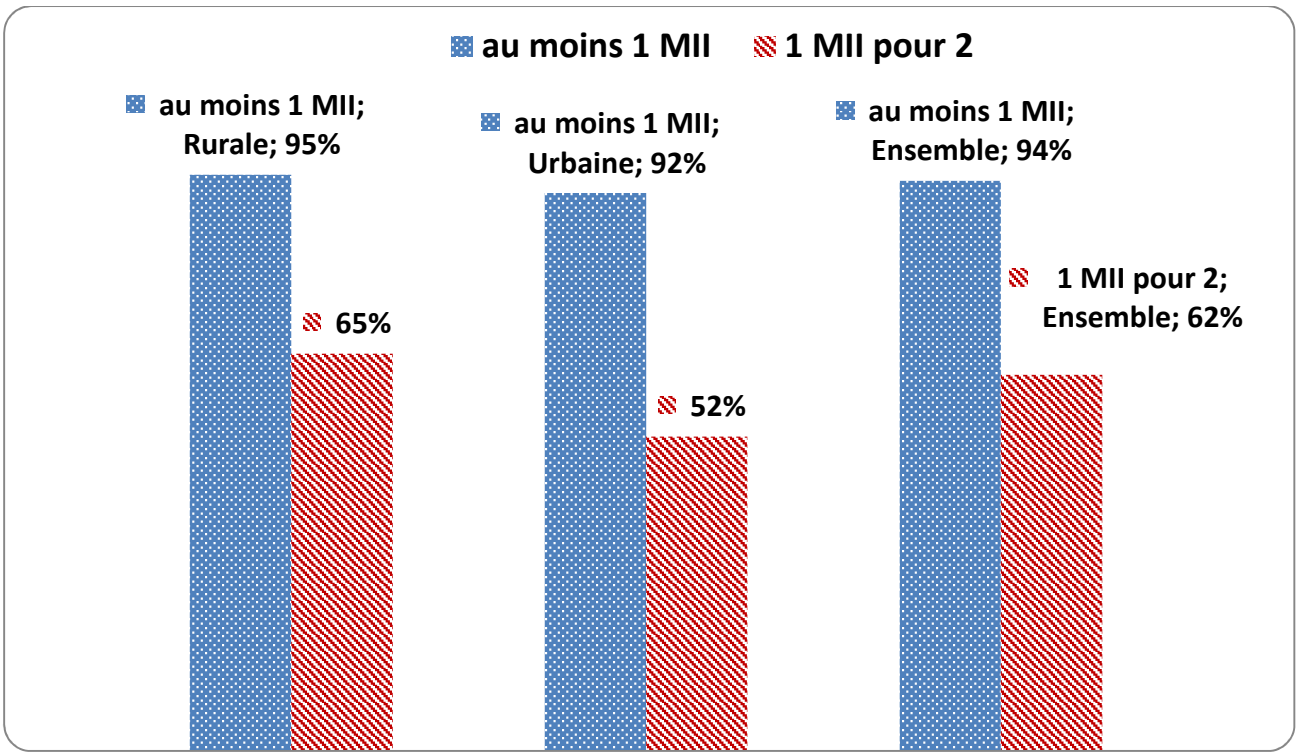


Figure 14: Répartition des ménages disposant un nombre requis de MII après la campagne de 2011.

L'analyse des données suivant le milieu de résidence a montré les mêmes tendances que précédemment ; 94% des ménages en milieu rural ont disposé au moins d'une MII et 62% en milieu urbain.



Graphique 19: Proportions de ménages avec au moins une MII et une MII pour deux membres après la campagne 2011 suivant le milieu de résidence

6.2.4 Utilisation de MII par les ménages

a) Utilisation de MII dans les ménages

Le tableau suivant fait le récapitulatif de l'utilisation de MII dans les ménages après la campagne de 2011.

- On constate que 81% des membres de ménage utilisent les moustiquaires imprégnées.
- Le pourcentage le plus élevé est obtenu dans le département de l'Alibori 89% et le plus faible à 69% dans le Couffo.
- Dans le milieu rural on a observé 83% d'utilisation des moustiquaires imprégnées contre 79% en milieu urbain.

Tableau LV: Utilisation de MII dans les ménages par département et suivant les milieux de résidence, après la campagne.

	Personnes ayant dormi sous moustiquaire			
Département	**Effectif**	**%**	**IC inf.**	**IC sup.**
Atacora	2061	82%	77,90%	85,48%
Donga	2569	87%	83,28%	89,95%
Alibori	1921	89%	85,72%	91,90%
Borgou	3330	85%	81,95%	88,87%
Collines	2187	86%	82,34%	89,19%
Zou	1765	80%	76,40%	84,20%
Mono	1777	77%	73,33%	81,53%
Couffo	2447	69%	63,99%	73,09%
Ouémé	1671	77%	73,34%	81,53%
Plateau	1890	79%	75,38%	83,31%
Atlantique	2227	81%	77,04%	84,75%
Littoral	1799	84%	80,82%	87,94%
Total	**25644**	**81%**	**80,07%**	**82,29%**
Milieu de résidence				
Rural	16558	83%	81,31%	84,02%
Urbain	9086	79%	76,72%	80,50%

b) Utilisation de MII par les groupes vulnérables et possession des MII avant la campagne de juillet 2011

Pour les 4800 ménages enquêtés, 3182 ont comporté des enfants de moins de 5 ans (66%) et 652 au moins une femme enceinte (14%). Les données qui ont été collectées se rapportent à l'utilisation de la MII par les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes :

- 85 % des femmes enceintes interrogées ont déclaré avoir dormi sous la MII la nuit précédente le jour de l'enquête ; les scores les plus élevés ont été observés dans les départements du Zou (98%) et dans l'Atacora (94%). La proportion de l'utilisation des MII en milieu rural a été de 83% contre 90% en milieu urbain.
- chez les enfants de moins de 5 ans, 93% ont dormis sous MII la nuit précédente l'arrivée des enquêteurs ; la tendance est la même en milieu rural et urbaine. On a observé néanmoins de faible utilisation dans le département du Littoral (78%).

Tableau LVI: Utilisation de MII par les groupes vulnérables par département et suivant les milieux de résidence

Départements	% de femmes enceintes ayant dormi sous MII la nuit précédente le jour d'enquête	% d'enfants de 0 à 59 mois ayant dormi sous MII la nuit précédente le jour d'enquête
Atacora	94%	97%
Donga	65%	93%
Alibori	65%	97%
Borgou	92%	95%
Collines	89%	94%
Zou	98%	94%
Mono	88%	91%
Couffo	79%	88%
Ouémé	80%	94%
Plateau	86%	92%
Atlantique	93%	98%
Littoral	89%	78%
Total	**85%**	**93%**
Milieu de résidence		
rurale	83%	93%
urbaine	90%	93%

6.2.5 Communication et couverture en MIILD

Les données collectées ont concerné aussi les canaux utilisés pour apporter les informations nécessaires aux ménages pour le bon déroulement de la campagne. Les différents canaux d'informations utilisés selon les départements sont la radio, la télévision, les crieurs publics, les chefs religieux/ traditionnels, les agents de santé et autres.

a) Utilisation des canaux d'information pour la campagne de distribution de MIILD

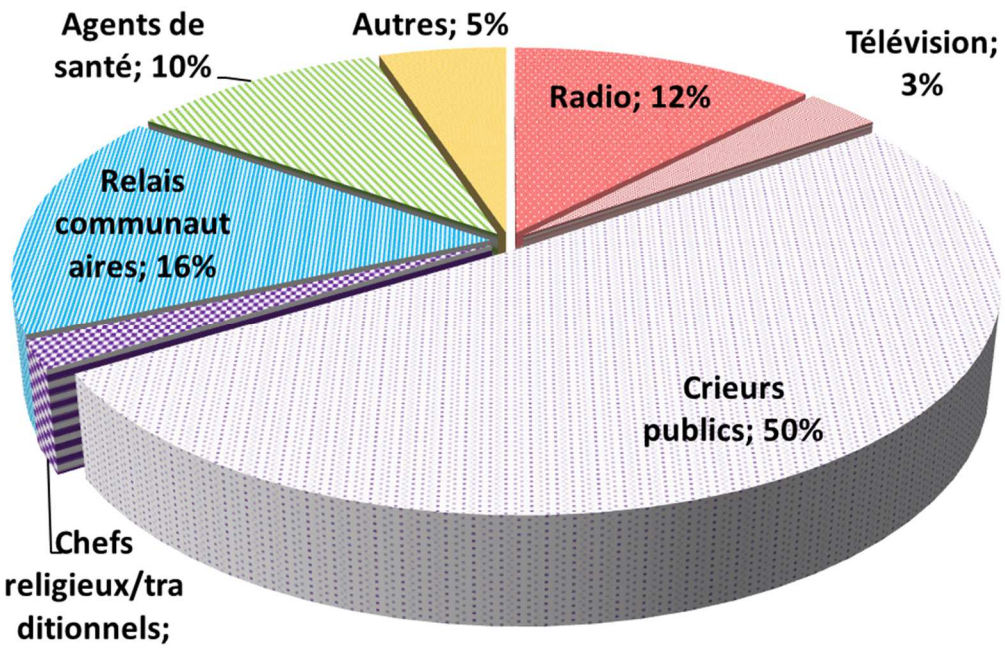
- Pour l'ensemble des 12 départements, les crieurs publics ont été le canal d'information le plus cité par les ménages. Ce canal a été le plus cité dans les départements du Borgou (74%) et du Couffo (68%) ;

Le tableau ci-dessous donne la répartition par département des personnes qui ont été interrogés suivant les différents canaux d'information.

Tableau LVII: Répartition des ménages informés de la campagne MIILD de 2011 selon le canal et par département**.**

Départements	Radio	Télévision	Crieurs publics	Chefs religieux/ traditionnel	Relais communautaire	Agents de santé	Autres
Atacora	82		227	7	43	15	14
Donga	50	14	236	1	62	19	6
Alibori	79	49	36	61	91	25	57
Borgou	50	16	205	6	74	32	15
Collines	29		230	1	5	119	9
Zou	41	1	294	3	27	15	14
Mono	53	5	175	1	101	14	17
Couffo	41	1	261	5	33	31	12
Ouémé	70	10	217	9	8	38	35
Plateau	28	10	140	6	158	38	12
Atlantique	26	28	151	5	151	25	10
Littoral	24	23	179	-	-	111	51
Total	**573**	**157**	**2351**	**105**	**753**	**482**	**252**

Pour les douze (12) départements les crieurs publics ont été les canaux d'information les plus utilisés pour atteindre les ménages (50%) des cas ; viennent ensuite les crieurs publics; les relais communautaires, (16%) et la radio (12%).

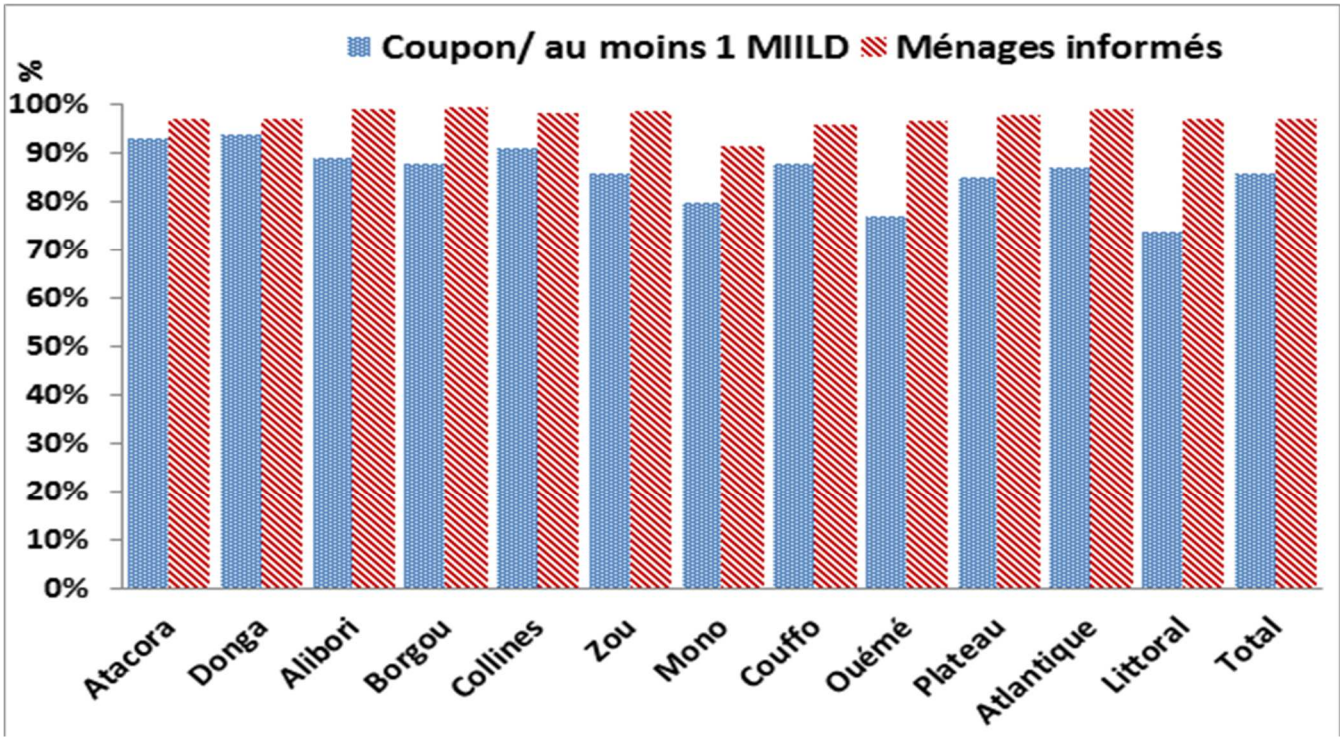


Graphique 20: Ménages informés de la campagne MIILD de 2011 selon le canal d'information

b) Couverture des ménages en matière d'informations sur la campagne de distribution des MIILD

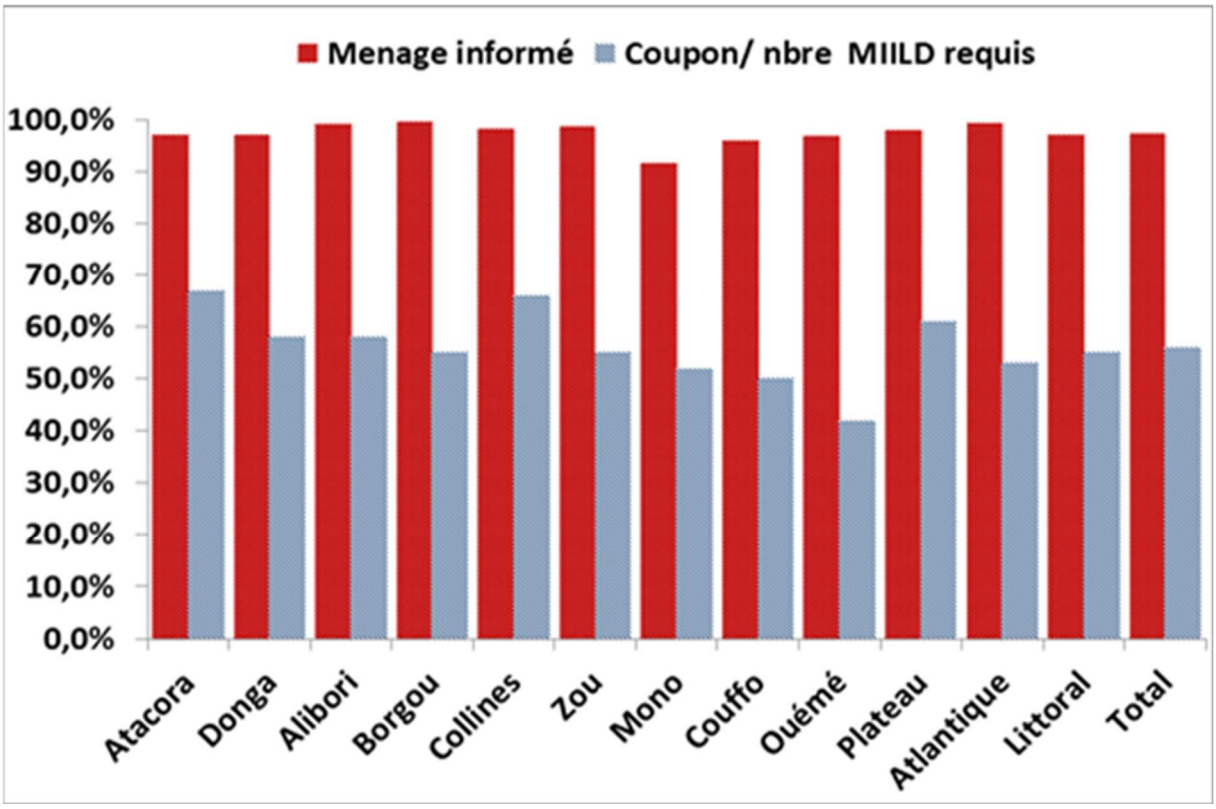
Sur les 4800 chefs de ménages interviewés, 4672 ont déclarés avoir été informés de la campagne de distribution gratuite de MIILD.

- La couverture des ménages en besoin d'informations sur la campagne a excédé 95% dans l'ensemble des douze départements ;
- Par contre la proportion de ménages avec un coupon et ayant reçu au moins une MIILD a été de 86% pour l'ensemble du pays avec de faible performance dans le Littoral (74%) et l'Ouémé (77%) comme le montre le graphique ci-dessous.



Graphique 21: Proportions de ménages informés de la campagne et celles ayant échangés un coupon avec au moins une MIILD

On a observé malgré une couverture des besoins en informations des ménages qui parait satisfaisante, une couverture en nombre requis de MIILD par ménage au cours de la campagne dans l'ordre de 56% pour l'ensemble du pays comme l'indique le graphique suivant.



Graphique 22: Proportions de ménages informés de la campagne et celles ayant échangés un coupon avec un nombre requis de MIILD.

En moyenne, 55 à 60% des ménages informés ont reçus le nombre de MIILD requis.

6.2.6 Résultats auprès des services de santé sur la campagne MIILD

Une interview a été réalisée de façon prioritaire avec les chefs postes des formations sanitaires dans 79 formations sanitaires périphériques sur les 85 attendues répartis dans les 12 départements. Les données collectées ont concerné, i) la mise en œuvre de la campagne MIILD au niveau opérationnel, ii) les raisons de non possession de MIILD dans certains ménages, iii) les principales sources d'information sur la campagne MIILD selon les agents de santé, iv) les sources d'informations des ménages sur la campagne, v) le mode de gestion des restes de MIILD

Les enquêteurs ont enregistré :

- des cas de rupture de stock de MIILD (70% des cas),
- des cas d'insuffisance des moyens de transport (23%),
- la diffusion de message par les relais communautaires
- l'utilisation des radios de proximité (52%) ;

Le détail des informations est consigné dans le tableau suivant.

Tableau LVIII: Résultats de la mise en œuvre de la campagne MIILD par les aires de santé

Paramètres	Effectif	%	N
Différents intrants reçus en quantité suffisante selon les besoins exprimés ?	75	95%	79
▪ **Coupons**	46	58%	79
▪ **Registres de recensement des ménages**	73	92%	79
▪ **MIILD**	48	61%	79
Existence de problèmes dans la distribution des MIILD et autres intrants ?	57	72%	79
▪ **Rupture de stock**	40	70%	79
▪ **Défaut de moyens de transport**	13	23%	79
▪ **Inaccessibilité géographique**	7	12%	79
▪ **Autres**	25	44%	79
Activités menées dans le cadre de la mobilisation sociale			
▪ **Plaidoyer / leader communautaire**	74	94%	79
▪ **Information/sensibilisation des groupes à risque**	44	56%	79
▪ **Diffusion de message radio**	45	57%	79
▪ **Diffusion de message (affiches, banderoles, etc.)**	39	49%	79
▪ **Diffusion de message par les relais communautaire**	62	78%	79
▪ **Autres**	19	24%	79
Utilisation des radios de proximité lors de la campagne MIILD	41	52%	79

Selon les responsables de formations sanitaires périphériques l'absence de certains chefs de ménage ou de leur représentant est la principale cause de non possession de MIILD au cours de la dernière campagne ; la rupture des coupons vient en seconde position comme le décrit le tableau suivant.

Tableau LIX: les raisons de non possession de MIILD par certains ménages selon les agents de santé de CS

Raisons	Effectif (n)	%
Absence du chef de ménage ou son représentant pendant la campagne	53	67%
Non information	20	25%
Inaccessibilité géographique au lieu de distribution	6	8%
Rupture de stock de MIILD	27	34%
Rupture de coupons	34	43%
Autres	25	32%

Les crieurs publics ont été évoqués par les agents de santé comme un canal essentiel pour atteindre les communautés (97%), viennent ensuite les relais communautaires (86%) comme le décrit le tableau suivant.

Tableau LX: Principales sources d'informations sur la campagne MIILD selon les agents de santé

Modes	Effectif (n)	%
- **Crieurs publics**	77	97%
- **Médias (radio, télé...)**	56	71%
- **Agents de santé**	57	72%
- **Relais communautaires**	68	86%
- **Autres**	12	15%

Dans trente-deux (32) formations sanitaires sur 79 du niveau opérationnel les agents ont affirmé l'existence de stock restant de MIILD issus de la dernière campagne de juillet 2011. Ces stocks ont été gérés de la manière suivante, indiquée dans le tableau ci-après.

Tableau LXI: Mode de gestion des restes de MIILD de la campagne de 2011 dans les aires de santé

Modalités	Effectif (n)	%
- **Pas de restant**	20	25%
- **Collecté par le niveau hiérarchique**	10	13%
- **Utilisé pendant (CPN ; vaccination VAR)**	1	1%
- **Toujours dans le CS et non utilisé**	32	41%
- **Autres**	3	4%

6.2.7 Raisons de non possession en MIILD de certains ménages

Pour l'ensemble des 4800 ménages enquêtés, 632 soit 13% ont déclaré n'avoir pas reçu de MIILD au cours de la campagne de distribution gratuite de juillet 2011. Les principales raisons de non possession évoquées par les ménages ont été :

•contraintes: **82%**

(N'a pas reçu de coupon 70%, Chef de ménage trop occupé, moment de distribution inadéquat, mauvais accueil, temps d'attente trop long)

- insuffisance de communication : **9%**

(Ignorance de la nécessité de dormir sous moustiquaire, ignorance du lieu et de l'heure de la distribution, ménages non informés 9%)

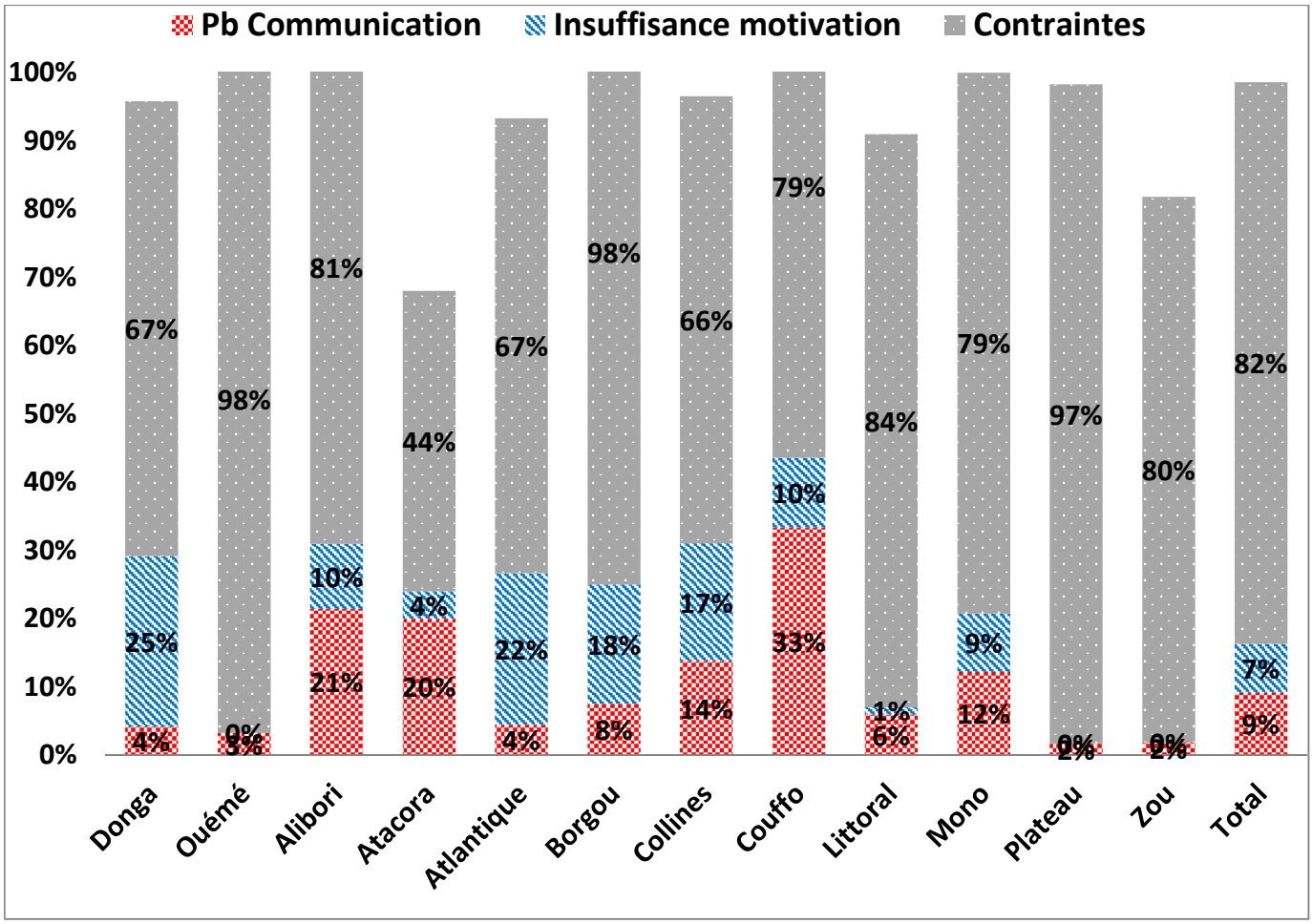
- insuffisance de motivation : **7%**

(Report de la date de distribution, distributeurs partis au moment de l'arrivée de certains ménages 4%)

- autres : **2%**

Dans les départements de l'Ouémé, du Plateau, du Borgou les contraintes ont été les principales raisons de non possessions de MIILD par certains ménages. La non réception de coupon a été la raison la plus évoquée par les ménages concernés dans ces départements (Ouémé 93% des cas, Plateau 85%).

L'insuffisance d'information a été la 2ème raison évoquée par certains ménages des départements du Couffo et de l'Alibori. Le graphique suivant illustre les résultats par département.



Graphique 23 : Raisons de non possession en MIILD de certains ménages par département

6.2.8 Production des déchets par les emballages des MIILD

La campagne édition 2011 a permis de distribuer 4 674 800 moustiquaires sur les 4 884 713 MIILD mises à la disposition des départements soit 95,7% des MIILD pré positionnées. Plusieurs marques de MIILD ont été distribuées au cours de la campagne de 2011 et de la distribution de routine de 2012. La détermination de la masse moyenne par emballage donne le résultat suivant :

Tableau LXII: masse des emballages de MIILD utilisés lors de la campagne de distribution de 2011

Marques	*Dawa plus®*	*Olyset®*	*Permanet®*	*Net Protect®*
Masse emballage (g)	18,4	18,1	17,9	18,6

La masse moyenne s'établit à 18, 25g.

La masse totale de déchets produits par les campagnes 2007 ; 2011 et la distribution de routine de 2007 à 2012 est décrit dans le tableau suivant :

Tableau LXIII: Masse de déchets des emballages de MIILD utilisés lors des campagnes de distribution de 2007 et 2011

Source de déchets	*Campagne 2007*	*Campagne 2011*	*Distribution de routine 2012*
Masse de déchets (***en tonnes***)	27,38	89,15	9,22

6.2.9 Collecte des emballages vides de MIILD

Dans le cadre de la gestion des emballages de MIILD et suivant les instructions du PNLP, les emballages avaient été retirés et gardés par les agents distributeurs. Il y avait donc 89,15 tonnes de déchets éparpillés dans tous les centres de santé. Ces déchets ont été rassemblés par zone sanitaires. A l'aide d'une équipe, le PNLP a procédé au retrait de ces emballages qui ont été détruits sur le site de destruction situé à Pahou (Ouidah).



Photo 4: Ramassage des emballages vides de MIILD dans les zones sanitaires



Photo 5 : Emballages vides de MIILD à embarquer pour les sites de destruction de Ouidah



Photo 6: Transport des emballages vers le camion qui ne peut accéder au lieu d'entreposage



Photo 7: Déchargement des emballages sur le site de destruction à Pahou (Ouidah)

6.2.10 Destruction des emballages vides de MIILD

Les emballages de MIILD ramassés dans les zones sanitaires ont été détruits à Pahou (Ouidah). Le programme National de lutte contre le Paludisme a signé un contrat avec Bethesda-DCAM pour assurer cette mission. La méthode de destruction proposée par Bethesda DCAM est la destruction par broyage. Les emballages sont catégorisés par couleurs, et sont broyés par catégorie. Les produits issus du broyage peuvent être recyclés pour d'autres usages tels que les pavés.



Photo 8: Produits issus du broyage des emballages de type NET Protect



Photo 9: Produits issus du broyage des emballages de type Olyset Net

6.3 Discussion

Une évaluation de la couverture des populations en MIILD a été effectuée suite à la campagne de distribution gratuite de MIILD en 2011 et a permis d'obtenir la possession des MIILD au sein des ménages mais surtout de mettre l'accent sur les disparités notées au sein d'un même département ou d'une même zone sanitaire.

6.3.1 De la méthodologie

L'évaluation rapide de la campagne de distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action aux ménages s'est déroulée sur l'ensemble du territoire. Il s'agit d'une étude transversale quantitative qui a couvert les douze (12) départements.

La méthode d'échantillonnage qui a été utilisée est celle de sondage par grappes à deux degrés de type OMS. Au niveau de chaque département, 40 grappes ont été sélectionnés. Pour tirer les grappes, les données de population RGPH3 ont été utilisées. Les populations par village ou quartier de ville ont été cumulées et un pas de sondage calculé. Le tirage de la première grappe a été fait en utilisant un nombre au hasard.

Le 2ème degré a consisté au choix des ménages. Dans la grappe, le premier ménage à enquêter provient d'une liste de ménages qui ont été choisis de façon aléatoire à partir du registre de recensement de la localité mis en place pendant la distribution des coupons. Le premier ménage retrouvé dans la liste précédente est la porte d'entrée dans la grappe. L'ensemble d'une grappe a été complété en progressant de proche en proche suivant un pas de 10 dans les milieux urbains (Cotonou, Porto-Novo, Parakou, Bohicon, Abomey, Djougou, Natitingou, Kandi…..) et un pas de 5 en milieu rural.

La taille attendue de l'échantillon par département est de 40 grappes de 10 ménages soit 400 ménages, qui ont été enquêtés par département ce qui correspond à 4800 ménages pour l'ensemble des 12 départements que compte le pays.

Pour les centres de santé, l'enquête a été effectuée dans un seul centre de santé par commune et 8 pour Cotonou et Porto-Novo ; ce qui porte l'effectif des centres de santé enquêtés à 85. Dans les centres de santé, le chef de poste ou son représentant ont été interviewés.

L'évaluation post campagne de la distribution gratuites des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action aux ménages s'est déroulée sur l'ensemble du territoire et s'est intéressée aux communautés, aux structures de santé impliquées dans l'organisation de la campagne. Les discussions et commentaires porteront sur :

- l'atteinte des objectifs de l'étude

- l'appréciation des résultats par rapport aux indicateurs de performance du programme et des objectifs stratégiques sous régionaux.

6.3.2 Couverture en MIILD dans les ménages au cours de la campagne

Les résultats obtenus ont confirmé l'évolution des indicateurs de performance vers les objectifs stratégiques de la sous-région et de ceux du PNLP/Bénin qui a entre autres comme objectif spécifique à cette campagne de distribution gratuite d'amener la proportion de ménages disposant d'au moins une MIILD de 58 à 90% d'ici la fin de 2011.

Quand on considère la totalité des ménages au cours de la campagne de distribution gratuite, 86% des ménages enquêtés ont déclaré avoir reçu au moins une MIILD après la campagne de 2011. Par contre la proportion des ménages qui ont reçu un coupon a été de 89% pour l'ensemble du pays. Le lien entre les coupons distribués et la réception des MIILD reste à approfondir dans plusieurs localités. Des ménages ont probablement reçu des MIILD sans avoir obtenu préalablement un coupon ou des ménages individualisés et retrouvés sur le terrain ont reçu au moins une MIILD sous le couvert d'un autre chef de ménage. En effet, certains ménages ont été omis au cours de la délivrance de coupons soit pour insuffisance de planification soit par ruptures de coupons soit par méconnaissance du champ de distribution. La délivrance de coupons a été en stratégie de porte à porte alors que celle de la distribution de MIILD s'est effectuée en poste fixe.

Cependant certains ménages pour des raisons de sous information sur la date et le lieu de la distribution, de non disponibilité du fait de la période de récolte, d'éloignement du site de réception, du fait du temps d'attente parfois long n'ont pas reçu la MIILD.

L'analyse des raisons de non possession d'au moins une MIILD à la fin de la campagne confirme ce fait. La raison principale de non possession de MIILD a été la rupture des coupons (contraintes) ; viennent ensuite les facteurs liés à l'information des communautés et la motivation de certains chefs de ménage ou de leur représentant.

Quand on compare les données d'enquête à celles des sources administratives on observe parfois des écarts dans certains départements. Selon les rapports administratifs transmis par les DDS 91% des ménages ont reçu au moins une MIILD contre 86% pendant l'enquête (DDS, 2012) Selon les mêmes sources administratives 105% des ménages auraient reçu le nombre requis de MIILD alors que selon les données d'enquête la proportion des ménages ayant échangés un coupon avec le nombre requis de MIILD a été de 56% et le nombre moyen de MIILD reçu par ménage a été de trois (3) au niveau national.

Ces écarts sont dus entre autres :

- à la mauvaise estimation du nombre de ménages effectivement recensés
- au biais introduit dans le cumul du nombre de ménages ayant bénéficié de MIILD
- à l'adaptation du concept de ménages aux réalités socio culturelles dans certains départements comme le Borgou et l'Alibori.

Ces résultats montrent la nécessité pour les interventions de forte mobilisation sociale comme la distribution de MIILD, d'assurer une meilleure sécurité et une qualité des outils de planification et de gestion (registre de recensement fiable, données de population fiable….). Les facteurs associés à ces éléments peuvent expliquer les insuffisances constatées.

Des études similaires ont été réalisées dans plusieurs pays de la sous-région mais il s'agit le plus souvent de campagnes intégrées (vaccination, administration de vitamine A et Albendazole, distribution de MIILD) avec une méthodologie différente qui utilise les GPS/ PDA pour la cartographie des grappes et des ménages. Les objectifs et les cibles de ces évaluations sous régionales ne sont pas identiques. Néanmoins par rapport à l'indicateur de la proportion de ménages ayant reçu au moins une MIILD à la fin de la campagne de distribution dans certains pays on a enregistré des taux avoisinant 70%. (Julie T, 2011) ; Cervinskas J., Berti P., (Desrochers R, 2008).

- Sénégal en 2010 : 75%
- Kenya en 2010 : 68%
- Mali en 2008 : 81%
- Niger en 2008 : 70%

6.3.3 Communication pour la campagne

L'analyse des stratégies de communication mises en place pour l'organisation de la campagne et l'analyse des canaux de communication pour l'information des ménages a révélé que 97% des communautés ciblées ont été informés de la tenue de la campagne. Cependant, la proportion des ménages ayant échangés un coupon avec le nombre requis de MIILD n'est que de 56%. Ce résultat est à rapprocher aussi au 94% des ménages qui ont reçu au moins une MIILD. Ces résultats montrent que les ménages bien qu'ils soient informés et obtenus au moins une MIILD n'ont pas bénéficié du nombre requis de MIILD en rapport à leurs tailles respectives. D'autres facteurs sans nul doute en rapport avec l'organisation sur le terrain, à la coordination et aux contraintes liés au système n'ont pas permis d'obtenir des indicateurs plus performants.

Les crieurs publics, les relais communautaires ont été les canaux d'information les plus cités par les ménages interrogés. Selon les agents de santé interrogés les crieurs publics (97%) et les relais communautaires (86%) ont été et demeurent des acteurs incontournables pour atteindre les communautés. Ceci nécessite donc une réallocation des ressources de communication selon les canaux prioritaires pour améliorer l'impact des actions de communication. La radio et la télévision ont été à l'instar d'autres études les canaux les moins efficaces pour atteindre les communautés. Les résultats obtenus en termes de constance par rapport aux données d'enquête dans le département de l'Ouémé méritent qu'on s'y penche pour identifier les innovations entreprises en matière de communication avant et pendant la campagne afin de l'exploiter pour les prochaines campagnes.

6.3.4 Couverture en MII après la campagne de distribution

L'EDS III a révélé en 2006 que 25% des ménages disposaient d'au moins une MII ; l'évaluation de la campagne de 2007 à l'échelle nationale sur la disponibilité et l'utilisation des moustiquaires imprégnées a révélé en 2008 que 58% des ménages possèdent au moins une moustiquaire imprégnée. Seulement 17,7% de ces ménages possèdent deux moustiquaires imprégnées. Les résultats enregistrés par cette évaluation ont montré une progression vers les objectifs attendus d'amener :

- les ménages disposant d'au moins deux MIILD de 17,7% à 80% en décembre 2011 ;
- à 90% la proportion de ménages disposant d'au moins une MIILD pour deux personnes en Décembre 2011.

Ainsi pour les indicateurs proposés pour l'accès en couverture universelle, au moins neuf (9) personnes sur dix (10) enquêtées disposent d'au moins une MII après la campagne de distribution de 2011 mais avec des variations au sein des départements. Le nombre moyen de MII par ménage a été de trois (3) MII pour l'ensemble des départements et suivant les milieux de résidence des ménages (rurale, urbaine) ; environ six(6) ménages sur dix (10) disposent au moins une MII pour deux personnes. Des efforts restent à faire pour améliorer la situation dans les départements du Zou et pour maintenir les acquis dans les départements de l'Atacora, du Couffo, du Littoral et de l'Ouémé/Plateau.

Des résultats semblables (40%) ont été observés après l'évaluation post campagne au Sénégal en 2010 pour la proportion des ménages disposant au moins d'une MII pour deux personnes cités par Julie T. et al dans « Evaluation de la campagne intégrée de distribution de MIILD, de vitamine A et de Mébendazole au Sénégal : Rapport final, EPCS; 2011 ; 93 »

Les campagnes de masse sont le meilleur moyen d'accroître rapidement la couverture en Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée (MIILD), en particulier lorsque les niveaux de possession des ménages sont faibles. Cependant une expérience récente montre que les campagnes seules, ne suffisent pas à maintenir la couverture universelle. En effet les MIILD n'ont pas une durée de vie fixe car la dégradation puis l'élimination due à l'usure naturelle commence immédiatement après une campagne de distribution et se poursuit sur plusieurs années.

Une priorité clé pour le maintien de la couverture universelle doit être d'établir des systèmes pour surveiller la couverture et les variations du taux de perte.

Pour maintenir une couverture universelle permanente, des mécanismes de distribution complémentaire s'avèrent nécessaires pour assurer un flux continu de moustiquaires de remplacement et devraient faire partie intégrante d'une stratégie nationale globale des MIILD. L'OMS recommande de donner davantage la priorité aux services de routine, tels que les Consultations Prénatales (CPN) et le Programme Elargi de Vaccination (PEV); en tant que moyens de distribution des MIILD pour pérenniser la couverture universelle (*OMS ; 2011)».*

6.3.5 Utilisation des MII par les groupes vulnérables

La proportion d'enfants de moins de cinq ans utilisant une moustiquaire imprégnée était de 56,3% contre 54,8% d'utilisation chez les femmes enceintes. Les objectifs intermédiaires du plan stratégique 2011 – 2015 visent que 95% des femmes enceintes et des enfants de moins de cinq (5) dorment sous MIILD. L'analyse des résultats obtenus par l'évaluation a montré un écart de 10 points qui reste à combler d'ici à 2013 pour atteindre l'objectif intermédiaire. Les efforts à fournir pour améliorer cet indicateur d'utilisation de la MIILD doivent cibler entre autre les départements de la Donga, de l'Alibori, du Couffo pour les femmes enceintes et le Littoral pour les enfants de moins de 5 ans.

Dans de nombreux pays africains et au Bénin, la couverture en CPN et en PEV est relativement élevée. La délivrance de MIILD par le biais à la fois des CPN et PEV en cours au Bénin devrait bénéficier de plus d'engagement de la part des différents acteurs et de ressources en vue de réduire les écarts de couverture qui autrement, s'agrandissent pendant les intervalles entre les campagnes, et devrait ainsi aider à maintenir la stabilité des taux de couverture.

La Couverture universelle vise toutes les communautés, pas seulement les sous-groupes vulnérables au sein de la communauté. Le but est de fournir une protection équitable à tous, et de profiter de l'effet communautaire, où un niveau élevé de couverture en MII,

affecte la capacité vectorielle de la population locale de moustiques en réduisant la transmission du paludisme au sein de la population dans son ensemble. La comparaison de la possession de MIILD entre les ménages avec au moins un enfant de moins de 5 ans et les ménages sans enfants de moins de 5 ans, la proportion des individus en général qui ont dormi la veille de l'enquête sous la MII (81%) illustrent cette prise de conscience collective dans la possession et l'utilisation des MII au sein des ménages.

L'hypothèse H5 indique que la campagne de distribution gratuite de MIILD aux ménages en 2011 augmente la couverture en MIILD à 90% au moins et le taux d'utilisation des MIILD par la population béninoise à plus de 80 %.

Les résultats obtenus indiquent que la couverture est de 94% et l'utilisation de 81%. L'hypothèse H5 est donc vérifiée et l'objectif spécifique N°5 qui est de déterminer la couverture et le taux d'utilisation des MIILD en République du Bénin après la campagne de distribution des MIILD en 2011est atteint.

6.3.6 Gestion des emballages de MIILD

L'importante quantité d'emballages de MIILD découle de la stratégie adoptée pour la distribution. En effet, si les MIILD étaient remises avec l'emballage, plus de 89, 15 tonnes de déchets seront dans la nature. Le PNLP a donc opté pour cette stratégie en vue d'assurer une meilleure protection de l'environnement. Les emballages de MIILD issus de la campagne de distribution de 2011, n'ont été enlevés pour destruction qu'au dernier trimestre 2012 et premier semestre 2013. Ces emballages sont restés dans les centres de santé pendant au moins deux saisons sèches et deux saisons pluvieuses sur toute l'étendue du territoire national.

Dans certaines zones sanitaires, les quantités de déchets étaient si importantes qu'il n'y avait pas de place pour les stocker. Ils ont alors été exposés aux intempéries.

Cette exposition a probablement eu certainement pour effet, la pollution des eaux environnantes, la production des gites larvaires et de moustiques exposés aux insecticides ayant servi à imprégner les moustiquaires.

Cette situation peut s'expliquer par le fait que la gestion de l'environnement n'avait pas été véritablement prise en compte dans le budget de la campagne 2011. La mobilisation de fonds pour cette activité a pris du temps, ce qui a eu pour effet, l'exposition des emballages aux intempéries.

Nous pourrons conclure que la destruction des déchets issus de la campagne de distribution des MIILD en 2011 respecte les normes environnementales ; Et que l'objectif d'évaluer la quantité de déchets produits par les emballages de MIILD issus

des campagnes de distribution de 2007 et 2011 et leur destruction conformément aux normes environnementales'' est atteint.

Conclusion partielle

La distribution des MIILD a permis de couvrir 94% des ménages avec un taux d'utilisation de 81%. Cette stratégie de prévention, malgré son coût élevé est la meilleure stratégie, la moins couteuse qui permette de protéger l'ensemble de la population du paludisme sur une longue période. S'il est vrai que les moustiquaires ont une durée d'efficacité prouvée de l'ordre de trois ans, il n'en demeure pas moins que les conditions de vie des populations dans les villes et villages ne permettent pas toujours de conserver les moustiquaires pendant la période prévue. La meilleure alternative étant d'assainir le cadre général de vie, les populations et les autorités politico administratives devront prendre les dispositions nécessaires pour atteindre cet objectif.

Conclusion générale

La présente étude intitulée ***« Evaluation des principales stratégies de diagnostic biologique, de prise en charge et de prévention du paludisme »*** a pour but de vérifier si les principales stratégies utilisées par le Programme National de Lutte contre le Paludisme permettent de diagnostiquer le paludisme sur le plan biologique, de le traiter sur le plan clinique et de le prévenir, dans le meilleur des cas.

L'évaluation de l'efficacité thérapeutique de artemether lumefantrine sur le *Plasmodium falciparum* dans les cas de paludisme non compliqué à Cotonou indique une réponse clinique et parasitologique adéquate de 96,5% et un taux d'échec thérapeutique de 3,5% sans effets indésirables, ce qui confirme l'efficacité et l'innocuité de l'antipaludique utilisé pour le traitement du paludisme simple.

La prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans est effective dans 94% de formations sanitaires publiques et assimilées en 2013, contribuant à la réduction de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme.

Sur 100 cas de fièvres, 25 sont confirmés positifs pour le paludisme. Cette proportion est similaire quel que soit l'outil utilisé pour le diagnostic biologique : le TDR, Cyscope et la goutte épaisse. Les deux techniques de diagnostic rapide (TDR et Cyscope®) avec leur sensibilité et leur spécificité, les conditions d'utilisation assez faciles, et les coûts assez raisonnables peuvent être vulgarisées comme outil de diagnostic dans les pays endémiques surtout les régions dépourvues d'électricité.

Au terme de l'évaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum*, il ressort que les gènes pfcrt et pfmdr1 pris isolément présentent des faciès différents aussi bien chez les isolats des enfants asymptomatiques que dans les isolats des enfants malades. En effet, la prévalence de la mutation T76 dans le gène pfcrt au sein de la population d'étude est de 85,2% et de 35,7% pour la mutation Y86 au sein du gène pfmdr1. Il en ressort également que le gène pfcrt serait plus à considérer dans la prédiction d'un issu thérapeutique puisqu'il est impliqué de façon plus spécifique dans la résistance à la chloroquine du *Plasmodium falciparum* que le pfmdr1.

L'étude de la prévalence des mutations ponctuelles du gène pfdhps a révélé que : i) le taux de portage de *Plasmodium falciparum* dans le département du Littoral est de 7,6%. ii) La prévalence des mutations au niveau des codons 436, 437 est encore faible au niveau du site d'étude. La sulfadoxine conserve donc une relative efficacité sur les souches de *Plasmodium falciparum* dans le département du Littoral. iii) La présence de la double mutation au niveau des codons 436 et 437 ne nous permet pas de prédire d'une augmentation ou non du taux d'échec thérapeutique à la Sulfadoxine. iv) la

prévalence des souches mixtes au niveau des codons 436 et 437 est respectivement de 4,5% et 3% ce qui traduit une transmission relativement modérée du paludisme dans ce département conformément à l'étude de Pearce et coll. v) Il n'a pas été mis en évidence une relation directe entre le statut clinique et la présence de mutation au niveau des codons 436 et 437.

La campagne nationale de distribution gratuite de Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILD) aux ménages a permis de couvrir à l'échelle nationale plus de 90,6% des ménages ayant bénéficié de coupon. Cette couverture universelle assure une forte réduction du contact homme vecteur, ce qui induit une diminution notable des cas confirmés de paludisme.

Les 89,15 tonnes d'emballages de MIILD qui ont été collectées dans les 34 zones sanitaires ont été détruits conformément aux normes environnementales en vigueur en République du Bénin et ceux approuvés au niveau international.

On retient donc que l'évaluation des principales stratégies de diagnostic biologique, de prise en charge des cas et de prévention du paludisme contenues dans le plan stratégique national 2011-2015 révisé avec extension à 2018 a permis de confirmer que :

Le médicament utilisé pour la prise en charge des cas de paludisme simple au Bénin est efficace. Il est utilisé dans les centres de santé publiques et assimilés pour la prise en charge gratuite des cas de paludisme simple chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans. Tous ces cas de paludisme peuvent être confirmés par des tests de diagnostic fiables, rapides et pas chers. Quant à la sulfadoxine pyriméthamine utilisée pour la prévention du paludisme chez la femme enceinte, elle demeure efficace et peut donc permettre de réduire considérablement les faibles poids de naissance chez les nouveaux nés. L'utilisation de la moustiquaire imprégnée à longue durée d'action, cette stratégie de prévention, malgré son coût élevé est la meilleure stratégie, la moins couteuse qui permette de protéger l'ensemble de la population du paludisme sur une longue période. S'il est vrai que les moustiquaires ont une durée d'efficacité prouvée de l'ordre de trois ans, il n'en demeure pas moins que les conditions de vie des populations dans les villes et villages ne permettent pas toujours de conserver les moustiquaires pendant la période prévue. La meilleure alternative étant d'assainir le cadre général de vie, les populations et les autorités politico administratives devront prendre les dispositions nécessaires pour atteindre cet objectif.

En définitive, le présent projet de recherche a permis de confirmer l'efficience et la pertinence des principales stratégies utilisées pour la confirmation biologique des cas, la prise en charge des cas confirmés et la prévention du paludisme. L'atteinte des objectifs de cette étude permet de conclure que la mise en œuvre de ces principales stratégies contribue à l'atteinte des OMD : **N°4 : Réduire la mortalité des enfants de moins de 5 ans**, **N°5 : Améliorer la santé maternelle, N°6 : Combattre le VIH/sida, le paludisme et d'autres maladies** et **N°7 : Assurer un environnement durable**.

Des efforts restent à faire pour infléchir la tendance à la hausse du nombre de cas annuels de paludisme.

Recommandations

A l'endroit du Ministre de la santé

- ✓ Evaluer tous les cinq ans les principales stratégies inscrites dans le plan stratégique national de lutte contre le paludisme et s'assurer qu'elles sont efficientes pour l'atteinte des objectifs.
- ✓ Assurer l'organisation triennale des campagnes de distribution gratuite de MIILD aux populations pour la prévention de la population contre le paludisme.
- ✓ Mobiliser les ressources pour assurer l'effectivité de la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5ans et les femmes enceintes dans les formations sanitaires et l'étendre progressivement vers le secteur privé.
- ✓ Rendre disponibles les intrants de lutte contre le paludisme, spécifiquement les tests de diagnostic rapide pour la confirmation des cas

A l'endroit du PNLP

- ✓ Amener les agents de santé à changer de paradygmes en ce qui concerne le diagnostic et le traitement du paludisme.
- ✓ Elaborer un plan de communication sur la mise en œuvre de la PEC gratuite et le mettre en application.
- ✓ Evaluer tous les deux ans, l'efficacité et l'innocuité des antipaludiques utilisés pour la prise en charge du paludisme simple
- ✓ Evaluer tous les deux ans, les marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine

A l'endroit des Médecins Coordonnateurs de Zone Sanitaire

- ✓ Accentuer la supervision et le contrôle des formations sanitaires sur le diagnostic et la prise en charge correcte des cas de paludisme.

Perspectives

A l'issue de ces recherches, certaines pistes méritent d'être approfondies

Des études ultérieures sur un échantillon plus large pourraient conduire à de meilleures conclusions en ce qui concerne l'évaluation des marqueurs moléculaires de la résistance du *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine pyrimethamine et à la chloroquine.

Il est souhaitable que de études sociologiques se fassent pour identifier les paramètres environnementaux et sociaux culturels qui empêchent les agents de santé à mettre rigoureusement en pratique les directives du Ministère de la Santé en matière de lutte contre le paludisme.

Bibliographie

Akogbeto M, Modiano D, Bosman A.. Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Bénin, Parasitologia 1992; 34:147-154

Alene G D, Bennett S. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* malaria in Ethiopia and Eritrea. Trop Med Int Health 1996; 1 (6): 737-884.

Asidi AN, N'guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, Corbel V, Darriet F, Zaim M, Rowland MW. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambdacyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J*. 2005, 4(1): 25.

Aubouy A, Fievet N, Bertin G, Sagbo JC, Kossou H, Kinde-Gazard D et al. Dramatically decreased therapeutic efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine, but not mefloquine, in southern Benin. *Trop Med Int Health*. 2007; 12(7): 886-894.

Bacon D J, Latour C, Lucas C, Colina O, Ringwald P, Picot S. Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for in vitro antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51 (4): 1172- 1178.

Bardanas C. Epidémiologie moléculaire et résistance de *Plasmodium vivax* aux antipaludiques à Madagascar [Thèse de doctorat d'état en pharmacie]. Lyon : Université Claude Bernard Institut des Sciences pharmaceutiques et biologiques ; 2008 ;N°108,40-52.

Basco LK, Ringwald P. Chimiorésistance du paludisme: problèmes de la définition et de l'approche technique. Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé. 2000; 10 (1) : 47-50.

Basco LK, Ramiliarisoa O, Le Bras J. *In vitro* activity of atovaquone against the African isolates and clones of *Plasmodium falciparum. Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 388-391.

Basco LK. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVII. Baseline monitoring of atovaquoneresistant *Plasmodium falciparum* by in vitro drug assays and cytochrome b gene sequence analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69: 179-183.

Bashar K, Tuno N, Ahmed TU, Howlader AJ. Blood-feeding patterns of Anopheles mosquitoes in a malaria-endemic area of Bangladesh. *Parasites & Vectors*. 2012; 5: 39.

Baudon D, Gazin P, Rea D, Carnevale P. A study of malaria morbidity in a rural area of Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985; 79(2): 283-4.

Bennett T N, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, Roepe P D. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48 (5): 1807-1810.

Black RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. *Chemotherapy of malaria. Second edition. Geneva*. 1981; 3: 73-75.

Bousema T, Drakeley C, Gesase S, Hashim R, Magesa S, Mosha F et al. Identification of hot spots of malaria transmission for targeted malaria control. *Journal of Infectious Diseases*. 2010; 201(11): 1764-1774.

Bousema T, Griffin JT, Sauerwein RW, Smith DL, Churcher TS, Takken W et al. Hitting hotspots: spatial targeting of malaria for control and elimination. *PLoS Medicine.* 2012; 9(1): e1001165.

Brockman A, Price RN, van Vugt M, Heppner DG, Walsh D, Sookto P, Wimonwattrawatee T, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F. Plasmodium falciparum antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94: 537-544.

Bruce-Chwatt LJ, Black R H, Canfield C R, Clyde D F, Peters W, Wernsdorfer W. Chemotherapy of malaria.WHO Monogr SeL. 1986; 2 (27).

Bruce-Chwatt LJ. Malaria in African infants and children in Southern Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol*. 1952; 46(2): 173-200.

Bruce-Chwatt LJ, De Zulueta J. Essential Malariology. W Heinemenu med Bocks Ldt, *London, chap*. 1985; 8:166-209.

Ceesay SJ, Casals-Pascual C, Nwakanma DC, Walther M, Gomez-Escobar N, Fulford AJC et al. Continued decline of malaria The Gambia with implications for elimination. *PLoS One.* 2010; 5(8): e12242.

Cerutti C JR, Durlacher RR, de Alencar FE, Segurado AA, Pang LW. *In vivo* efficacy of mefloquine for the treatment of *falciparum malaria* in Brazil. *J Infect Dis.* 1999; 180: 2077-2080.

Cervinskas J., Berti P., Desrochers R. et al. Evaluation de la possession et de l'utilisation des MIILD au Mali huit mois après la campagne intégrée de décembre 2007 : Rapport final. 2008

Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae S.S.* from Cote d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999; 15(1): 53-9.

Chippaux J. P, Akogbeto M, Massougbodji A. & Adjagba J. Mesure de la parasitémie palustre et évaluation du seuil pathogène en région de forte transmission. *Cahier ORSTOM, Série Entomologie médicale et Parasitologie*. 1989; 27: 12 pages.

Cohen JM, Smith DL, Cotter C, Ward A, Yamey G, Sabot OJ et al. Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. *Malaria Journal*. 2012; 11: 122.

Chouaibou M, Simard F, Chandre F, Etang J, Darriet F. Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against Anopheles funestus and pyrethroid-resistant Anopheles gambiae in North Cameroon. *Malar J*. 2006; 5: 77.

Coluzzi, M. Malaria vector analysis and control. *Parasitology Today.*1992; 8(4): 113-118.

Comité International de la Croix Rouge, Manuel de gestion des déchets médicaux. 2011. 162 pages.

Conway D J. Molecular epidemiology of malaria. Clin Microbiol Rev. 2007; 20 (1): 188-204.

Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85(23): 9109-9113.

Cui L, Yan G, Sattabongkot J, Chen B, Cao Y, Fan Q, et al. Challenge and prospects for malaria elimination in the Greater Mekong Subregion. *Act Tropica*. 2011; 121(3): 240-245.

Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister, S, Wittlin S et al. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of Plasmodium: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Medicine*. 2012; 9(2): e1001169.

Denon E , Kinde-Gazard D et al. Comparative study of the effectiveness of combination therapies based on artemisinine in Dassa Zounme and Parakou: case of Artemether lumefantrine and Artesunate amodiaquine. *International Journal of Microbiology and Mycology*. 2014; 2(2): 1-9.

Desjardins RE, Canfield C J, Haynes J D, Chulay J D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979; 16 (6): 710-718.

Djimde A. Mécanismes moléculaires de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* et nouvelles stratégies thérapeutiques. *Académie nationale de pharmacie; ;Université Paris Descartes*. 2010; 1-3.

Djimde A, Doumbo O K, Cortese J F, Kayentao k, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su X Z, Nomura T, Fidock D A, Wellems T E, Plowe C V, Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria.
N Engl J Med. 2001; 344 (4): 257-263.

Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: Detection of Polymorphisms in the Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthetase Genes by PCR and Restriction Digestion Exp parasitol. 1998; 89 (1): 1–8.

Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. Acta Trop.2005;94(3):181-190.

Enquête Démographique et de Santé (EDSB IV) . 2011-2012, *INSAE*. 2013; 551 pages.

Feachem RGA, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM et al. Shrinking the malaria map: progress and prospects. *The Lancet*. 2010; 376: 1566-1578.

Fernandes N, Figueiredo P, DO Rosario VE, Cravo P. Analysis of sulphadoxine/ pyrimethamine resistance-conferring mutations of *Plasmodium falciparum* from Mozambique reveals the absence of the dihydrofolate reductase 164L mutant. *Malar J*. 2007; 6: 35.

Filler S, Causer LM, Newman RD, Barber AM, Roberts JM, MacArthur J, Parise ME, Steketee RW. Malaria surveillance-United states. MMWR Surveill Summ. 2003; 52 (5): 1-14.

Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 4097-4102.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum.* Nature. 2002; 419: 498-511.

Gay F, Bustos D, Traore B, Jardinel C, Southammavong M, Ciceron L, Danis MM. In vitro response of *Plasmodium falciparum* to atovaquone and correlation with other antimalarials: comparison between African and Asian strains. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 56: 315-317.

Gentilini M. Paludisme. Marketing/Ellipses eds, cinquième édition. 1991; 87-99.

Gentillini M, Duflo B, Danis M, Lagardere B, Richard-Lenoble D**.** Médecine tropicale. 5ème édition. Paris: Flammarion. 1993; 91-112.

Giboda M, Denis MB. Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: invivo assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance in vitro. *J Trop Med Hyg*. 1988; 91: 205- 211.

Gil JP, Nogueira F, Stromberg-Norklit J, Lindberg J, Carrolo M, Casimiro C, Lopes D, Arez AP, Cravo PV, Rosario VE. Detection of atovaquone and Malarone resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b gene (cytb). Molecular and cellular Probes. 2003; 17 (2-3): 85-89.

Gouissi, Salifou, Edorh, Guedenon P, Boni G, Djenontin A, Montcho SA, Akogbeto M, Boko M. Comparative study of effectiveness of three arms of combination therapy artemisinin based on children under 5 years in the commune of Aguegues in Benin. *Continental J. Pharmaceutical Sciences.* 2012; 6 (1): 1-9, 2012

Grassi B, Bignami A, Bastianelli G. Ulteriori ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani nel corpo del zanzarone. *Atti Reale Accademia dei Lincei*, S 5. 1899a; 8: 21.

Grassi B, Bignami A, Bastianelli G. Ulteriori ricerche sulla malaria. *Rendiconti della Reale Accademia dei Lincei, Roma*. 1899b; VIII: 434-438.

Harbach RE. The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Ent Res*. 2004; 94: 537-553.

Harper R, Reeves B. Reporting of precision of estimates for diagnostic accuracy: areview. BMJ 1999; 318: 1322-1323.

Hastings LM, Watkins WM, White NJ**.** The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination halth life. Philosophical. Trans R Soc L Ser B. 2002; 357 (1420): 505-519.

Holmgren G, Gil J P, Ferreira P M, Veiga M I, Obonyo C, Björkman A. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of Pfcrt 76T and Pfmdr1 86Y. Infect Genetics Evol. 2006; 6 (4): 309-314.

Hudson AT, Dickins M, Ginger CD, Gutteridge WE, Holdich T, Hutchinson DB, Pudney M, Randall AW, Latter VS. 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. *Drugs Exp Clin Res*. 1991; 17: 427-435.

Hurwitz ES, Johnson D, Campbell CC. Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine pyrimethamine ('Fansidar') in a refugee camp in Thailand. *Lancet.* 1981; 1: 1068-1070.

Hyde JE. Drug-resistant malaria. Trends Parasitol. 2005; 21 (11): 494-498.

Institut National de la Statistique Appliquée à l'Economie. Projection de la population de l'ensemble du Bénin de 1997 à 2032. Cotonou. 1999

Institut National de la Statistique Appliquée à l'Economie. Recensement général de la population et de l'habitation. 2002; Tome 3 ; (RGPH 3) 51

Julie T., Robert P., Salif N. et al. Evaluation de la campagne intégrée de distribution de MIILD, de vitamine A et de Mébendazole au Sénégal : Rapport final, EPCS ; 2011 ; 93

Khouri P, Claude F. Le paludisme. *AJM production*. 1990.

Kinde-Gazard et al. Essai clinique randomisé comparant l'efficacité et la tolérance de la combinaison artémisinine-naphthoquine (Arco®) et artéméther-luméfantrine (Coartem®) dans le traitement du paludisme simple au Bénin. *Bulletin de pathologie exotique*. 2012; 105(3): 208-214.

Kinde-Gazard D. et al. The risk of malaria transmission by blood transfusion at Cotonou, Benin Cahier Santé 2000; 10(6):389-392)

Kitua A, Y, Smith T, Alonso, PL, Masanja H, Urassa H, Menendez C, Kimario J, Tanner M. *Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health*. 1996; 1(4): 475-484.

Kitua AY, Smith TA, Alonso PL, Urassa H, Masanja H. The role of low level *Plasmodium falciparum* parasitaemia in anaemia among infants living in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health*. 1997; 2(4): 325-33.

Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 2100-2108.

Kosaisavee V, Suwanarusk R, Nosten F, Kyle D E, Barrends M, Jones J, Price R, Russell B, Lek-Uthai U. *Plasmodium vivax*: isotopic, PicoGreen, and microscopic assays for measuring chloroquine sensitivity in fresh and cryopreserved isolates. Exp Parasitol. 2006; 114 (1): 34-39.

Kublin J G, Dzinjalamala F K, Kamwendo d D, Malkin E M, Cortese J F, Martino L M, Mukadam R A, Rogerson S J, Lescano A G, Molyneux M E, Winstanley P A, Chimpeni P, Taylor T E, Plowe C V. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis. 2002; 185 (3): 380-388.

Kunene S, Phillips AA, Gosling RD, Kandula D, Novotny JM. A national policy for malaria elimination in Swaziland: a first for Sub-Saharan Africa. *Malaria Journal*. 2011; 10: 313.

Laveran A. Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *Bull Acad Méd 2nd Série*. 1880; 9: 1235-1236.

LE Bras J. Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de *Plasmodium falciparum.*Bull Path Exo, 1999 ; 92 (4) : 236-241.

LE Bras J, Andrieu B, Hatin I, Savel J, Coulaud J-P. *Plasmodium falciparum :* interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité in vitro par incorporation de 3H-hypoxanthine. Path Biol. 1984; 32: 463-466.

LE Bras J. Chimiorésistance du *Plasmodium falciparum*. *Path Inf*. 1999; 29(182): 274-281.

LE Bras J, Durand R. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003; 17(2): 147-153.

Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA. Et al. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med*. 1987; 317(11): 675-9.

Mccutchan TF, Dame JB, Miller L H, Barnwell J. Evolutionnary relatedness of *Plasmodium* species as determined by the structure of DNA. Science. 1984; 225 (4664): 808-811.

Makler M T, Ries J M, Williams J A, Bancroft JE, Piper R C, Gibbins B L, Hinrichs D J. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48 (6): 739-741.

May J, Meyer C G. Association of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter variant T76 with age-related plasma chloroquine levels. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68(2): 143-146.

Mazier D, Danis M, Mouchet J. Vaccination In Paludisme ELLIPSES/AUPELF Paris.1991; 228-233. 235

Microbial Life Educational Resources http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html consulté le 22/06/2010.

Ministère de la Santé. Annuaire des statistiques sanitaires du Benin. *Cotonou*. 2012, 147 pages

Mita T, Kaneko A, Hombhanje F, Hwaihwanje I, Takahashi N, Osawa H et al. Role of pfmdr1 mutations on chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates with pfcrt K76T from Papua New Guinea. Acta Trop. 2006;98(2):137-144.

Moucbet J, Camevale P, Cooseman M, Fentenille D, Ravaonjabary C, Richard A, Robert V. *Cahier de santé*. 1993; 3: 220-238.

Müller O, Traoré C, Kouyaté B, YÉ Y, Frey C, Coulibaly B, Becher H. Effects of insecticide-treated bednets during early infancy in an African area of intense malaria transmission: a randomized controlled trial. *Bull. World Health Organ.* 2006; 84 (2): 120- 126.

Nébié I, DiaUo G, Lamizana L, Habluetzel A, Pagnoni F, Esposito F. Surveillance active et passive de la sensibilité de Plasmodium falciparum à la chloroquine au Burkina faso. *Communication au 4ème congrès de la Société Ouest Africaine de Parasitologie, Décembre 1994, Ouagadougou (Burkina Faso).* 1994.

Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma E C, Tiono A B, Konate A T, Chilengi R, Theisen M, Dodoo D, Remarque E, Bosomprah S, MIlligan P, and Sirima S B. Humoral Responses to *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Antigens and Association with Incidence of Clinical Malaria in Children Living in an Area of Seasonal Malaria Transmission in Burkina Faso, West Africa**.** Infection and Immunity. 2008; 76 (2): 759-766.

Newton CR, Hien TT, White N. Cerebral malaria. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000; 69(4): 433-41.

N'guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(2): 199-206.

Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49 (8): 3575-3577.

Nsimba B, Jafari-Guemouri S, Malonga DA, Mouata AM, Kiori J, Louya F. Epidemiology of drug resistance malaria in Republic of Congo: using molecular evidence for monitoring antimalarial drug resistance combined with assessment of antimalarial drug use. *Trop Med Int Health*. 2005; 10(10): 1030.

Nwanyanwu OC, Kumwenda N, Kazembe PN, Jemu S, Ziba C. Malaria and human immunodeficiency virus infection among male employees of a sugar estate in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997; 91(5): 567-9.

Nzila-Mounda A, Mberu EK, Sibley CH, Plowe CV, Winstanley PA, Watkins W M. Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorcycloguanil activity in vitro and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(1): 164-169.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS) Surveillance de la résistance aux antipaludiques, rapport d'une consultation de l'OMS.Genève, Suisse. 2002, 35. WHO/CDS/CSR/EPH/2002. 17; WHO/CDS/RBM/2002.39

Organisation Mondiale de la Santé (OMS) WHO/CDS/CPE/SMT/2002.18 Rev1 partie2. 2002.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). World malaria report 2005. *Geneva: World Health Organization*. 2005.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). WHO announces pharmaceutical companies agree to stop marketing single-drug artemisinin malaria pills. *Geneva: World Health Organization*.2006.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Rapport 2009 sur le paludisme dans le monde. *Genève : OMS*. 2009; 55-65.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques, rapport sur la surveillance globale 1996-2004; Genève, 2005

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Méthodes and techniques for clinical trials on antimalarial drugs efficacy parasites populations. Genève, 2008

Organisation Mondiale de la Santé dans « Directives OMS pour la campagne de moustiquaire imprégnée, OMS ; 2011.

Otten M, Aregawi M, Were W, Karema C, Medin A, Bekele W et al. Initial evidence of reduction of malaria cases and deaths in Rwanda and Ethiopia due to the rapid scale-up of malaria prevention and treatment. Malaria Journal 2009; 8(14).

Ouedraogo JB, Lamizana L, Toe Acr, Kumilien S, Gbary AR, Guigemde TR. Emergence du paludisme chimiorésistant au Burkina Faso. *Med Afr Noire*. 1991; 38(4): 1-4.

Paget-Mcnicol S, Saul A**.** Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*. Parasitology 2001; 122 (5): 497-505.

Pelletier P, Caventou J. Recherche chimique sur les quinquinas. *Ann Chim Phys*. 1820; 15: 289-318 et 337-367.

Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapied B, Hougard JM. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J*. 2007; 6: 38.

Peterson D S, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85(23): 9114-9118.

Picot S. Méthodes d'étude de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux quinoleïnes. Med Trop. 2001; 61:15-20.

Pino P, Vouldoukis I, Kolb, JP, Mahmoudi N, Desportes-Livage I. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. J Infect Dis. 2003; 187(8): 1283-90.

Pollack Y, Katzen A L, Spira D T, Golenser J. The genome of *Plasmodium falciparum*. I: DNA base composition. Nucleic Acids Res. 1982; 10 (2): 539-546.

Présidence de la République du Bénin, Décret 2006-087 portant approbation du document de politique nationale d'hygiène hospitalière en République du Bénin. 2006 ; 27 pages

Présidence de la République du Bénin. Décret N° 2002- 484 portant gestion rationnelle des déchets biomédicaux en République du Bénin. 2002; 25 pages

Price R N, Uhlemann A C, Brockman A, Mcgready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White N J, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. Lancet. 2004; 364 (9432): 438-447.

Programme National de Lutte contre le paludisme. Directives nationales de Lutte contre le paludisme. Cotonou. 2012.

Reichenow E. Zentralbl. Bakteriol 1920. 85: 207-216

Ringwald P, Dubois B, Le Bras J. Deloron P. *Plasmodium falciparum*: in vitro models of cytoadherence of infected erythrocytes and an analysis with eight different isolates on different target cells. *Exp Parasitol*. 1993; 76(4): 442-6.

Robert V, Carnevale P, Ouédraogo V, Petrarca V, Coluzzi M. La transmission du paludisme humain dans un village de savane du sud-ouest du Burkina Faso. *Ann. Soc. belge Méd. trop*. 1988; 68 (2):107-121.

Robert V. La transmission du paludisme humain: la zone des savanes d'Afrique de l'Ouest. Thèse, *Université de Paris 6*. 1989; 325p.

Rogier C, Henry MC, Spiegel A. Diagnosis of malaria attacks in endemic areas: theoretical aspects and practical implications. *Med Trop*. 2001; 61(1): 27-46.

Ross R. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. *British Med J*. 1897; 2: 1786-8.

Sangaré D. Dynamique des populations d'*Anophèles gambiae S.L, d'An.funestus* et de *Plasmodium falciparum* dans le système de transmission par relais du paludisme à Donéguéougou (arrondissement central de Kati). Thèse de Doctorat -ISFRA-Bamako. 2000.

Sherman I, W, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect*. 2003; 5(10): 897-909.

Sinden RE. Gametocytes and sexual development. In: Sherman IW, Malaria: parasite, biology, pathogenesis, and protection. *American society for microbiology Press, Washington DC*. 1998; 25-48.

Sirima S B, Nebie I, Ouedraogo A, Tiono A B, Konate A T, Gansane A, Derme A I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Cuzzin-Ouattara N, Cousens S, Leroy O. Safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 long synthethic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa. Vaccine. 2007; 25(14): 2723-2732.

Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly J X, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48 (5): 1803-1806.

Su X, Hayton K, Wellems TE. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. Nat Rev Genet. 2007; 8 (7): 497-506.

Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, Dutta S, Reidler R, Angov E. Phase 1/2a Study of the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) Administered in Adjuvant System AS01B or AS02A. PLoS ONE. 2009; 4(4): e5254.

Taylor LH, Read AF. Why so few transmission stages? Productive restraint by malaria parasites. *Parasitol today*. 1997; 13: 135-140.

The RTS,S. Clinical Trials Partnership. First results of Phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England Journal of Medicine.* 2011; 365: 1863-1875.

Tinto H, Ouedraogo JB, Traore M, Guiguemde TR. Attitude à propos de la résistance parasitologique de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques. *Cah Etu Rech Franco*. 2004; 14(2): 69-73.

Trape JF. Limits of impregnated bednets for malaria control in tropical Africa. *Bull Soc Pathol Exot.* 2001; 94(2 Pt 2): 174-9.

Trape JF, Tall A, Diagne N, Ndiath O, Ly AB, Faye J et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *The Lancet Infectious Diseases.* 2011; 11(12): 925-932.

Treutiger CJ, Hedlund I, Helmby H, Carlson J, Jepson A. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 46(5): 503-10.

Triglia T, Cowman A F**.**Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91 (15): 7149-7153.

Triglia T, Wang P, Sims PF, Hyde JE, Cowman AF. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. EMBO J. 1998; 17: 3807-3815.

Uhlemann AC, Krishna S. Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment. Curr Top Microbiol Immunol. 2005;295:39-53.

Ursing J, Kofoed PE, Rodrigues A, Rombo L, Gil JP. *Plasmodium falciparum* genotypes associated with chloroquine and amodiaquine resistance in Guinea-Bissau. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76(5): 844-8.

Valero M V, Amador J R, Galindo C, Figueroa J, Bello M S, Murillo L A, Mora A L, Patarroyo G, Rocha C L, Rojas M. Vaccination with SPf66, a chemically synthetised vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. Lancet. 1993; 341 (8841): 705-710.

Van Vugt M. et al. Randomized comparison of arteméther-benflumetol and artesunate mefloquine in treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. *Antimicrobial agents of Chemotherapy*. 1998; 42(1): 135-139.

Verdrager J. Epidemiology of emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in Southeast Asia. Southeast *Asian J Trop Med Public Health.* 1986; 17: 111-118.

Wakpo A. Evaluation de la chimiosensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à la monodéséthylamodiaquine, la quinine, la dihydroartémisinine, la luméfantrine et la pyriméthamine à Allada, Bénin. [Thèse de doctorat d'état en médecine]. *Cotonou: Université d'Abomey Calavi, Faculté de médecine*; 2008; N°1429: 5-30.

Wang R, Smith J D, and Kappe S H I. Advances and challenges in malaria vaccine development Expert Rev Mol Med. 2010; 11: e39.

Wang SJ, Lengeler C, Smith TA. Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: Epidemiology of urbanmalaria In Cotonou (Benin), Malaria Journal 2006; 5:45

Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*. 2001, 184: 770-77.

Wernsdorfer WH. Epidemiology of drug resistance in malaria. Acta Tropica. 1994; 56 (2-3): 143-156.

White NJ. The pathophysiology of malaria. *Adv parasitol*. 1992; 31: 83-173.

White N. Modelling malaria control. *PloS Medicine*. 2006; 3: e 111-e 112.

White N. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. Philosophical. Trans R Soc L Ser B. 1999; 354 (1384): 739-749.

Wilson R J,Williamson D H. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. Microbiol Mol Biol Rev 1997, 61(1): 1-16.

World Health Organization. Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990; 84 Suppl 2: 1-65.

World Health Organization. Expert Committee on Malaria. Technical Report Series, No. 892. *Geneva: WHO*. 2000.

World Health Organization. Weekly epidemiological record. *Geneva*. 2006; 69-80.

World Health Organization. World Malaria Report, 2010.

World Health Organization. World Malaria Report, 2011.

WHO a. Scalling up diagnostic testing, treatment and surveillance for malaria. *Geneva: World Health Organization*. 2012.

WHO b. Disease surveillance for malaria control: operational manual. *Geneva: World Health Organization*. 2012; 65 pages

World Health Organization c. World Malaria Report, 2012.

WHO. Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme, manuel pratique. *Geneva: World Health Organization*. 2013; 165 pages

WHO. (Yves Chartier; Annette Pruss) Safe Management of Wastes from Health-Care Activities. 1999.

Wu Y, Kirkman L A, Wellems T E. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologus integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(1): 1130-1134.

Yuvaniyama J, Chitnumsub P, Kamchonwongpaisan S, Vanichtanankul J, Sirawarapornw, Taylor P, Walkinshaw m D, Yutavong Y. Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures.Nature structural biology. 2003; 10: 357-36.

Zhang GQ, Guan YY, Zheng B, Wu S, Tang LH. Molecular assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in China. *Trop Med IntHealth*.2009; 14(10): 1266-1271.

Zhang K, Rathod P K. Divergent regulation of dihydrofolate reductase between malaria parasite and human host. Science. 2002; 296 (5567): 545-547.

Publications

1- **Efficacité et innocuité de artemether lumefantrine**

2- **Prise en charge gratuite du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes**

3- **Evaluation des TDR et du Cyscope versus Goutte épaisse**

4- **Evaluation post campagne MIILD 2011**

International Journal of Microbiology and Mycology | IJMM
pISSN: 2309-4796
http://www.innspub.net
Vol. 2, No. 2, p. 1-9, 2014
Open Access RESEARCH PAPER

Comparative study of the effectiveness of combination therapies based on atemisinine in Dassa Zounme and Parakou: case of *Artemether lumefantrine* and *Artesunate amodiaquine*

Yves Eric Denon*, Yolande Sissinto, Filémon Tokponnon, Mariam Oke, Dorothée Kinde Gazard, Hortense Kossou, Dina Gbenou, Achille Massougbodji, Frederick Loko

National Malaria Control Program, Ministry of Health (1); 01BP6974 Cotonou, Bénin

Keywords therapeutic efficacy, Artemether-lumefantrine, Artesunate-amodiaquine, parasitologic clairance, apyrexy.

Publication date: March 09, 2014

Abstract

The National Malaria Control Program recommended in 1993, the use of Chloroquina (CQ) as first line drug for malaria treatment, and sulfadoxin pyrimethamin as second drug. After years, Benin knows resistance about these antimalarials. Quinina was to treat gravities. In 2004, the strategy of treatment changed. Treatment of malaria cases is based on use of arteminisinia therapeutic combination. The goal of this study is to be sure that these drugs are efficace before general use in the country and in some regions as Dassa Zounmè where the resistance is up (61. 3% for Chloroquina CQ and 45.9% for SP in 2002).The study is based on: comparison of therapeutic efficacy of artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine. Results show that all of the tested drugs have good therapeutic efficacy. Most important rate failure is in Dassa Zounmè (33, 86%) than Parakou (23, 44%). They are parasitologic failure and are probably due to the reinfestation of children. Two drugs have a good parasitological clearance and eliminate fever after 2 days of treatment.

Abbreviations

ACPR: Adequate Clinical and Parasitological Response
LPF: Late Parasitological Failure
ETF: Early Therapeutic Failure
LCF: Late Clinique Failure
NMCP: National Malaria Control Program

Scientific names

Plasmodium falciparum ; Plasmodium malariae ; Plasmodium vivax ; Plasmodium ovale ; Anopheles gambiae ; Artemether lumefantrine ; Artesunate Amodiaquine ; Sulfadoxine - Pyriméthamine

* Corresponding Author: Yves Eric Denon ✉ denric2000@yahoo.fr

Introduction

The intertropical zone is a region characterized by a varied Tropical Pathology, with a predominance of endemic-epidemic diseases and the most important is malaria. In Africa and in the countries in South of Sahara, as Benin, particularly malaria is the most important disease of all parasitic diseases. According to the most recent estimates, there are 300 to 500 million clinical cases each year with more than 90% in the countries in South of Sahara (Roll Back Malaria, 2005 Plan stratégique mondial Faire Reculer le Paludisme 2005-2015). Malaria is by far the most important tropical parasitic diseases in the world. Due to a parasite named *Plasmodium*, it is transmitted to humans by the bite of the infected female Anopheles. It is present in 100 countries.

Between 300 and 500 million clinical cases are recorded each year, causing more than a million deaths. 90% of death occurs in sub Saharan Africa where children are particularly affected. In Africa, a child dies every 30 seconds as a result of a malaria. In the WHO African region, where arise 80 to 90% of deaths, malaria is a major public health problem. He became a major obstacle to economic development and the improvement of the level of health of populations (OMS/CDS/RBM, 2000). It is estimated that, in many countries, spending on malaria can reach 40% of expenditures for the health sector and that 20 to 50% of hospital admissions are attributable (WHO and UNICEF, 2003).

Indeed, malaria maintains poverty. It costs Africa 12 billion dollars per year in GDP lost. It absorbs up to 25% of the household income and represents 40% of Government health spending. (Roll Back Malaria, PSM 2005-2015) Malaria is one of the leading causes of morbidity of children and teachers and truancy. The sick child cannot go to school or assimilate knowledge; In addition, neurological damage and lasting cognitive impairment are feared (Roll Back Malaria, PSM 2005-2015 Malaria) is a major cause of child mortality in Africa. It is responsible for 20% of all deaths of children aged less than 5 years. (Roll Back Malaria, PSM 2005-2015 Malaria) Currently antimalarial medicines are expensive and available in too small quantities. Public/private partnerships that are currently trying to improve access to affordable antimalarial drugs may be a starting point for the improvement of access to other essential medicines.

In Benin, this disease represents 39.7% of the causes of recourse to care in health units and is the major illness suffered by communities in 2006(Annuaire des statistiques sanitaires 2008). Malaria is the leading cause of hospitalization (24.7%) and death. It occurs in all regions of Benin. If today the disease makes many victims, it is due to resistance to antimalarial drugs. The resistance of the parasite to the drugs is the main obstacle to the control of malaria.

The challenge today is a permanent course against the ability of the parasite to resist treatments. The key axes of the strategy against malaria are to encourage the use of combination therapies (CTA), in countries where the disease is endemic, preferably containing a derivative of artemisinin (artesunate, artemether, etc.). The artemisinin derivatives (Qinghaosu), extracted from artemisia annua, a plant long used in Chinese medicine, allowed to make a new class of antimalarial drugs, for faster action on the disappearance of blood parasites. So far, no resistance of the parasite to the artemisinin derivatives was observed.

This study compared the effectiveness of therapeutic combinations of artemisinin in Dassa Zounme and Parakou to support on two acts recommended by the National Control Program against malaria named Artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine for uncomplicated malaria in Benin.

Materials and Methods

Presentation of the study site

The study took place in the municipalities of Dassa-Zoumé and Parakou. The choice of the site of Dassa-Zoumé is justified by the rate especially high therapeutic failures (61.3% to CQ, 45% for MS) studies in 2002 and due to their epidemiological facies. Investigations covered two by commune health centres (Paouignan and Dassa centre; Parakou and Kpebie).

Study population

Participants are children aged 6-59 months. Patients who present an axillary ≥ temperature 37.5 ° C are recruited after consent of parents or guardians in the service of external consultations and then headed the investigation team.

The selection criteria

Age between 6 and 59 months in Republic of Benin.

Absence of systemic signs of danger or severe malaria.

Absence of other pathologies febrile obvious (IRA, Infections ORL)

Absence of severe malnutrition

Mono Infection to *P. falciparum* parasite between 2000/µl and 200,000 density-specific parasites/µl of blood;

Informed consent of the parent or guardian;

Ease to meet appointments

Axillary Temperature greater than or equal to 37.5oC

Absence of allergy or history of allergy to any of the tested drugs,

Conservation of blades

The blades are stored in a box of blades during the study

At the end of follow-up, each patient blade should be packed and stored to free boxes.

Conservation of filter paper

Blood samples on filter papers are dried at room temperature, away from light and transferred to a plastic bag containing silica gel for conservation.

Treatment

Treatment for malaria was randomized, until the inclusion of 50 patients per treatment group. It is also recommended to keep below 10% of the total sample size errors in classification of patients. Discrepancies of more than 10% during quality control would require proofreading of all blades and the reclassification of all subjects in the study. Make sure that the patient swallows all drugs tested on day 0, 1 and 2 in your presence and observe the patient for 30 minutes at least. If the patient vomits during this period, repeat the treatment. If the repeated dose is spewed out, remove the patient from the study and refer them to specialized services for adequate support. The recommended dosage and doses are treatment guidelines provided by the National Malaria Control Program**.** The participants received systematically paracetamol on days 0, 1 and 2 depending on weight.

Study methodology

The Determination of the size of the sample is made with SCHWARZ formula. For this study, the chosen size is 120 children by region (sixty by drug) or 240 children who fulfil the conditions laid down for inclusion.

Difficulties encountered

This study was very restrictive on several fronts: some parents or guardians of children are not honoring meeting; some roads to the homes of children are very difficult. The study was approved by ethical committee of the Faculty of Health Science (University of Abomey-Calavi) in Benin. Written informed consent was given by all women for their children participating in this study.

Characteristics of the study population according

to age

Sex ratio (male on female) is 1.46

Children aged 6 months to 3 years are almost 75% of the sample Dassa Zoume.

The distribution is balanced by age group. Contraire of the case of Dassa Zoume, no age category will not affect the results.

Apyrexy

The above table indicates that all children included in the study had a J0 temperature which varies between 37 ° 5 c and 41° C. After 2 days of treatment with Artemether lumefantrine or Artesunate amodiaquine, more than 96% of febrile children had their temperature below 37°5° C. . There is no statistically significant difference between Lumefanrine Artemether and Artesunate Amodiaquine in relation to the apyrexie (P > 0.05).

Parasitic clearance

82% to 98% of treated children have a density parasitic zero on the second day of treatment regardless of the drug. Regardless of the site and the drug,no treated children had parasite density to J3 greater than or equal to 25% of that of J0. There is no statistically significant difference between Lumefanrine Artemether and Artesunate Amodiaquine regards (P > 0.05).

Rate of treatment failures and clinical and parasitological response adequate

Dassa Zoume

- Artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine have respectively a late parasitological failure (EFA) from 33.86% rate and 23.44%.
- Artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine have a rate of early therapeutic failure no (FTE) of 0%.
- Artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine have a clinical response rate and parasitological adequate (APCR) respective 66.13% and 76,56%.

Parakou

- Artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine have a failure rate therapeutic early (FTE) of 0%.
- Artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine have a clinical response rate and parasitological adequate (APCR) 98.55% and 100%.

Discussions

Results of clinical and biological examinations

Follow-up of children during the 28 days of treatment helped to obtain interesting results to the clinical and biological perspectives. Indeed, all the children treated with either of the drugs had a systematic reduction of fever. Biological diagnosis also shows a good reduction in parasite load.

The rate of treatment failures

According to the rates, of treatment failures, the results show that early treatment failure rate is 0% regardless of the medication and the site. The LPF vary between 23.44 and 33.88% at Dassa Zoume. On the other hand, in Parakou, these rates are zero. The high rate of EPT can be explained by several parameters:

-children do not sleep under bednets at home as recommended in the study.

-The strains of parasites are resistant. But this analysis was rejected by the rate zero of early treatment failure. Parasites has been cleaned, it is not probably these strains remain until J28.

-Clearly, hypothesis of reinfestation is more logical. Indeed, if the children are not sleeping under nets, it may be infected the last weeks of their follow-up. It is therefore necessary to make confetti of filter paper for these cases of late treatment failures are subject of a genotyping. Therefore, the molecular weights of the parasites can make difference between reinfestation and recrudescence. If these cases were classified as reinfestation, it would reduce the overall failure

rate. Cases of clinical and parasitological responses adequate confirm although other authors and researchers believe the drug. Indeed, the therapeutic combination of drugs has for interest to exploit their synergistic and additive properties. It induces the rapid and sensitive parasitic biomass reduction, rapid elimination of the parasite, rapid disappearance of clinical symptoms.

Table 1. Drop in temperature (Apyrexy) in patients.

	T° à J0 > 37°5				T° J2 < 37°5			
	Dassa Zoumè		Parakou		Dassa Zoumè		Parakou	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ATM LUM	62	100%	69	100%	61	98,4	68	98,6
ASAQ	64	100%	64	100%	62	96,9	63	98,4

Parasite clearance and the decrease of fever.

After 48 h of treatment, parasitic biomass was strongly reduced. It becomes zero for 82.3 to 98.4% of treated patients. On the other hand, there is that fever falls in most of the children at the end of the same period. This efficiency observed in the drug presents a worrying aspect related to the behavior of populations. Indeed, the disappearance of clinical signs may be a factor which will influence further processing. If we know that a patient who feels better is struggling has continue his treatment, he must recognize therefore that awareness must be made to avoid resistance to these drugs. These results are trend to those obtained by J.B. Oke *et al* who also found that these drugs reduce the parasitic biomass and caused the disappearance of clinical signs.

Table 2. Parasite clearance after 48 h treatment.

	2000< DP< 200000				DP J2 = 0			
	Dassa Zoumè		Parakou		Dassa Zoumè		Parakou	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ATM LUM	62	100%	69	100%	51	82,3	67	97,1
ASAQ	64	100%	64	100%	54	84,4	63	98,4

Furthermore there is no significant difference between the results obtained with Artemether Lumefantrine and Artesunate Amodiaquine. The high rate of EPT parasitological failure late obtained at Dassa Zoume with both drugs should be linked to the behaviour of the population in individual protection against malaria. It has been evaluated on the number of people cured to J3. The graphics showed that more than 80% of children were cured at J3.

Table 3. Rate of treatment failures and clinical and parasitological responses adequate for children aged 6-59 months.

Sites	n	ACPR	ETF	LPF	LCF	TE
		Arteméther Luméfantrine				
Dassa Zoumè	62	66,13%	0%	32,25%	1,61%	33,86%
Parakou	69	98,55%	0%	0%	1,45%	1,45%
		Artésunate Amodiaquine				
Dassa Zoumè	64	76,56%	0%	23,44%	0%	23,44%
Parakou	64	100%	0%	0%	0%	0%
TOTAL	259					

Analysis of sociological parameters that can influence the effectiveness of antimalarial drugs

In 2004, the study of the socio-cultural determinants of treatment failures of antimalarial drugs in the management of uncomplicated malaria Plasmodium falciparum in the municipalities of Dassa Zoume and Lokossa revealed that 73% of people believe that chloroquine is still effective in the treatment of malaria (therefore 27% think that chloroquine is not effective). This response compared with that obtained by the NMCP, shows that the difference between 27 and 35% is not significant (P > 0.05). One can therefore estimate that the results obtained by the scientists are in line with the populations. Furthermore, molecular biology tests had been made on samples, it would certainly have failure rate slightly lower than those that led to the change in policy, so closer to the results obtained in the community.

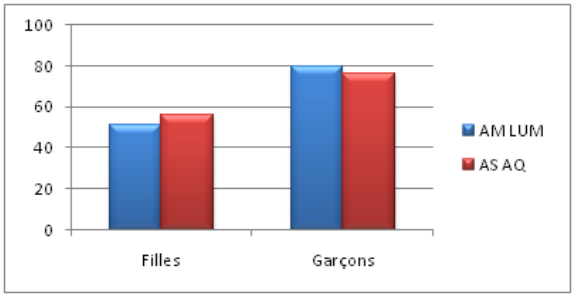


Fig. 1. Distribution of children according to the sex and drug.

For populations, chloroquine is effective for the management of malaria cases. Therefore, one might think that the change in policy of support for malaria by the Ministry of health (MS/NMCP) is not appropriate. However, the change in the national policy of support for malaria cases is governed by the principles of public health taking into account the problems of health in macro terms. Indeed, although the majority (73%) think that the drug is effective, do not change would mean that on 1261000 children of less than five years that will make malaria each year, 27% or 340470 will have therapeutic failures and therefore will move to severe malaria with approximately 234924 death. Furthermore, WHO recommends that as soon as the failure rate reached 10-15%, must begin the process of policy change.

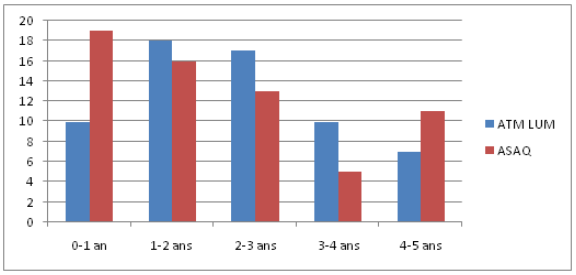


Fig. 2. Numbers of children by age according to the drug to Dassa.

Note, however, that people adopt behaviors that do not promote:

-the protection of the molecules

-the decline or rates of parasite resistance to antimalarials.

In fact, 76% of respondents use chloroquine to prevent malaria on a frequency ranging from daily to weekly (66%).These behaviours that are contrary to the requirements of the national malaria policy makes them used parasites in insufficient doses of molecules, thus to induce resistance. Following all this, and in order to protect its populations, Benin has opted for the revision of its policy of anti-malarial drugs, now oriented therapeutic combinations based on artemisinin (CTA) and more particularly the Artemether-Lumefantrine association instead of CQ.

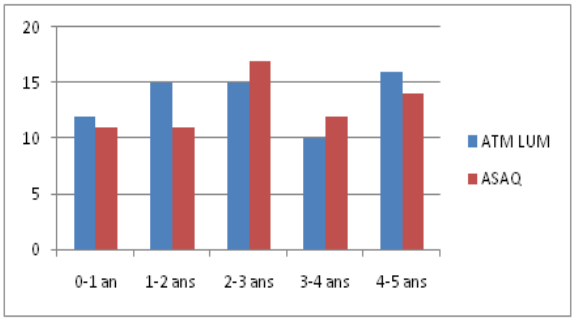


Fig. 3. Number of children by age according to the drug in Parakou.

Currently, combination therapies are available in the health centres. Their use is preceded by a consultation and a laboratory diagnosis of malaria

rapid diagnostic tests or by microscopy. These attitudes adopt populations should be reviewed in order to safeguard the effectiveness of these new drugs. It is important in this connection that the National Malaria Control Program increases the awareness of the populations on the use of drugs exclusively in confirmed cases of malaria and that prevention should essentially be to avoid contact vector man by the use of insecticide-treated nets.

Conclusion

The comparative study of the therapeutic efficacy of Artemether lumefantrine and Artesunate amodiaquine with children aged 6-59 months doing simple malaria Plasmodium *falciparum* has revealed that the two drugs are very effective Plasmodium over than 90%.

The ETP early treatment failure rate is zero regardless of the site. The drugs reduce to zero the parasitic biomass and caused the disappearance of clinical signs.

Under the preliminary results and discussion, the topic deserves to be deepened by the following axes:

-Organize a study on the therapeutic efficacy of Artemether lumefantrine and Artesunate lmodiaquine at Dassa Zoume and other sites in the Republic of Benin.

-Do the genotyping of molecular biology confetti made in cases of ETT late treatment failures

-Identify the probable causes of EPT late parasitological failures obtained during this study.

References

Basic Malaria microscopy. 1991. Part 1and 2 (Who; 72 pages).

Bruce-Chwatt's L. 1999. Essential Malariology, 368 pages.

Callec JJ, Hue B, Callec M. 1985. Le neurone, cible potentielle des insecticides. Insectes – Insecticides –Santé. Colloque national d'Angers, mode d'action et utilisation des insecticides. ACTA, 93-108 p.

Chippaux JP, Akogbeto M, Massougbodji A, Adjagba J. 1989. Mesure de la parasitémie palustre et évaluation du seuil pathogène en région de forte transmission. Cahier ORSTOM, Série Entomologie médicale et Parasitologie, 27, 12 pages.

Coluzzi M, Petarca V. 1973. Aspirator with paper cup for collecting mosquitoes and others insects. Mosquito's news. Annuaire de la société belge de Médecine Tropicale, **33,** 249-250 p.

Coluzi M, Sabatini A, Petrarca V, Dideco MA. 1975. Chromosomal investigation on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex in the Garki district (Kano state, Nigeria). Result on species identification from 1971-1974. WHO/TN, 1, n° 24.

Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Dideco MA. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* Complex. Tram., Society of Tropical Medecine, Hyg, **73,** 483-497 p.

Coz J. 1973. Contribution à l'étude du complexe *Anopheles gambiae*. Répartition géographique et saisonnière en Afrique de l'Ouest. Cahier ORSTOM., série Entomologie médicale et Parasitologie, **11,** 3-31 p.

Coz J, Hamon J. 1963. Importance pratique de la résistance aux insecticides en Afrique au Sud du Sahara pour l'éradication du paludisme dans ce continent. Cahier ORSTOM., série Entomologie Médicale, **1,** 27-37 p.

Danis M, Gentillini M, 1998. Le paludisme fléau mondial. Revue Pratique **48,** 254-257 p.

Davidson G. 1974. Genetic Control of insect pests. Academic Press, London, 158 pages.

Gentillini M. 1991. Généralités sur le paludisme. Paris, Editions Marketing Ellipses **240,** 177-240 p.

Global Partnership to Roll Back Malaria. 2001. The use of antimalarial drugs : report of a WHO informal consultation, 13-17 November 2000, 156 pages

Hamon J, Mouchet J, 1961. Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. Médecine Tropicale, **21,** 643-660 p.

Hassall KA. 1990. The biochemistry and uses of pesticides: structures, metabolism, mode of action and uses in crop protection. Second edition, MacMilan press Ltd, 261 pages.

Kumar R. 1991. La lutte contre les insectes ravageurs de l'agriculture en région tropicale. Editions CTA et Karthala, 311 pages.

Lariviere M, Beauvois B, Derouin F, Traore F. 1987. Parasitologie médicale, paludisme. Paris, Ellipses Editeurs, 154 pages.

Lindsay S, Gilson M, 1998. Bednets revisited – old idea, new angle. Parasitology today **4,** 270-272 p.

Malvy D, Djossou F, Thiebaut R, Le Bras M. 2000. Plasmodies-Malaria-Formes cliniques, diagnostic. Encyclopédie Médicale, Chirurgie, Maladies infectieuses **8-507-A-20**, 16-29 p.

Melkanovitskaya S, Koxlova LA. 1980. Characteristics of petroleum content determinations in ground waters. Gidrokhim. Mater **77,** 101 pages.

Mouchet J, Carnevale P. 1991. La lutte et protection contre les vecteurs du paludisme. Universités Francophones, Editions Marketing Ellipses, 210-227 p.

Nabarro D, Taylor E. 1998. The RBM campaign science **280,** 2066-2068, p.

Organisation Mondiale de Santé. 1995. La lutte antipaludique dans la région africaine de l'OMS. Bureau régional pour l'Afrique, Brazzaville, Congo. Série de rapports techniques n° **265,** 27 pages.

Organisation Mondiale de Santé. 2001. Lutte contre les vecteurs du paludisme et autres maladies transmises par les moustiques. Série de rapports techniques n° **875,** 242 pages.

Organisation Mondiale de Santé. 1988. Lutte contre les vecteurs et les insectes nuisibles en milieu urbain.11ème rapport du comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle. Série de rapports techniques, n°787, 46 pages.

Organisation Mondiale de Santé. 1994. Techniques entomologiques pratiques pour la lutte antipaludique. Guide du stagiaire. Partie 1, Genève, 88-96 p.

Organisation Mondiale de Santé. 1999. La lutte antivectorielle : méthode à usage individuel et communautaire. Catalogue à la source : bibliothèque de l'OMS, 34-57 p.

Organisation Mondiale de Santé /CDS/RBM. 2000. 17ème sommet africain sur l'initiative FRP. 72pages.

Programme National de Lutte contre le Paludisme. 2003. Collecte des données de bases sur la morbidité et la mortalité dues au paludisme dans le cadre du suivi évaluation RBM au Bénin. Rapport d'enquête, Bénin, 12 pages. (unpublished).

Raotap II. 2005. Manuel de terrain pour la surveillance de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques, 45 pages (unpublished).

Roll Back Malaria. 2005. Plan stratégique mondial Faire Reculer le Paludisme 2005-2015, 43 pages.

Tamariya P. 2000. In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum and clinical response to lumefantrine (benflumethol) and artemether. British journal of clinical pharmacology, **49(5),** 437-444

Van Vugt M. 1998. Randomized comparison of arteméther-benflumetol and artesunate mefloquine in treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. Antimicrobial agents of Chemotherapy **42(1),** 135-139

Von Seidlein L, Al. 1997. Treatment of African Children with uncomplicated falciparum malaria with a new antimalarial drug, CGP56697. Journal of infectious diseases **176(4),** 1113-1116.

White NJ. 1999. Averting and malariadisaster. Lancet **353,** 1965-1967.

White NJ. 1998. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. Drug resistance updates **1,** 3-9.

White NJ, van Vugt, M Ezzet F. 1999. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether luméfantrine. Clinical pharmacokinetics **37(2),** 105-125.

World Health Organization. 1973. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. Report of a WHO Scientific group. Geneva, (WHO technical Report series, N° 529).

World Health Organisation. 1967. Chemotherapy of malaria. Report of Scientific group. Geneva, (Who technical report series, N° 375).

Zakharova N. 1983. Méthodologie moderne de la lutte génétique contre les moustiques: lutte antivectorielle *et la* protection de l'environnement. Edition Mir, Tome **2,** 161-175 p.

International Journal of Microbiology and Mycology | IJMM
pISSN: 2309-4796
http://www.innspub.net
Accepted 09 august, 2014
Open Access RESEARCH PAPER

Evaluation of free malaria case management for children under 5 years and pregnant woman in Benin

Yves Eric DENON1*, Mariam OKE1 , Fadéby Modeste GOUISSI1, Dorothée KINDE GAZARD2, Bruno AHOLOUKPE1, Clarisse NOBIME1 , Simon ATAYI1

National Malaria Control Program, Ministry of Health (1); 01BP6974 Cotonou, Bénin
2Faculty of Health Sciences (FSS), University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 188 Cotonou, Bénin

Keywords: children under five year, pregnant woman, free malaria case management, public health center

Accepted: August 09, 2014

Abstract

In 2011, the government of the Republic of Benin decided the free malaria cases management for pregnant women and children under 5 years. Started in November 2011, this initiative helped to ensure a free malaria cases management of 48574 cases of uncomplicated malaria in 2012 for children less than 5 years and 6888 for pregnant women. Similarly 77% of health centers are actually implementing the initiative and 96% of health centers have been reimbursed at least once.

Abbreviations
WHO: world Health Organisation
UAC: University of Abomey Calavi
RDT: Rapid Diagnostic Test for malaria
ACT: Artemisinin based Combination Therapy
HC: Health Center
NMCP: National Malaria Control Program
Scientific names: Plasmodium falciparum

Scientific names: *Plasmodium falciparum* ;

* Corresponding Author: Yves Eric Denon ✉ denric2000@yahoo.fr

Introduction

In the world, 99 countries are affected by the transmission of malaria and nearly are exposed to the risk of infection (Danis & Gentillini, 1998; Gentillini, 1991; OMS, 2008). It is estimated that environs 276 million cases occurred in 2010 with surrounding 655 000 victims (Kweka *et al*., 2011; WHO, 2010; WHO, 2011; WHO, 2012). More than

90% of malaria deaths occur in Africa and 80% of victims are children less than 5 years (Coz, 1973; Zakharova, 1983; Bradley *et al*., 1986; Chippaux *et al*., 1989; Alonso *et al*., 1991; Lengeler *et al*., 1996).

In Benin in 2011, the incidence of uncomplicated malaria per 100 inhabitants was 13.2. This rate is estimated at 49.6 for children aged less than one year, to 28.1 for those aged 1 to 4 and 9.0 from 5 to 14 years (WHO, 2012). Then, the government of Benin decide to reduce the number of chidren who die all year and contribute to achieve the Millennium development goal 6. So, In november 2011 the program named "prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans" began. Main objective of this study is to verify after a year of application in all health area, if children and women are who have malaria beneficy the program of free malaria case management.

Materials and Methods

This study is a descriptive cross-sectional to assess the implementation of free malaria cases management in health public centers and assimilated. This study took place over a period of 12 months with the collection of data in December 2012 and November 2013. The data of 2012 and 2013 were compared to assess progress.

Monitoring of the implementation of the free malaria cases management is done in the 12 departments of the country and in all 34 public health zones of the country.

National hospitals, departmental hospitals, health area hospitals (districts), and Health centers are questioned. In each of the selected structures, key persons are: the Director of the hospital, administrative and financial officials, coordinator medical doctor, and the chief of health center. In each sanitary zone, household's residing in the locality that benefited from free malaria cases management are also targeted. Hospitals and health centers that are not part of the Ministry of health structures do not practice free malaria cases management. They are therefore not included in this study.

Based on study targets, the sample size were determined as follows: (Table 1) data collection was conducted with all the targets of the study by an integrated tool which includes i) a card counting at the level of health structures ii) an interview with key persons iii) a guide with households.

Table 1: Summary of the size of the sample on the basis of targets

Targets of study	**Sampling Method**	**sample**
Primary Targets		102
National hospitals	Exhaustivity	2
Departmental hospitals	Exhauxtivity	5
Sanitary zone hospitals	Exhaustiluity	27
Districts hospital	02 Per ZS	68
Secondary targets		156
The Director of the hospital	Exhaustiluity	27
Administrative and financial officials	Exhaustiluity	27
Coordinator Medical Doctor	Exhaustiluity	34
The chief of HC	02/ZS	170
Tertiary targets		
Beneficiary households	5 households/ZS	170

The data collection was made by a team of three people by department. The profited data collection agents can appreciate as well the quality of the implementation of the strategy at the level of the clinic/medicine- pediatric, motherhood, the financial and accounting service. The data collected were entered into epi data version 3.1 mask, and the data were analyzed in the soft were epi info version 3.5.1. Frequency tables were produced to populate the tracking key indicators. A triangulation of information has been made before consider it as valid. Anonymity is respected which in relation to the data collected at all levels; the photos were made with the free and informed consent of the persons concerned.

Results of the study

Total 252 health centers have been assessed, 95 in 2012 and 157 in 2013. The table below shows the structures visited per year and per Department. (**Table 2)**

Table 2: Health centers evaluated in 2012 and 2013 per year and per Department

Department	Areas hospitals	Visited structures 2012	Visited structures 2013
Mono/Couffo	4	8	20
Ouémé/Plateau	5	16	25
Zou/Collines	6	17	28
Borgou/Alibori	7	19	31
Attacora/Donga	5	14	25
Atlantique/Littoral	7	21	18
Total	**34**	**95**	**157**

Effectiveness of the implementation of free Assessment allow to make the point of heath units do not practice or having released the free malaria cases management for children under five years and pregnant women. Table II bellow shows that in 2012, 35 heath units on 95 assessed were not engaged or we released free malaria cases management. In 2013, this figure is 10 of 157 health units **(Table 3)**

Table 3: Health centers not engaged or released free malaria cases management for children under 5 years and pregnant at the time of visits**.**

Departments	**Heath areas (ZS)**	**Evaluated HC 2012**	**Evaluated HC 2013**	**HC failing in 2012**	**HC failing in 2013**
Mono/ Couffo	4	8	20	2(25 %)	4(20 %)
Ouémé / Plateau	5	16	25	8(50 %)	3(12 %)
Zou/Collines	6	17	28	5(24 %)	1(3.6 %)
Borgou / Alibori	7	19	31	8(42 %)	0(0%)
Atacora/ Donga	5	14	25	10(71%)	1(4%)
Atlantique/ Littoral	7	21	18	2(10 %)	1(5.5 %)
Total	**34**	**95**	**157**	**35(37 %)**	**10(6.4%)**

Malaria cases management guidelines are complied with in department hospitals and area hospitals vised with the exception of two or 6%. However most health centers do not respect these guidelines even though the documents are sent to all departments. (Table 4).

Table 4: Availability of inputs for free case management

Department	Health areas	HC Estimated in 2012	HC Estimated in 2013	HC in breaking ACT and RDT 2012
Mono/Couffo	4	8	20	(1.25%)
Ouémé/Plateau	5	16	25	(25%)
Zou/Collines	6	17	28	9(47%)
Borgou/Alibori	7	19	31	0(0%)
Atacora/Donga	5	14	25	5(9.5%)
Atlantique/Littoral	7	21	18	0(0%)
Total	**34**	**95**	**157**	**19(20%)**

It appears from table IV that in 2012, 20% of heath units vised have experienced complete break in RDT or ACT the day of the visit. 2013 data are presented in the tables below. (Table 5)

Table 5: Availability ACT and RDT.

Availability	RDT	ACT
Yes	122(84.7%)	134(88.2%)
No	22(15.3%)	18(11.8%)
Total	**144(100.0%)**	**152(100%)**

- ✓ 15% of centers practicing free malaria cases management experienced failure in RDT.
- ✓ 11.8% of health centers praticising the free malaria cases management have broken down in ACT.
- ✓ Besides 3.5% of health centers have broken down in glucosed serum 10%
- ✓ 20.8% of health centers laboratories experienced failure in giemsa.
- ✓ 4% of health formations don't have paracetamol
- ✓ 20.7% and of health formations have respective at their disposal quinine tablets and injectable quinine.
- ✓ 5.83% of health centers having a available post of blood transfusion don't dispose blood in the moment of estimation

The checking of affectivity for free malaria cases management has been appreciated through visit on place or telephone calls of beneficiaries. The results prove that always.1) Addresses are not complete to facilitate to find beneficiaries almost all the sanitary zone (42 on 55 beneficiaries wanted) the phone number sometimes mentioned has been very important to find beneficiaries; 2) 94.7% of beneficiaries found (36/38) have confirmed have paid for their care, whereas they are invoiced for the free malaria cases management. (Fig 1), (Table 6)

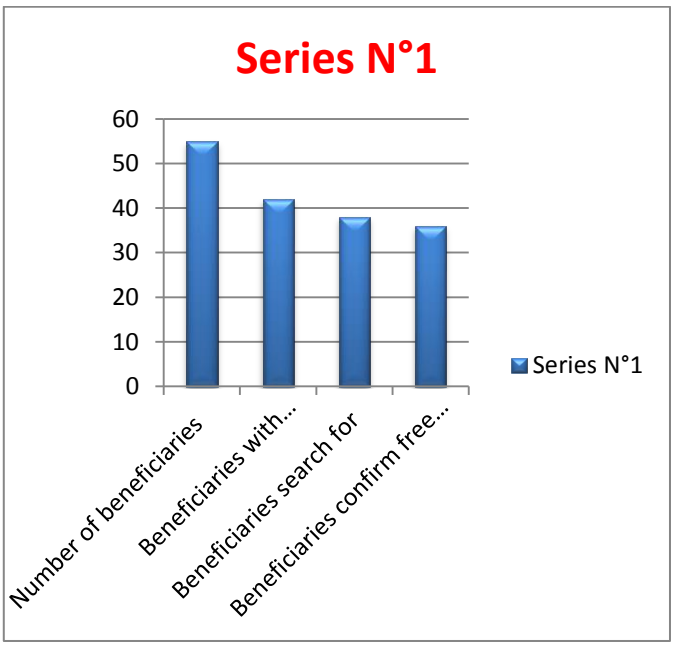


Fig 1: Distribution of presumed beneficiaries

The determination of cases supported in 2012 and 2013 showed that the number of cases of uncomplicated malaria has decreased almost by half among children less than five years.

Table 6: free case management of simple and complicated malaria in 2012 and 2013

Category	Cases	2012	2013
Children under five year	Uncomplicated malaria	48 574	22345
	Complicated malaria	9 297	16 438
Pregnant women	Uncomplicated malaria	6 888	10 374
	Complicated malaria	2 507	1995
TOTAL		**67 266**	**51 152**

Reimbursement of free taking care fees to health formations in 2013 (Table 7)

Table 7: Percentage of health center having been reimbursed at least once according to the department

	Health center Reimbursed		
Department	Yes	No	Total
Borgou	11(10.0%)	3(9.1%	14(9.8%
Alibori	14(12.7%)	3(9.1%)	17(11.9%
Atacora	9(8.2%)	0(0.0%)	9(6.3%)
Donga	14(12.7%)	0(0.0%)	14(9.8%)
Zou	19(17.3%)	0(0.0%)	19(13.3%)
Collines	5(4.5%)	1(3.0%)	6(4.2%)
Mono	2(1.8%)	10(30.3%)	12(8.4%)
Couffo	5(4.5%)	8(24, 2%)	13(9.1%)
Atlantique	6(5.5%)	4(12.1%)	10(7.0%)
Littoral	5(4.5%)	1(3.0%)	6(4.2%)
Ouémé	11(10.0%)	3(9.1%)	14(9.8%)
Plateau	9(8.2%)	0(0.0%)	9(6.3%)
Total	110(100.0%)	33(100.0%)	143(100.0%)

Operated Reimbursement (Table 8), (Table9). 83.6% of health center members think that the free malaria cases management has really increased health centers and hospitals. (Table 10)

Table 8: Reimbursed amounts in 2013

Currency	Total reimbursed	Amount paid Dec. 31st, 2013	Amount paying	Engaged amount and prescripted
F CFA	612837470	322581095	61553445	228702930
USD	1225675	645162	123106	457406

Table 9: Percentage of health center confronted to some difficulties for the confirmation of cases

Health center in problem	Frequency	Percentage
Yes	23	16.4%
No	117	83.6%
Total	140	100.0%

Table 10: Percentage of the members on the frequenting

Perception of HC and hospitals on frequenting	Frequency	Percentage
The adding rate	102	83.6%
The reducing rate	4	3.3%
The rate is not changed	16	13.1%
Total	122	100.0%

Discussions

The current study has as purpose to estimate the accomplishment of the free malaria cases management of simple and complicated malaria among the children under five year and the pregnant Women. The discussion of the resultants will be based on:1)The

accomplishment of the purposes; 2)the validity the results. In order to accomplish the purposes given by this study we have taken as variable dependent: the reduction of the complicated malaria. Some variables have been discussed: 1) Quality of malaria cases management 2) Performance of the cared personnel 3) Capacity of the technic tray of the health formations 4) Organization of the health centers and 5) Delay to care.

The presence of the planner has certainly an effect on the behavior and may be the answers of the health agents at the time of questionnaire administration the responses quality may not be the real because the presence of the national Malaria control program agents has provoke sincerity or year that can bring about the angles. The quality of collected data at the time of register analysis and others tool came missing information in the files. The rates of missing answers to some questions at the time of analysis vary from 5% to 11%. The missing answer is a factor of wrong information because some answers if they have been given would influence the data interpretation. However, the fact of having investigated systematically the entire district and some health centers should reduce in principle this angle.

The searching of 402 documents of children has been realized instead of 325 foreseen. The observation of malaria cases management of the whole 19 children present during the days of the searchers and with the complicated malaria has been done and all their parents have been interviewed. Some decisions have been realized with all the health members present in health formations by taking into account the sick children. The observation and the planning have been realized in the all health formation. We can conclude that the foreseen purposes by studying have been realized.

In total, 102 health centers were provided by annual evaluation. In total, 252 health centers were assessed either 95 in 2012 and 157 in 2013. Health centers do not practice or having released the free support for cases of malaria in children under five years and pregnant women is 35 health units on 95 assessed in 2012 and 10 on 157 health units. There is a net decrease in the number of health centers in phase with the initiative which has increased from 35% in 2012 to 6% in 2013. In 2012, 20% of health centers have experienced failures of any kind. On the other hand, in 2013, this figure ranged from 4 to 11%. We can deduce that the high rate of failures in input has influenced the proportion of health center which don't implemented free cases management. On the other hand, one could estimate that by 2012, it was barely a year since the initiative was launched. A total of 170 intended beneficiaries, the evaluation team was able to find only 55 and contact that 38 in the community. This situation is due to the fact that the addresses are not always complete to facilitate the search for recipients. Sometimes mentioned telephone number has been of great assistance to search for recipients. 94.7% of recipients found (36/38) claimed have been supported for free case management (36). 5.3% (2/38) beneficiaries reported having paid for their care while they are charged for the free account. 83.6% of health workers believe that free support induced an increase in attendance at health centers. This is due to the fact that populations have had information on the initiative and wanted to benefit from.

It is noted a decrease in the number of cases received between 2012 and 2013. This situation is due not only to implementing 2013 a tour fair management of cases of malaria in children under five in the villages lacustrine and related of Benin during the long season of rain but also to focus on the implementation of the new policies of support for malaria.

Conclusion

At the end of this evaluation of the free support of malaria in 34 health zones, it can be concluded that the support free cases of malaria in children under 5 years and pregnant women is effective.

This initiative helped to ensure a free pick 48574 cases of uncomplicated malaria in 2012 in children under the age of 5 years and 6888 in pregnant women.

References

Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong JRM, Conteh M, Hill AG, David PH, Fegan G, de Francisco A, Salle AJ, Shenton FC, Cham K, Greenwood BM. 1991. The effect *of* insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. Lancet **3**, 1499-1502.

Bashar K, Tuno N, Ahmed TU, Howlader AJ. 2012. Blood-feeding patterns of Anopheles mosquitoes in a malaria-endemic area of Bangladesh. Parasites & Vectors.; **5**:39.

Bradley AK, Greenwood EM, Greenwood AM, Marsh K, Byass P, Tulloch S, Hayes R. 1986. Bed-nets (mosquito-nets) and morbidity from malaria. Lancet **4**, 204-207.

Bray PG, Mungthin M, Hastings IM, Biagini GA, Saidu DK, Lakshmanan V, Johnson DJ, Hughes RH, Stocks PA, O'Neill PM, Fidock DA, Warhurst DC. 2006. Ward Sal Johnson PFCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. American Society for Microbiology **14**, 238-251.

Cervinskas J, Berti P, Desrochers R. 2008. Evaluation de la possession et de l'utilisation des MIILD au Mali huit mois après la campagne intégrée de décembre 2007 : Rapport final. (unpublished).

Chippaux JP, Massougbodji A, Olliaro P, Gay F, Caligaris S, Danis M. 1989. Sensitivity in vitro of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and mefloquine in Two regions of Benin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene **83**, 584-585.

Chippaux J. P, Akogbeto M, Massougbodji A, Adjagba J. 1989. Mesure de la parasitémie palustre et évaluation du seuil pathogène en région de forte transmission. Cahier ORSTOM, Série Entomologie médicale et Parasitologie.; 27: 12 pages.

Danis M, Gentillini M. 1998. Le paludisme fléau mondial. Revue Pratique **48**, 254-257.

Denon YE, Sissinto Y, Tokponnon F, OKE M, Kinde-Gazard D, KOSSOU H, Gbenou D, Massougbodji A, Loko F. 2014. Comparative study of the effectiveness of combination therapies based on artemisinine in Dassa Zounme and Parakou: case of Artemether lumefantrine and Artesunate amodiaquine. International Journal of Microbiology and Mycology, **2(2)**: 1-9.

Gentillini M. 1991. Généralités sur le paludisme. Paris, Editions Marketing Ellipses **240**, 177-240.

Gouissi, Salifou, Edorh, Guedenon P, Boni G, Djenontin A, Montcho SA, Akogbeto M, Boko M. 2012. Comparative study of effectiveness of three arms of combination therapy artemisinin based on children under 5 years in the commune of Aguegues in Benin. Continental J. Pharmaceutical Sciences. **6** (1): 1-9

Greenwood B, Mutabingwa T. 2002. Malaria in 2002. Nature **3**, 670-672.

Institut National de la Statistique Appliquée à l'Economie. 2013. Enquête démographique et de santé 2011-2012; 551 pages.

Julie T, Robert P, Salif N. 2011. Evaluation de la campagne intégrée de distribution de MIILD, de vitamine A et de Mébendazole au Sénégal : Rapport final, EPCS ; 93 (unpublished)

Kweka EJ, Himeidan YE, Mahande AM, Mwang'onde BJ, Msangi S, Mahande MJ, Mazigo HD, Nyindo M. 2011. Durability

associated efficacy of long-lasting insecticidal nets after five years of household use. Parasites & Vectors **4**, 156.

Lengeler C, Cattani J, DE Savigny D. 1996. Net gain. A new method for preventing malaria deaths. IDRC Ottawa/ OMS Genève, **189**.

Ministère de la Santé. 2012. Annuaire des statistiques sanitaires du Benin.147 pages

Otten M, Aregawi M, Were W, Karema C, Medin A, Bekele W. 2009. Initial evidence of reduction of malaria cases and deaths in Rwanda and Ethiopia due to the rapid scale-up of malaria prevention and treatment. Malaria Journal; **8**(14).

Organisation Mondiale de la Santé. 2008. Le rapport mondial sur le paludisme: Brienfing de 5 mn sur le rapport mondial 2005 de l'OMS et de l'UNICEF sur le paludisme. Genève, **5.**

Programme National de Lutte contre le Paludisme. 2011. Directives nationales de prise en charge des cas de paludisme au Bénin. 38 pages

Programme National de Lutte contre le Paludisme. 2013. Politique de lutte contre le paludisme, Bénin. 21 pages (unpublished)

Programme National de Lutte contre le Paludisme. 2011**.** Plan stratégique national de lutte contre le paludisme 2011 2015, Bénin. 102 pages

Programme National de Lutte contre le Paludisme. 2011. Stratégie de mise en œuvre de la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5ans au Bénin. 45 pages (unpublished)

Rogerson SJ, Hvid L, Duffy PE, Leke RFG, Taylor DW. 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity**.** Lancet Infectious Disease **7,** 105-117.

Roll Back Malaria. 2005. Plan stratégique mondial Faire Reculer le Paludisme 2005-2015. Geneva, World Health Organisation, 43.

Tan SO, Mcgready R, Zwang J, Pimanpanarak M, Sriprawat k, Thwai K, Moo Y, Ashley EA, Edwards B, Singhasivanon P, White NJ, Nosten F. 2008. Thrombocytopaenia in pregnant women with malaria on the Thai-Burmese border. Malaria Journal **7**, 209-218.

Tokponnon F, Aholoukpe B, Denon EY, Gnanguenon V, Bokossa A, N'guessan R, Oke M, Kinde Gazard D, Akogbeto MC. 2013. Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin. Parasites and Vectors. **6**:265

World Health Organization. 2001. Report of the Fifth WHOPES working Group meeting, WHO Geneva. 30-31 october 2001 WHO/CDS/WHOPES/2001 4 *Geneva,* Switzerland: World Health Organization.

World Health Organization. 2010. World malaria report, 2010.

World Health Organization. 2011. World malaria report, 2011.

World Health Organization. 2012.World malaria report, 2012.

Zakharova N. 1983. Méthodologie moderne de la lutte génétique contre les moustiques: lutte antivectorielle et la protection de l'environnement. Edition Mir, Tome 2, 161-175.

Bull. Soc. Pathol. Exot. (2013) 106:27-31
DOI 10.1007/s13149-012-0264-7

SANTÉ PUBLIQUE / *PUBLIC HEALTH*

Évaluation d'un test de diagnostic rapide et d'un microscope à fluorescence portable pour le diagnostic du paludisme à Cotonou (Bénin)

Assessment of a rapid diagnostic test and portable fluorescent microscopy for malaria diagnosis in Cotonou (Bénin)

A. Ogouyèmi-Hounto · D. Kinde-Gazard · C. Keke · E. Gonçalves · N. Alapini · F. Adjovi · L. Adisso · C. Bossou · Y.V. Denon · A. Massougbodji

Reçu le 19 juin 2012 ; accepté le 28 août 2012
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2012

Résumé Le but du travail était d'étudier les performances d'un test de diagnostic rapide (TDR) du paludisme (SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan®) et du microscope à fluorescence (CyScope®) par rapport à la goutte épaisse (GE) pour confirmer le diagnostic clinique de paludisme à Cotonou. L'enquête a été réalisée dans deux hôpitaux, de juin à octobre 2010, chez des personnes âgées de six mois à 70 ans. Tous les cas de fièvres suspectés de paludisme envoyés au laboratoire pour confirmation biologique ont fait l'objet d'une GE, d'un TDR et d'une lame pour le microscope à fluorescence portable. Tous les tests ont été réalisés et lus dans les laboratoires des hôpitaux impliqués, avec un contrôle de qualité des lames de GE au laboratoire de parasitologie du Centre hospitalier universitaire de Cotonou. Au total, 354 personnes avec fièvre indéterminée ont été incluses. La proportion des cas de paludisme parmi les cas cliniques est de : 22,8 % par la GE, 25,4 % par le TDR et 25,1 % avec le microscope à fluorescence portable. La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives par rapport à la GE étaient, pour le TDR, 96,3, 95,6, 86,7, 98,9 % ; pour le microscope à fluorescence portable, 97,5, 96,7, 89,8, 99,27 %. Avec ces performances, ces deux méthodes présentent des avantages certains pour l'aide au diagnostic de paludisme dans les structures périphériques de santé qui ne disposent pas des ressources nécessaires pour effectuer la confirmation du diagnostic par la GE.

A. Ogouyèmi-Hounto (✉) · D. Kinde-Gazard · C. Keke · E. Gonçalves · N. Alapini · F. Adjovi · L. Adisso · C. Bossou · Y.V. Denon · A. Massougbodji
06 BP 1372 Cotonou, Bénin
e-mail : aurorefel@yahoo.fr

Mots clés Performance · Test de diagnostic rapide · Microscope à fluorescence · Goutte épaisse · Paludisme · Cotonou · Bénin · Afrique intertropicale

Abstract The aim of the study was to determine the accuracy of a rapid diagnostic test (SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan®) and fluorescent microscopy (CyScope®) in confirming presumptive malaria diagnosis in Cotonou. Thick blood smear was used as the reference technique for comparison. Testing was conducted on persons between the ages of 6 months and 70 years at two hospitals from June to October 2010. If malaria was suspected in the sample by the nurse based on clinical findings and sent to laboratory for confirmation, one thick smear, one rapid diagnostic test and one slide for the fluorescent microscopy were performed. All tests were read in hospital laboratories involved with the quality control of thick blood smear in the parasitology laboratory of National University Hospital of Cotonou. A total of 354 patients with clinical diagnosis of malaria were included. Malaria prevalence determined by thick smear, rapid diagnostic test and fluorescent microscopy was 22.8%, 25.4%, and 25.1% respectively. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values compared to the thick smears were 96.3, 95.6, 86.7, and 98.9% for rapid diagnostic test; and 97.5, 96.7, 89.8, and 99.27% for fluorescent microscopy. With these performances, these tests meet acceptability standards recommended by WHO for rapid tests (sensitivity > 95%). These two methods have advantages for the confirmation of malaria diagnosis in peripheral health structures that lack the resources to conduct diagnosis confirmation by the thick blood smear.

Keywords Performance · Rapid diagnostic test · Fluorescent microscopy · Thick blood smear · Malaria · Cotonou · Bénin · Sub-Saharan Africa

Introduction

Le diagnostic et le traitement du paludisme sont longtemps restés basés sur les éléments cliniques de présomption sans confirmation biologique, ce qui a conduit à une émergence de la résistance aux antipaludiques usuels tels que la chloroquine et la sulfadoxine–pyriméthamine (SP). Ainsi, à l'instar de plusieurs pays, le Bénin a changé en 2004 sa politique de prise en charge du paludisme, orientée désormais vers l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) selon les recommandations de l'OMS [26]. De ce fait, le déploiement des CTA a conduit à une révision des stratégies de prise en charge, comportant notamment une meilleure démarche diagnostique incluant la confirmation biologique, permettant une utilisation rationnelle des médicaments [20,27]. Malheureusement, l'examen microscopique qui est la technique de référence du diagnostic biologique n'est pas disponible dans toutes les structures sanitaires du Bénin. Ainsi, l'utilisation des tests de diagnostic rapide (TDR) recommandés par l'OMS comme alternative crédible [15,24,25,28] a été effective au Bénin à partir de 2008. Le SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan® a été donc placé dans les zones périphériques ne disposant pas d'énergie électrique ou de microscopiste, mais aussi dans les services tels que la gynécologie et la pédiatrie afin de réduire les attentes des prescripteurs. Des retours de l'utilisation sur le terrain, il apparaît que ce TDR donnait des résultats discordants par rapport à la goutte épaisse (GE). Par ailleurs, une nouvelle méthode de diagnostic du paludisme utilisant un microscope à fluorescence portable (CyScope®) [22] à coût réduit, pratique pour les sites périphériques et utilisant du sang frais a été développée récemment et en expérimentation sur certains sites. La présente étude a donc été entreprise avec pour objectif de comparer les performances du TDR SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan® et du microscope à fluorescence portable avec la GE, méthode de référence pour confirmer le diagnostic clinique du paludisme à Cotonou.

Patients et méthodes

Zone et population d'étude

L'étude a été réalisée à Cotonou, caractérisée par des zones marécageuses expliquant l'hyperendémicité du paludisme. L'enquête s'est déroulée de mai à octobre 2010, couvrant les deux saisons de pluie correspondant aux périodes de forte transmission du paludisme. Les laboratoires du Centre national hospitalier Hubert-Koutoukou-Maga (CNHU-HKM) de Cotonou et de l'hôpital Saint-Luc étaient impliqués. La population d'étude était composée de patients (adultes et enfants) reçus en consultation pour suspicion de paludisme et adressés au laboratoire avec une prescription de GE/frottis sanguin (GE/FS) pour la confirmation biologique. Les patients ou parents d'enfants ayant donné leur consentement étaient inclus dans l'étude.

Étaient exclus :

- les patients ayant reçu un traitement contre le paludisme dans les 14 jours précédant l'étude ;
- les femmes enceintes sous traitement préventif intermittent (TPI).

Méthode de travail

Nous avons procédé à un échantillonnage par convenance en recrutant systématiquement tous les patients qui remplissaient les critères d'inclusion pendant la durée de collecte. Au laboratoire, après l'obtention du consentement éclairé par le technicien préleveur, la fiche de collecte a été remplie, suivie d'un prélèvement de 5 ml de sang dans un tube EDTA. Pour chaque patient, il a été réalisé une GE/FS, le TDR et une lame pour le microscope à fluorescence portable. Ces trois examens ont été réalisés en aveugle par trois techniciens différents. Tous les examens ont été lus en double avec un contrôle de qualité des lames de GE de l'hôpital Saint-Luc au laboratoire de parasitologie du CNHU-HKM. Les cassettes du TDR ainsi que les lames pour microscope à fluorescence portable étaient validées par le médecin parasitologue responsable de l'étude.

Le protocole de recherche a reçu un avis favorable du comité d'éthique de la faculté des sciences de la santé de Cotonou.

Réalisation des examens biologiques

GE et FS

L'examen du frottis et de la GE a été fait à l'immersion avec un objectif 100 par l'observation de 50 à 100 champs microscopiques. La densité parasitaire a été estimée sur la GE en comptant le nombre de trophozoïtes pour 200 leucocytes pour les lames positives (nombre de trophozoïtes $\geq$ *10*) et 500 leucocytes lorsque le nombre de trophozoïtes comptés est inférieur à dix. L'examen du frottis mince a permis l'identification de l'espèce plasmodiale en cause, à partir de critères morphologiques précis. Les résultats des GE ont été qualifiés de positifs, de négatifs ou d'incertains (mauvaise lame, illisible). Dans ce dernier cas, la lame a été écartée. Le seuil de détection de la GE est de 10 à 20 parasites (p)/µl [5].

TDR

Le test utilisé était le SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan® (Standard Diagnostics, Inc), test mixte permettant la détection de

l'HRP2 spécifique de *Plasmodium falciparum* et la pLDH des autres espèces. Les tests ont été réalisés et interprétés selon les instructions du fabricant, par les techniciens de laboratoire, recyclés préalablement à l'étude. Les résultats ont été qualifiés de positifs (positif *P. falciparum*), de négatifs ou d'invalides. Dans ce dernier cas, le test était repris et, lorsque les résultats étaient identiques, le prélèvement était écarté.

Microscope à fluorescence

Il s'agit d'un microscope mobile fonctionnant sur batterie. Les lames sont préalablement préparées avec des réactifs spécifiques de souches de Plasmodium sous forme déshydratée. La manipulation a consisté uniquement à ajouter 10 µl de sang avec étalement par inclinaison légère de la lame dans une direction. Après une minute, la préparation recouverte par une lamelle est placée sur le support entre l'objectif et la lumière UV. La lecture est qualitative et est faite au grossissement × 40. Le seuil de positivité décrit par le fabricant est de 30 à 40 parasites par microlitre de sang. Le test positif (présence de parasites) est indiqué par de petits points bleu clair très réfringents sur fond noir. L'absence de ces derniers est en faveur d'un résultat négatif (absence probable de parasites).

Analyse des données

Les informations inscrites sur les fiches de collecte de données ont été saisies dans le logiciel Excel. Un masque de saisie a été élaboré, et les données ont été saisies et analysées grâce au logiciel ÉpiInfo™ version 3.5.1. Les résultats des différents tests ont été mis dans un tableau 2 × 2 pour le calcul des indicateurs de performance tels que la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives (positives et négatives). Le test de χ^2 a été utilisé pour la comparaison des proportions. Le seuil de significativité pour comparer deux proportions a été fixé à une valeur p inférieure à 0,05.

Résultats

Au total, 354 patients (dont 149 de sexe masculin et 205 de sexe féminin) âgés de six mois à 70 ans ont été inclus dans l'étude. Le sex-ratio femme/homme était de 1,38. La tranche d'âge des enfants âgés de six mois à cinq ans était la plus représentée (153/354), soit 43,2 %, p inférieur à 0,05. La densité parasitaire variait de 51 à 1 210 000 p/µl de sang, avec une moyenne de 65,820 p/µl de sang. *Plasmodium falciparum* était la seule espèce plasmodiale retrouvée.

La proportion de cas de paludisme parmi les cas cliniques par les trois méthodes de diagnostic était de 22,8 % avec la GE (81/354), de 25,4 % avec le TDR (90/354) et de 25,1 % avec le microscope à fluorescence portable (89/354), p supérieur à 0,05. Cette proportion était plus élevée dans la tranche d'âge des enfants de six mois à cinq ans avec 74,1 % à la GE, 67,8 % au TDR et 66,3 % au microscope à fluorescence portable.

Performance diagnostique du TDR et du microscope à fluorescence portable par rapport à la GE

Quatre-vingt-dix échantillons étaient positifs au TDR, dont 78 confirmés par la GE. Trois échantillons dont les densités parasitaires étaient respectivement de 51, 130 et 186 étaient négatifs (faux-négatifs) ; 12 résultats faux-positifs étaient retrouvés avec le TDR.

Quatre-vingt-neuf échantillons étaient positifs au microscope à fluorescence portable, dont 80 confirmés par la GE, avec une corrélation entre les fluorescences des échantillons positifs et les densités parasitaires. Un échantillon (DP = 51 p/µl) n'a pas été détecté par le microscope à fluorescence portable (faux-négatif), neuf échantillons positifs au microscope à fluorescence portable étaient négatifs à la GE (faux-positifs) avec très peu de points fluorescents comparativement aux échantillons positifs en GE (Tableau 1), deux échantillons de densité parasitaire 130 et 186 non détectés par le TDR étaient détectés par le microscope à fluorescence portable.

Performance du TDR et du microscope à fluorescence portable

TDR : sensibilité : 96,3 %, spécificité : 95,6 %, VPP : 86,7 %, VPN : 98,9 %.

MFP : sensibilité : 98,8 %, spécificité : 96,7 %, VPP : 89,9 %, VPN : 99,6 %.

Sensibilité des différentes techniques par rapport à une parasitémie de la GE : ≥ 500 p/µl, 100 % pour les deux techniques. Cette sensibilité est par contre légèrement abaissée pour les parasitémies inférieures à 500 p/µl à la GE (Tableau 2).

Tableau 1 Résultats croisés du TDR et du microscope à fluorescence portable (MFP) par rapport à la goutte épaisse/*Cross results of TDR and fluorescent microscopy compared to the thick smear*

Test	Microscopie +	Microscopie –	Total
TDR +	78	12	90
TDR –	3	261	264
Total	81	273	354
MFP +	80	9	89
MFP –	1	264	265
Total	81	273	354

Tableau 2 Sensibilité des méthodes de diagnostic en fonction de la parasitémie à la goutte épaisse/*Sensitivity of diagnostic methods according to the parasitemia in thick smears*

Parasitémie GE	Positif GE	Positif TDR (sensibilité)	Positif MFP (sensibilité)
< 500/µl	22	19 (86,4 %)	21 (95,4 %)
500–5000/µl	25	25 (100 %)	25 (100 %)
> 5000/µl	34	34 (100 %)	34 (100 %)
Total	81	78 (96,3 %)	80 (92,6 %)

Discussion

La surreprésentation de la tranche d'âge de moins de cinq ans dans notre étude s'explique par le fait qu'il s'agit d'une tranche vulnérable pour le paludisme, caractérisée par la mise en place graduelle de la prémunition [17], ce qui explique la proportion de cas de paludisme confirmé élevée dans cette tranche d'âge dans notre étude.

Cette proportion relativement faible dans cette étude est sensiblement égale par les différentes techniques. En considérant les résultats de la GE, méthode de référence, cette proportion est similaire à celles obtenues par plusieurs autres auteurs [2,10,29]. Les cas confirmés relativement faibles dans notre étude (moins du tiers de la population d'étude) soulignent encore une fois le fait que, même en zone d'endémie palustre, la présomption clinique ne doit systématiquement pas être assimilée au paludisme. L'enjeu d'une telle démarche est double : ne mettre sous traitement que des cas réellement confirmés (économie de CTA et protection contre les résistances) et prendre en charge correctement et rapidement tous les cas infirmés en réorientant le diagnostic vers d'autres affections possibles. [6,15,18,25]. Dans notre étude, le diagnostic biologique éviterait ainsi de mettre environ 78 % des patients sous traitement abusif de CTA.

Les résultats obtenus avec le TDR SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan® répondent aux bornes d'acceptabilité recommandées par l'OMS pour un TDR (sensibilité > 95 %), s'accordent à la littérature qui indique que les TDR (HRP2) ont des meilleures sensibilités et donnent donc moins de faux-négatifs. Les faux-négatifs pourraient être dus soit à de faibles parasitémies, soit à une variété génétique de la HRP2 [3,13] ou à la production d'anticorps anti-HRP2 [4,14]. Les TDR (HRP2) peuvent aussi donner des résultats faussement positifs en raison de la persistance d'HRP2 circulants après un traitement antipaludique. Humar et al. [11] avaient détecté les antigènes circulants chez 68 % des patients, sept jours après le début du traitement et, dans 27 % des cas, 28 jours après. Enfin, certains faux-positifs pourraient être dus à la présence du facteur rhumatoïde [8,12], ou en relation avec un syndrome inflammatoire, une phlébite ou une hépatite virale [5].

La sensibilité obtenue dans notre étude se rapproche de celles d'autres études [7,19], mais est légèrement supérieure à celle d'Aubouy et al. [2] qui avaient retrouvé 90 % en prenant comme technique de référence la PCR. Avec la valeur prédictive positive relativement faible du SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan® le clinicien ne prescrira à tort un antipaludique que dans 13 % des cas. Par contre, la VPN presque à 99 % indique que seulement 1 % des patients ayant le paludisme risque de ne pas être traité. Cependant, la discussion sur les valeurs prédictives (VPP et VPN) doit être précautionneuse, car ces valeurs dépendent toujours de la prévalence de la maladie dans la localité d'étude [21], et dans notre cas, de la période de transmission (faible ou haute). Ainsi, en saison des pluies, la VPP sera meilleure, tandis qu'en saison sèche, elle sera plus faible. Selon McMorrow et al. [16], pour un test ayant une sensibilité et une spécificité données, il y aura autant de valeurs prédictives (VPP et VPN) que les différentes prévalences dans la population d'étude. Les résultats obtenus avec le microscope à fluorescence portable répondant aux recommandations de l'OMS sont proches de ceux du Soudan [10] et supérieurs à ceux de l'Ouganda [23]. Dans notre étude, les performances du microscope à fluorescence portable étaient légèrement supérieures, mais sans différence statistiquement significative avec celles du SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan®. Cela est sans doute en relation avec le seuil de détection du microscope à fluorescence portable (30 à 40 p/µl) plus faible que celui du TDR HRP2 (100 à 200 p/µl). Wongsrichanalai et al. [28] avaient trouvé une sensibilité du microscope à fluorescence portable à 78,9 % dans une population avec des densités parasitaires inférieures à 100 p/µl. Cependant, l'utilisation du microscope à fluorescence portable peut être responsable de faux-positifs, l'acridine orange colorant les acides nucléiques, notamment ceux des autres parasites sanguicoles [1]. En plus, les particules de poussières ou une bactériémie transitoire dans la zone de piqûre peuvent être confondues avec une infection palustre. En effet, vu les avantages liés à cette technique (réduction du temps de formation nécessaire pour le diagnostic du paludisme [9], réduction du temps de préparation des lames, simplicité de lecture, autonomie fonctionnelle de plus de 24 heures facilitant l'utilisation en zone rurale), une optimisation de son utilisation pourrait être salutaire en complément des autres méthodes dans les pays endémiques d'Afrique. Elle possède cependant des limites, à savoir l'impossibilité de calculer la densité parasitaire et de faire le diagnostic de l'espèce.

Conclusion

Cette étude montre l'intérêt du TDR SD Bioline Malaria Ag *P.f*/Pan® et du microscope à fluorescence portable CyScope® pour confirmer les présomptions de paludisme basées

essentiellement sur la fièvre, en précisant les limites de leur utilisation. Ces tests contribueront à une meilleure utilisation des CTA et à leur préservation.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Ambroise-Thomas P, Michel-Brun J, Despeignes J (1965) Identification rapide des parasites sanguicoles par coloration à l'acridine orange et microscope à fluorescence. Bull Soc Pathol Exot Filiales 58(4):639–43
2. Aubouy A, Dechavanne S, Dasseya R, Massougbodji A (2010) Valeur des tests rapides pour le diagnostic du paludisme au Bénin. Méd Trop 70(5–6):485–9
3. Baker J, McCarthy J, Gatton M, et al (2005) Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. J Infect Dis 192(5):870–7. Epub 2005 Jul 21
4. Biswas S, Tomar D, Rao DN (2005) Investigation of the kinetics of histidine-rich protein 2 and of the antibody responses to this antigen, in a group of malaria patients from India. Ann Trop Med Parasitol 99(6):553–62
5. Brenier-Pinchart MP, Pinel C, Grillot R, Ambroise-Thomas P (2000) Le diagnostic du paludisme dans les régions non endémiques : valeur, limites et complémentarité des méthodes actuelles. Ann Biol Clin (Paris) 58(3):310–6
6. Drakeley C, Reyburn H (2009) Out with the old, in with the new: the utility of rapid diagnostic test for malaria diagnosis in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 103(4):333–7. Epub 2008 Nov 18
7. Gaye O, Diouf M, Diallo S (1999) A comparison of thick smears, QBC malaria, PCR and PATH *falciparum* malaria test trip in *Plasmodium falciparum* diagnosis. Parasite 6(3):273–5
8. Grobusch MP, Alpermann U, Schwenke S, et al (1999) False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. Lancet 353(9149):297
9. Guy R, Liu P, Pennefather P, Crandall I (2007) The use of fluorescence enhancement to improve the microscopic diagnosis of *falciparum* malaria. Malar j 6:89
10. Hassan Sel-D, Okoued SI, Mudathir MA, Malik EM (2010) Testing the sensitivity and specificity of the fluorescence microscope (Cyscope®) for malaria diagnosis. Malar J 9:88
11. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, et al (1997) Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. Am J Med Trop Hyg 56(1):44–8
12. Iqbal J, Sher A, Rab A (2000) *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factors. J Clin Microbiol 38 (3):1184–6
13. Kilian AH, Mughusu EB, Kabagambe G, von Sonnenburg F (1997) Comparison of two rapid, HRP2-based diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg 91 (6):666–7
14. Lee N, Baker J, Andrews KT, et al (2006) Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: implications for rapid diagnostic tests for malaria. J Clin Microbiol 44(8):2773–8
15. Lubell Y, Reyburn H, Mbakilwa H, et al (2007) The cost-effectiveness of parasitologic diagnosis for malaria-suspected patients in an era of combination therapy. Am J Trop Med Hyg 77(S6):128–32
16. McMorrow ML, Masanja MI, Abdulla SM, et al (2008) Challenges in routine implementation and quality control of rapid diagnostic tests for malaria - Rufiji District, Tanzania. Am J Trop Med Hyg 79(3):385–90
17. McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, et al (2003) Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. Am J Trop Med Hyg 69(4):372–6
18. Msellem MI, Mårtensson A, Rotllant G, et al (2009) Influence of rapid malaria diagnostic tests on treatment and health outcome in fever patients, Zanzibar: a crossover validation study. PLoS Med 6(4):e1000070. Epub 2009 Apr 28
19. Munier A, Diallo A, Sokhna C, Chippaux JP (2009) Évaluation d'un test de diagnostic rapide du paludisme dans les postes de santé ruraux au Sénégal, Med Trop 69(5):496–500
20. OMS (2005) Cadre stratégique pour la prévention et la lutte contre le paludisme pendant la grossesse dans la région Afrique. AFR/MAL/04/01, Brazzaville
21. OMS (2009) Efficacité très variable des tests de diagnostic rapide du paludisme sur le marché
22. Partec (2012) CyScope® Malaria for highest sensitivity rapid malaria testing. [http//:www.partec.com/cms/front_content.php?idact=55]
23. Sousa-Figueiredo JC, Oguttu D, Adriko M, et al (2010) Investigating portable fluorescent microscopy (CyScope®) as an alternative rapid diagnostic test for malaria in children and women of child-bearing age. Malar J 9:245
24. WHO (2004) Malaria Rapid Diagnostic Test. Geneva. Roll Back Malaria, Regional Officer for Western Pacific and UNDP/World Bank/WHO/UNICEF special Program for Research and Training in Tropical Diseases
25. WHO (2006) The role of Laboratory diagnosis to support malaria case management. Focus on the use of rapid diagnostic test in areas of high transmission. Report of a WHO technical Consultation. 25–26 October 2004. 40 pp
26. WHO (2006) WHO briefing on Malaria Treatment Guidelines and artemisinin monotherapies
27. WHO (2008) World malaria report. WHO/HTM/GMP/2008; 12008
28. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, et al (2007) A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). Am J Trop Med Hyg 77(S6):119–27
29. Yavo W, Ackra KN, Menan EIH, et al (2002) Étude comparative de quatre techniques de diagnostic biologique du paludisme utilisées en Côte d'Ivoire. Bull Soc Pathol Exot 95(4):238–40 [http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T95-4-2374.pdf]

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin

Filémon T Tokponnon[1,2,3,4*], Bruno Aholoukpe[1,2], Eric Y Denon[1,2], Virgile Gnanguenon[2,3,4], Alexis Bokossa[2], Raphael N'guessan[5], Mariam Oke[1,2], Dorothée Kinde Gazard[2] and Martin C Akogbeto[2,3,4]

Abstract

Background: In Benin, around four million Long-Lasting Insecticide-treated Nets were freely distributed to household to prevent malaria in 2011. In contrast to a previous campaign that targeted only children under 5 years and pregnant women, this distribution campaign was conducted in order to achieve universal coverage. This study presents the results of LLIN coverage and utilization after the distribution campaign.

Methods: The study was a cross-sectional household survey which utilized a stratified two-stage cluster sampling design. The strata represented the twelve departments covered by the national distribution campaign in 2011 and included a total of 4,800 households randomly selected in the country. A questionnaire adapted from the standard Malaria Indicator Survey (MIS) Household Questionnaire was used. Data were entered using QPS software and analyzed with R 2.14.1.

Results: LLIN ownership was 86.4% (74 – 94). On average, each household received 3 LLINs (2–4). The proportion of households that met the ratio one net for two persons was 77%.
The proportions of individuals sleeping under LLINs were high (84.8%). LLIN use among urban residents was 10% lower than in effective users from rural areas (P = 0.00224).

Conclusions: The universal distribution campaign conducted in Benin has increased LLIN ownership and use in the community. But additional efforts are need to improve and maintain LLIN coverage.

Keywords: Long-lasting insecticide-treated nets, Universal coverage, Malaria, Benin

Background

The scaling- up of LLINs interventions to achieve high coverage of most or ultimately all at-risk populations has become the national malaria control standard in the Africa region with substantial support from the Global Fund and the Roll Back Malaria (RBM) Partnership [1]. Insecticide-treated nets (ITNs) remain effective tools for malaria prevention and can significantly reduce severe disease and mortality due to malaria, especially among the most vulnerable populations [2]. In recent decades, resources to fight malaria have increased and many countries across sub-Saharan Africa are rapidly expanding LLIN ownership coverage through several strategies including, social marketing [3,4] and free distribution to target groups (through antenatal care or immunization campaigns) [5-9]. Actually, promotion of LLIN use has shifted in emphasis from a focus on target groups to a broader objective of universal coverage. To achieve universal coverage, the RBM Partnership aim to distribute one LLIN for every two people by 2015 [1]. The main goal of this mass distribution is to protect all people living in endemic areas [10].

In 2007, the first campaign of mass distribution of LLINs took place in Benin. The targets were children under 5 years and pregnant women. Since 2008, Benin has adopted a strategy of routine distribution of LLINs to children <1 year old through measles vaccination sessions and pregnant women through antenatal clinics. In order to achieve universal coverage, the National Malaria

* Correspondence: filemont@yahoo.fr
[1]National Malaria Control Program, Cotonou, Benin
[2]Ministry of Health, Cotonou, Benin
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2013 Tokponnon et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Control Programme (NMCP) distributed 4 674799 new LLINs mainly Olyset Nets® from Summitomo, PermaNet 2.0® from Vestergaard-Frandsen, and Interceptor® from BASF, all free of charge and accessed through a campaign in 2011. The new National Strategic Plan to control malaria will repeat this intervention every three years to maintain universal coverage for sustained impact against malaria. Several partners are involved in the implementation of this intervention, including the Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria (GFATM), the World Bank, the USA President's Malaria Initiative (PMI) and Projet d'Appui au Développement du Système Sanitaire (PADS)/WHO. To supplement LLINs, yearly rounds of Indoor Residual Spraying (IRS) based on bendiocarb (FICAM® WP, BAYER,) were done on a regional basis.

The urgent need for data to inform policy about the level of achievement of the universal coverage led to the decision to conduct a rapid assessment of the first campaign for universal access. In this we aimed to determine the proportions of households that received free distribution of LLINs during the campaign and estimate households' coverage rate at the national and regional level after the campaign. We also evaluated the proportions of children under five and pregnant women using LLINs.

Methods

Study area

The study was conducted in Benin (West Africa) and involved 12 districts

- Alibori, Borgou, Atacora and Donga from the North of the country
- Collines, Zou in the center;

Couffo, Plateau, Mono, Atlantique, Oueme and Littoral located in the southern part (Figure 1). The northern area is characterized by a Sudanian semi-arid bioclimatic zone with only one rainy season in the year (June to October) and a mean annual rainfall below 900 mm. It is characterized by a dry savanna.

The center part is characterized by an intermediate bioclimatic zone (tropical Sudano-Guinean climate) with humid savanna and an average rainfall reaching 1000 mm per year.

The southern area, near the Atlantic coast, is characterized by a Guinean-bioclimatic zone with two rainy seasons (April–July and September–November) and an average annual rainfall of >1500 mm with degraded tropical forest.

Study population

The study was a cross-sectional household survey which utilized a stratified two-stage cluster sampling design. The strata represented the twelve departments covered by the national distribution campaign in 2011. Each district represented a survey domain. The first stage was the selection of the clusters. In each district, an alphabetical list of villages and grouping of populations sizes by village and city were established. A total of 40 clusters were selected per district. Within each cluster, 10 households were randomly selected, resulting in a total sample of 4,800 households in the country. To form clusters, population data was obtained from the third General Population and Housing Census conducted in Benin in 2002.

The second stage involved the selection of households. In the cluster, the first household to investigate was randomly selected from the household registration lists of the distribution campaigns. The first household found in this list was the gateway to the cluster. In urban areas with more houses, the selection of the next households were done after every 10 households count while in rural areas a reduced jump space of 5 households was left between two consecutive households selected.

Recruitment and training of interviewers

Interviewers were recruited by district on advice and recommendation by regional health officers. Four interviewers and one supervisor were recruited per district. Interviewers were nurses, midwives, social health workers and anthropologists, while supervisors were senior consultants. In order to avoid information bias, interviewers were deployed in a department other than the one they originate from. Before the collection of information in selected clusters, a training session was organized by interviewing 60 households from 12 villages located in districts near Cotonou, the capital city of Benin, not included in the study. Adjustment was made after the training of the field team.

Data collection

Data collection was conducted from November 28th to December 5th, 2011, corresponding to four months after the distribution campaign. A questionnaire adapted from the standard Malaria Indicator Survey (MIS) Household Questionnaire [11] was used. The questionnaire was divided into sections including household roster, household characteristics, the campaign of net distribution, nets received during the campaign, nets owned by the household and their use.

In each district, the data were collected by two teams. Each team was composed of two interviewers and a supervisor. In each cluster, interviewers were aided in their task by a guide identified locally in collaboration with the head of the village or the officer of the health center. Each team covered an average of 2–4 clusters per day depending on the location.

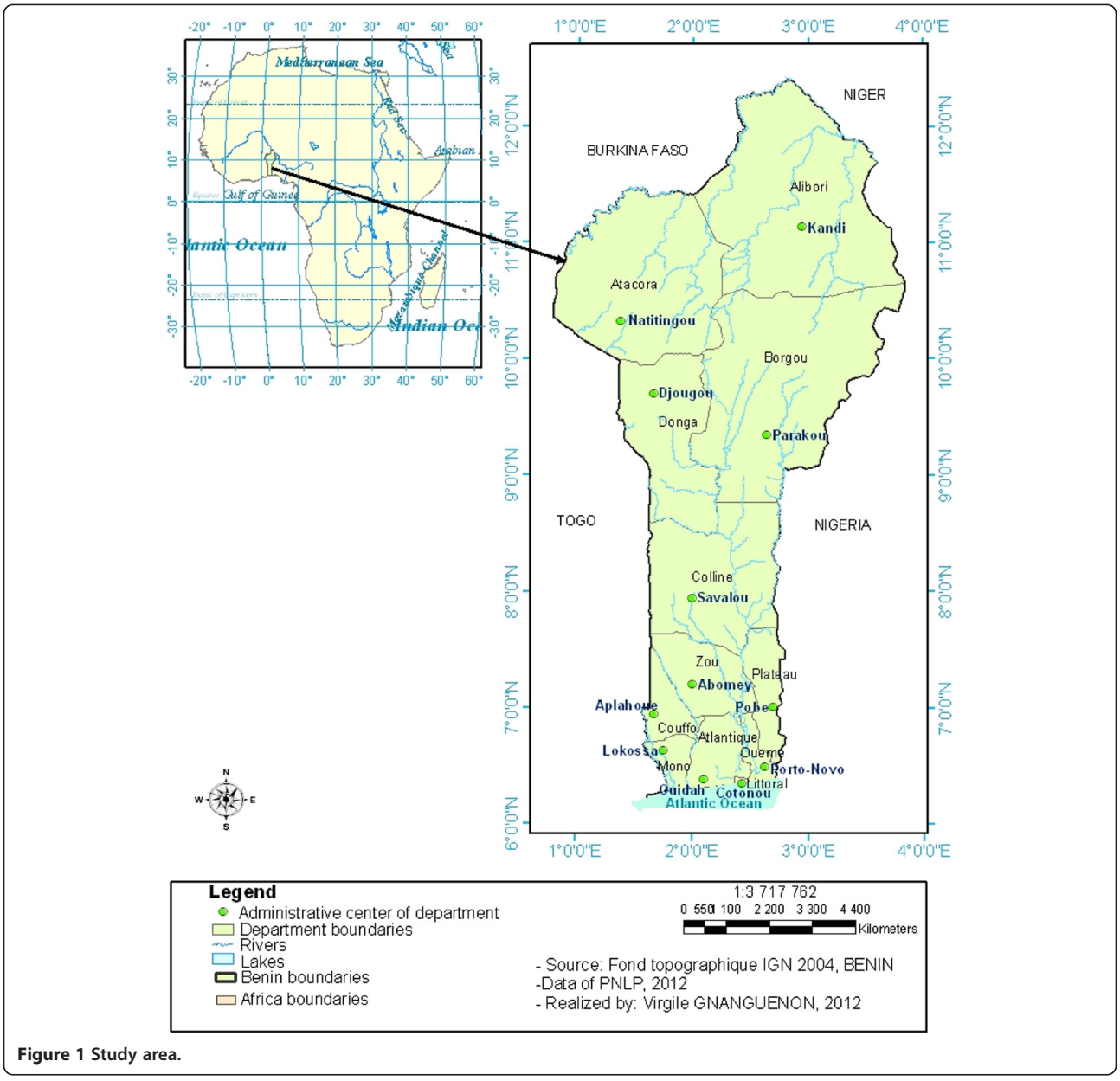


Figure 1 Study area.

Each selected household was visited. The head of household or an adult person acting on behalf of the head was interviewed. In occasions where no appropriate respondent was found in a particular household, the visit of the next home was scheduled. The techniques used for the data collection are structured interviews and direct observation after obtaining the consent of the head of household. A quality control check validating the data collected was made by each supervisor. A summary report form on the quality of the data collected was developed. It aims to check for the compliance with the household recruitment methodology and the completeness of the survey forms.

Data processing and analysis

Data entry was done using QPS software with double entry of all records. Both data sets were then compared and any discrepancy in records was verified using the original questionnaires.

After the first stage of cleaning, the data set was transferred to R 2.14.1 for analysis.

Indicators

Net coverage: the proportion of households with at least one LLIN and the average number of LLIN per household.

Ratio one net for two person (Intra-household coverage): the proportion of household with at least one LLIN for two people.
Net usage: proportion of residents who slept under LLIN the previous night.

The association between LLIN ownership, usage and explanatory variables (E.g. Size of households, gender, pregnancy status, etc.) were assessed using a logistic regression.

Ethical clearance

This paper used data from net free distribution campaign survey conducted on behalf of the National Malaria Control Programm in Benin. Because this was part of the programmatic activity, ethical clearance was exempted. Informed consent was obtained from each participant.

Results

Sample characteristics

A total of 4800 households participated in the survey (Table 1). Of these, 2991 representing 62% lived in rural areas and 1809 (38%) in urban areas. Among the heads of households interviewed, 2173 (45%) were female and 2627 (55%) were male. In the rural areas 41% of the heads of households were female and 59% were male whereas in the urban areas 53% of the heads were female and 47% were male. The average household size was 6 people (Table 1). Children under the age of five were recorded in 66% (3182) of the households and the average number of children under five per household was 1. Pregnant women were recorded in 14% (652) of the households (Table 1).

ITNs coverage and ownership after the distribution campaign in July 2011

Of the 4800 households surveyed, 4672 (97.3%) were informed of the distribution campaign. LLINs distribution vouchers had been given to 4290 (89.4%) households and 4147 (96.7%) of them actually received LLINs from the campaign (Table 2). LLINs universal coverage targeted by the distribution campaign was not met in any department. The percentage of households that met the universal coverage rate is lower in Littoral (52.5%) and Oueme (73%) and higher in Collines and Borgou (86%)". The proportion of individuals sleeping under LLINs was 84.8%, above the threshold of massive usage. The distribution campaign increased the LLIN coverage (proportion of households with at least one LLIN) and usage (Table 2). The universal coverage was not reached in all the households but the LLINs use by people was above the threshold (80%) leading to a collective protecting effect (mass protection effect).

Factors associated with LLINs ownership

In the urban areas, 1456 (80.49%) households out of a total 1809 households had at least one LLIN. In the rural areas, 2691 households representing 89.97% of the households had at least one LLIN (Table 3). The area of residence, i.e. urban residents had 54% lower opportunity to own an LLIN than those living in rural areas (OR = 0.46 [0.39-0.54]; $p < 0.001$) (Table 3).

Crowding within households played a significant role in ownership of LLINs. The odds of securing an LLIN at home during the campaign increased steadily with family members found within households. Relative to households with a single occupant, it significantly increased to 1.52 [1.03-2.23] (P = 0.034) within households with 2–4

Table 1 Baseline characteristics of households

	Number of households	Average size of households	Average households with at least one child < 5	Average children under 5 per households	% households with at least one pregnant woman
Atacora	400	6 [5.89-6.72]	65 [63.86-66.14]	1 [0.95-1.15]	10 [09.03- 11.04]
Donga	400	7 [6.91-7.42]	72 [70.83-72.67]	1 [1.27-1.53]	13 [12.02-14.04]
Alibori	400	5 [5.09-6.36]	63 [62.06-64.44]	1 [0.94-1.13]	14 [13.02- 15.03]
Borgou	400	10 [8.95-12.68]	67 [66.19-68.31]	2 [1.62-2.10]	19 [18.02- 20.02]
Collines	400	6 [6.04-7.29]	74 [73.16-74.85]	1[1.11-1.31]	17 [16.03-18.00]
Zou	400	5 [5.17-6.97]	60 [58.0-61.30]	1 [0.82-1.00]	12 [11.04-13.02]
Mono	400	6 [5.46-6.60]	63 [61.54-63.96]	1 [0.90-1.09]	14 [13.03-15.02]
Couffo	400	9 [8.17-10.92]	72 [70.83-72.67]	2 [1.40-2.71]	18 [17.03-19.01]
Ouémé	400	5 [5.12-6.17]	64 [63.09-65.41]	1 [0.95-1.53]	13 [12.02-14.03]
Plateau	400	6 [5.63-7.32]	62 [60.25-62.75]	1 [0.92-1.13]	10 [09.04-11.03]
Atlantique	400	7[6.50-7.89]	72 [71.09-72.91]	1 [0.88-1.38]	15 [14.03-16.01]
Littoral	400	5 [5.06-6.11]	62 [60.77-63.24]	1 [0.82-1.00]	11 [10.01- 12.05]
Mean average	**400**	**6.42 [6.04-6.78]**	**66.33 [65.99-66.67]**	**1.16 [0.94-1.39]**	**13.83 [13.37-14.28]**

Table 2 LLINs coverage and ownership per household

Department	% of households informed about the distribution	% of households that received a coupon	% of household that received LLIN	Average LLIN received per household	Proportion of households that met the ratio one net for two persons
Atacora	97.0 [94.83-98.28]	95.7 [93.30-97.33]	93.8 [90.94-95.73]	2.98	75.3 [71.02-79.47]
Donga	97.0 [94.83-98.28]	96.7 [94.52-98.09]	94.8 [92.11-96.54]	3.26	83.3 [79.60-86.90]
Alibori	99.0 [97.46-99.61]	91.3 [88.07-93.64]	89.3 [85.83-91.92]	2.36	75.5 [71.28-79.71]
Borgou	99.5 [98.20-99.86]	93.2 [90.36-95.32]	89.5 [86.11-92.14]	3.95	86.0 [82.59-89.40]
Collines	98.3 [96.43-99.15]	92.2 [89.21-94.49]	92.3 [89.21-94.49]	2.94	86.3 [82.87-89.62]
Zou	98.7 [97.46-99.61]	89.2 [85.83-91.92]	86.3 [82.53-89.28]	2.34	77.5 [73.40-81.59]
Mono	91.5 [97.46-99.61]	84.2 [80.36-87.49]	79.3 [75.01-82.94]	2.27	78.0 [73.94-82.05]
Couffo	96.0 [88.36-93.61]	89.0 [85.55-91.70]	88.5 [85.00-91.27]	3.36	79.3 [75.27-83.22]
Oueme	96.7 [94.52-98.09]	80.3 [76.07-83.86]	76.8 [72.37-80.62]	1.98	73.0 [68.64-77.35]
Plateau	98.0 [96.10-98.98]	87.3 [83.62-90.17]	85.5 [81.71-88.61]	2.70	79.8 [75.81-83.68]
Atlantique	99.2 [97.82-99.74]	91.5 [90.36-95.32]	87.0 [83.35-89.95]	2.78	80.8 [76.88-84.61]
Littoral	97.0 [94.83-98.28]	81.7 [77.67-85.23]	74.0 [69.49-78.06]	2.00	52.5 [47.60-57.39]
Mean	**97.3 [96.84-97.75]**	**89.4 [88.47-90.2]**	**86.4 [85.40-87.34]**	**2.74**	**77.3 [76.06-78.43]**

members, 1.78 [1.2-2.63] (P = 0.004) in those with 5–7 members and to 2.66 [1.75-4.06] (P < 0.001) in households sharing 8 members and above.

There was no association between ownership of LLINs and the status of being pregnant at a district (OR = 1.13 [0.87-1.48]; P = 0.728). By contrast, both the head of household gender status of being a male and the fact of having a child <5 yrs old within households significantly increased the chance of owning an LLIN (OR = 1.53 [1.27-1.83]; P < 0.001 for gender) and (OR = 1.39 [1.14-1.7]; P = 0.001 for age) (Table 3).

LLINs actual use rate and associated factors

The proportions of individuals sleeping under LLINs the night before they were interviewed was high (84.8%). The odds of effective use of LLINs among urban residents was

Table 3 Logistic regression assessing factors associated with LLIN ownership

Factors	Number of individuals	Number of individual using LLIN (%)	Odds ratios (95% CI)	P
Total number of individuals	27794	23575(84.82)		
Place of residence				
Rural	9458	15640(85.30)	1	
Urban	18336	7935(83.90)	0.90 [00.84-00.96]	0.00224
Size of the household				
0-1 member	145	131(90.34)	1	
2-4 members	3915	3490(89.14)	0.97 [00.53-01.64]	0.91232
5-7 members	8876	7692(86.66)	0.89 [00.49-01.50]	0.68577
8 and more members	14858	12262(82.53)	0.80 [00.44-01.35]	0.43840
Age				
15-25 years	2523	2143(84.94)	1	
26-35 years	7207	6385(88.59)	1.50 [01.31-01.72]	< 0.001
36-45 years	7741	6721(86.82)	1.34 [01.17-01.53]	< 0.001
46 and mores years	10323	8326(80.65)	0.91 [00.80-01.03]	0.12776
Ratio 1 net for 2 person met				
No	13174	10333(78.43)	1	
Yes	14620	13242(90.57)	2.47 [02.30-02.65]	< 0.001
Gender				
Female	10161	8630(84.76)	1	
Male	17633	14945(84.93)	1.10 [01.03-01.19]	0.855

10% lower than in effective users from rural areas (OR = 0.90 [00.84-00.96]; P = 0.00224).

The actual usage rates of LLINs among family members were similar across districts, regardless of whether members were crowded or not within households (0R = 0.80-0.97; p = 0.43-0.91) (Table 4). Middle age class (25–46 yrs old) had improved attitude of sleeping under LLINs compared to younger classes between 15–25 yrs old (P < 0.0001) but such acknowledgeable attitude was not observed among classes older than 46 yrs and above (P = 0.12776) (Table 4).

In areas where the recommended ratio of 1 LLIN per every 2 persons was met, the odds of effective use increased 2.4-fold [02.30-02.65] (P < 0.001) compared to areas where this statement was not met.

We observed no influence of the gender status of the head of household in the rate at which LLINs was effectively used; the odds of usage being similar whether the household was headed by a man or woman (OR = 1.10 [01.03-01.19]; P = 0.855).

Discussion

The study revealed that 86.4% of households surveyed have at least one LLIN and confirmed the results observed in the Demographic Health survey conducted in 2012 in Benin [12]. In another study conducted in Benin in 2010 [13] before the distribution campaign, 40% of households have at least one LLIN. These observations showed that the national distribution campaign of LLINs conducted in Benin in July 2011 has significantly increased LLINs coverage. Universal coverage at country level as defined by World Health Organization [14] is then reached. The results also confirmed the evolution of performance indicators to the strategic objectives of the sub-regions and those of the NMCP/Benin, which aimed by this free distribution campaign to bring the proportion of households with at least one LLIN from 58 to 90% by the end of 2011 [15]. Although the campaign increased household LLIN ownership, it failed to attain its goal to bring the proportion of 90% of household with at least one LLIN because the average LLIN coverage observed in this study was 86.4%. In addition, the universal bed net coverage goal defined as one for every 2 people was not also achieved. Only 77% of the households surveyed met this cut-off suggesting that the number of LLIN distributed may not be sufficient to protect and cover 23% of the Beninese households that received at least one LLIN. But, there were important variations with this indicator between departments; the proportion of households in a department that have enough nets for every two persons ranged from 52% to 86% suggesting that households that did not have enough nets ranged from 14% to 48%. In fact, the maximum number of LLINs to households in the national distribution campaign was eight per household and this may affect ownership in large households size [15]. This

Table 4 Logistic regression assessing factors associated with LLIN use

Factors	Number of individuals	Number of individual using LLIN (%)	Odds ratios (95% CI)	P
Total number of individuals	27794	23575(84.82)		
Place of residence				
Rural	9458	15640(85.30)	1	
Urban	18336	7935(83.90)	0.90 [00.84-00.96]	0.00224
Size of the household				
0-1 member	145	131(90.34)	1	
2-4 members	3915	3490(89.14)	0.97 [00.53-01.64]	0.91232
5-7 members	8876	7692(86.66)	0.89 [00.49-01.50]	0.68577
8 and more members	14858	12262(82.53)	0.80 [00.44-01.35]	0.43840
Age				
15-25 years	2523	2143(84.94)	1	
26-35 years	7207	6385(88.59)	1.50 [01.31-01.72]	< 0.001
36-45 years	7741	6721(86.82)	1.34 [01.17-01.53]	< 0.001
46 and mores years	10323	8326(80.65)	0.91 [00.80-01.03]	0.12776
Ratio 1 net for 2 person met				
No	13174	10333(78.43)	1	
Yes	14620	13242(90.57)	2.47 [02.30-02.65]	< 0.001
Gender				
Female	10161	8630(84.76)	1	
Male	17633	14945(84.93)	1.10 [01.03-01.19]	0.855

result was observed in north-west Tanzania after national distribution campaign [16]. The same result (40%) was also reported after national distribution campaign at Senegal in 2010 [17].

The proportion of households that received a coupon was 89% for the whole country and the proportion of household that received at least one LLIN was 86%. This observation showed that the distribution procedure was efficient but could be improved. However, the relationship between distributed coupons and receiving LLINs remains to be explored in several localities [18]. Some households, for reasons of unavailability or difficulties in finding the location of the distribution, or late removal sites distribution and also the long waiting times, have not received LLINs. This state of affairs could justify the low coverage observed in the departments of Littoral and Oueme.

In urban areas, the number of households with at least one LLIN was also lower than in rural areas. This could be associated with the fact that many people in urban areas have not time to go to the distribution point or have not received a coupon. In rural areas of Benin, people are often available and can easily go to the distribution point to receive LLIN. These reasons could explain why the place of residence plays a key role in LLIN ownership. The size of household is also associated with LLIN ownership and is adequacy with the objectives of the distribution campaign which aimed to provide LLIN according to household size. The presence of a pregnant woman did not play a role in LLIN ownership. This observation could be explained by the few number of pregnant women recorded per household in this study. The presence of children under five in the household was significantly bound with LLIN ownership. This result may be due to the presence of an average of one child under five per household. The odd of male head of households with at least one LLIN was significantly higher than that of female. This is due to the high number of male heads of household in Benin. Before the distribution campaign of 2011, to be a pregnant woman was an important factor in LLIN ownership [15]. Currently, this trend is being reversed in Benin by the distribution in universal access; but to be a child under five seems to still play a key role in LLIN ownership.

Around 84% of households' members slept under LLIN the night before, suggesting that the distribution campaign increased bed net usage. But the number of individuals who slept under LLIN in urban areas is lower than in rural areas. This shows a low use of LLIN in urban areas and could be explained by hot weather associated with low mosquito nuisance which did not motivate LLIN use. According to Pulford *et al.* [19], low mosquito density is the most widely identified reason for LLIN non-use. However, more investigation to determine factors associated with low LLIN use in urban areas is important to induce behaviour change in urban areas. This study showed that household size does not play a role in LLIN use. LLIN use was similar among family members [20] showing that the 2011 distribution campaign successfully achieved the goal of universal access to LLIN. All groups of people at risk to malaria infection are covered but the middle age class (25–46 yrs old) had an improved attitude of sleeping under LLINs. This finding was also observed by Garley *et al.* [21] in Nigeria who showed that people over 25 years old use more LLIN. This difference in LLIN use between this age group and others could be due to sleeping arrangements. People of this class of age are often married and sleep together with their spouse; this could increase the number of people of this class of age that use LLIN comparatively to other class of age.

The universal coverage aimed to cover all people in the community but not only the target groups. The goal is to provide equitable protection to all household members and to benefit of the collective protecting effect induced by the high household coverage. The comparison of LLIN usage between family members illustrated the increased conscientiousness in LLIN use in Beninese population. Then, with more efforts and engagements from different partners implicated in malaria control strategies in Benin, all the goals of universal coverage will be achieved.

This study showed positive impact of mosquito net distribution campaign in Benin. However, further assessment would have been possible, if logistics and baseline data for households' economic characteristic and net use were available. The analysis of net coverage and net use was restricted to the post campaign survey and reference before the campaign was also limited to PNLP (2011) [13]. Therefore, it was important to conduct an assessment before each distribution campaign to provide reference data for the post-campaign assessment.

Conclusion

This study shows an improvement of the performance indicators towards universal coverage. But it should be clarified that further efforts are still required to achieve the standard of an ITN for two people in the household. Efforts are also required in order to maintain the observed coverage rates in different department safer this campaign that help to cover around nine out of ten households.

This assessment allows us to have the data that could help the national malaria control program to improve others LLIN campaigns to reduce morbidity and mortality due to malaria in Benin.

Competing interests

There are neither any financial competing interests nor any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript.

Authors' contributions
FTT collected analyzed, interpreted data and wrote the manuscript. BA EYD and AB were responsible for field collection; Data analyze and helped in drafting the manuscript. VG contributed to the mapping, helped in drafting the manuscript and revised the manuscript. RN interpreted data and revised the manuscript. MO, DKF and MCA conceived and designed the study, supervised field's procedures, and review the manuscripts. All authors have read and approved the manuscript.

Acknowledgements
This work received a financial support from Global Fund, World Bank, USAID through the President's Malaria Initiative and Projet d'Appui au Développement du Système Sanitaire (PADS)/WHO. The authors express their sincere thanks to the fieldworkers and all those who participated in the study. The authors would also like to thank the PNLP, WHO, Africare-Benin. A special thanks to, Dina Gbenou, Evelyne Chaffa Alyko, Denakpo Boniface, Fassinou Hector, Akakpo Evelyne, Pio Abou Bakary, Akogbeto Petas, Hounnankan Atanase, Ossè Razaki and Oke-Agbo Fréderic for their participation.

Author details
[1]National Malaria Control Program, Cotonou, Benin. [2]Ministry of Health, Cotonou, Benin. [3]Faculte des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. [4]Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. [5]London School of Hygiene and Tropical Medicine, Kepel Street, London, UK.

Received: 17 July 2013 Accepted: 10 September 2013
Published: 16 September 2013

References

1. Roll Back Malaria: *2001–2010: Decade to roll back malaria in developing countries, particularly in Africa (A/64/302) | ReliefWeb.* Geneva: World Health Organization; 2008.
2. Lengeler C: **Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria.** *Cochrane Database Syst Rev* 2004, **2:**CD000363.
3. Noor AM, Amin AA, Akhwale WS, Snow RW: **Increasing coverage and decreasing inequity in insecticide-treated bed net use among rural Kenyan children.** *PLoS Med* 2007, **4:**e255.
4. Grabowsky M, Nobiya T, Selanikio J: **Sustained high coverage of insecticide-treated bednets through combined catch-up and keep-up strategies.** *Trop Med Int Health* 2007, **12:**815–822.
5. Beer N, Ali AS, De Savigny D, Al-mafazy AH, Ramsan M, Abass AK, Omari RS, Björkman A, Källander K: **System effectiveness of a targeted free mass distribution of long lasting insecticidal nets in Zanzibar Tanzania.** *Malar J* 2010, **9:**173.
6. Blackburn BG, Eigege A, Gotau H, Gerlong G, Miri E, Hawley WA, Mathieu E, Richards F: **Successful integration of insecticide-treated bed net distribution with mass drug administration in Central Nigeria.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75:**650–655.
7. Gerstl S, Dunkley S, Mukhtar A, Maes P, De Smet M, Baker S, Maikere J: **Long-lasting insecticide-treated net usage in eastern Sierra Leone - the success of free distribution.** *Trop Med Int Health* 2010, **15:**480–488.
8. Grabowsky M, Farrell N, Hawley W, Chimumbwa J, Hoyer S, Wolkon A, Selanikio J: **Integrating insecticide-treated bednets into a measles vaccination campaign achieves high, rapid and equitable coverage with direct and voucher-based methods.** *Trop Med Int Health* 2005, **10:**1151–1160.
9. Wolkon A, Vanden Eng JL, Morgah K, Eliades MJ, Thwing J, Terlouw DJ, Takpa V, Dare A, Sodahlon YK, Doumanou Y, Hightower AW, Lama M, Thawani N, Slutsker L, Hawley WA: **Rapid scale-up of long-lasting insecticide-treated bed nets through integration into the national immunization program during child health week in Togo, 2004.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **83:**1014–1019.
10. Teklehaimanot A, Sachs JD, Curtis C: **Malaria control needs mass distribution of insecticidal bednets.** *Lancet* 2007, **369:**2143–2146.
11. Roll Back Malaria: *World Malaria report.* Geneva: World Health Organization; 2005.
12. Institut National de la Statistique et de l'Analyse Économique (INSAE), ICF International: *Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples du Bénin EDS-MICS-IV 2011–2012.* Cotonou: Ministère du Développement et de l'économie; 2012:19–20.
13. PNLP-AFRICARE BENIN-CRS BENIN: *Evaluation finale du projet d'appui à la lutte contre le paludisme.* Cotonou: Ministère de la Santé; 2011:42.
14. WHO: *Report of the twelth WHOPES working group meeting.* Geneva: World Health Organization; 2008:127.
15. PNLP: *Campagne de distribution gratuite des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action aux ménages du Bénin.* Cotonou: Ministère de la Santé; 2012:11.
16. West PA, Protopopoff N, Rowland MW, Kirby MJ, Oxborough RM, Mosha FW, Malima R, Kleinschmidt I: **Evaluation of a national universal coverage campaign of long-lasting insecticidal nets in a rural district in north-west Tanzania.** *Malaria J* 2012, **11:**273.
17. Julie T, Robert P, Salif N: *Evaluation de la campagne intégrée de distribution de MIILD, de vitamine A et de Mébendazole au Sénégal.* Dakar: Ministère de la santé; 2011:93.
18. PNLP: *Evaluation Post Campagne De La Distribution Gratuite De Miild En 2011 Au Benin.* Cotonou: Ministère de la Santé; 2011:58.
19. Pulford J, Hetzel MW, Bryant M, Siba PM, Mueller I: **Reported reasons for not using a mosquito net when one is available: a review of the published literature.** *Malaria J* 2011, **10:**83.
20. Ye Y, Patton E, Kilian A, Dovey S, Eckert E: **Can universal insecticide-treated net campaigns achieve equity in coverage and use? The case of northern Nigeria.** *Malaria J* 2012, **11:**32.
21. Garley AE, Ivanovich E, Eckert E, Negroustoueva S, Ye Y: **Gender differences in the use of insecticide-treated nets after a universal free distribution campaign in Kano State, Nigeria: post-campaign survey results.** *Malaria J* 2013, **12:**119.

doi:10.1186/1756-3305-6-265
Cite this article as: Tokponnon *et al.*: Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin. *Parasites & Vectors* 2013 **6**:265.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Rubrique paludisme

Enquête démographique et de santé 2011- 2012

Achille MASOUGBODJI

Yves Éric DENON

Bruno AHOLOUKPE

Annexes

Annexe 1 : Tableau posologique de Artemether Lumefantrine

Les comprimés d'Artemether-Luméfantrine à administrer dans le cadre de l'étude seront utilisés comme suit :

Poids corporel (kg)	Nombre de comprimés		
	Jour 0	Jour 1	Jour 2
Artemether /Lumefantrine 20/120 mg			
5-14 Kg (6 mois à 3 ans)	1comp. Matin 1 comp. Soir	1comp. Matin 1 comp. Soir	1comp. Matin 1 comp. Soir
15-24 Kg (3 à 7 ans)	2comp. Matin 2 comp. Soir	2comp. Matin 2 comp. Soir	2comp. Matin 2 comp. Soir
25-34 Kg (7 à 10 ans)	3 comp. Matin 3 comp. Soir	3 comp. Matin 3 comp. Soir	3 comp. Matin 3 comp. Soir
Plus de 35 Kg (10 à 12 ans)	4 comp. Matin 4 comp. Soir	4 comp. Matin 4 comp. Soir	4 comp. Matin 4 comp. Soir

Annexe 2 : Classification des résultats du traitement[1]

Echec thérapeutique précoce

- signes de danger ou paludisme grave au jour 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie ;
- parasitémie au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quelle que soit la température axillaire ;
- parasitémie au jour 3 et température axillaire ≥37,5°C ; et
- parasitémie au jour 3 ≥25% par rapport à la numération du jour 0.

Echec thérapeutique tardif

Echec clinique tardif

- signes de danger ou paludisme grave en présence d'une parasitémie à n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 28 chez des participants qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce ; et
- présence d'une parasitémie à n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 28 avec une température axillaire ≥37,5°C (ou antécédent de fièvre) chez des participants qui ne répondaient auparavant à aucun critère d'échec thérapeutique précoce.

Echec parasitologique tardif

- présence d'une parasitémie entre le jour 7 et le jour 28 avec une température <37,5°C chez des participants qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.

Réponse clinique et parasitologique adéquate

- absence de parasitémie au jour 28, quelle que soit la température axillaire, chez des participants qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce, d'échec clinique tardif ou d'échec parasitologique tardif.

[1] OMS. *Sensibilité de* Plasmodium falciparum *aux médicaments antipaludiques : rapport sur la surveillance globale 1996-2004.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2005 (WHO/HTM/MAL/2005.110) (http://www.who.int/malaria/resistance).

Annexe 3 : Formulaire de dépistage

Formulaire de dépistage	
Nom du centre de santé :	Numéro de l'étude :
Localité :	Numéro de dépistage du participant :
District :	Date de la consultation (jour-mois-année) :
Province:	
Données démographiques	
Date de naissance (jour-mois-année) : ou âge estimatif : en : ☐ mois ou ☐ années	
Taille (cm) : Poids (kg) :	
Sexe : ☐ H ☐ F	
Dans le cas d'une personne de sexe féminin, participante est-elle enceinte ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Incertain	
Si elle est enceinte, date des dernières règles (jour-mois-année) :	
Température avant le début du traitement	
Antécédent de fièvre au cours des dernières 24 h ? ☐ Oui ☐ Non	
Température : °C ☐ Axillaire ☐ Tympanique ☐ Rectale ☐ Orale	
Goutte épaisse et frottis sanguin pour l'estimation de la numération parasitaire de *P. falciparum*	
Espèces : ☐ *P. falciparum* ☐ *P. vivax* ☐ *P. ovale* ☐ *P. malariae*	
Des espèces autres que *P. falciparum* sont-elles présentes ? ☐ Oui ☐ Non **(Dans l'affirmative, le participant ne peut participer à l'étude)**	
Nombre approximatif de formes asexuées de *P. falciparum* : Présence de 1-100 formes asexuées/3-6 leucocytes ? ☐ Oui ☐ Non **(Dans l'affirmative, le participant ne peut participer à l'étude)**	
Présence de gamétocytes de *P. falciparum* ? ☐ Oui ☐ Non	
Un prélèvement sanguin a-t-il été recueilli, pour PCR ? ☐ Oui ☐ Non	
Hémoglobine : g/dl Hématocrite : %	
Analyse d'urine (test de grossesse pour les femmes)	
Résultat du test de grossesse : ☐ Positif ☐ Négatif **(Si les résultats sont positifs, la participante ne peut participer à l'étude)**	
Critères d'inclusion	
• participant âgé de xxxxxx à xxxxxx mois/années • infestation monospécifique par *P. falciparum* confirmée par un étalement de sang positif (c'est-à-dire absence d'infestation mixte) • parasitémie : de xxxxxxxxx à xxxxxxxxx formes asexuées par µl • température mesurée (selon la méthode de prise de température) ou antécédent de fièvre au cours des dernières 24 heures • capacité à prendre des médicaments par voie orale • possibilité et volonté de respecter le protocole pendant la durée de l'étude et d'observer le calendrier de consultations • absence de malnutrition sévère (définie conformément au protocole)	
Le participant satisfait-il à tous les critères d'inclusion ? ☐ Oui ☐ Non **(Si la réponse est négative, le participant ne peut participer à l'étude)**	

Formulaire de dépistage (page 2)	
Critères d'exclusion	
• signes et symptômes de paludisme grave ou compliqué nécessitant un traitement parentéral conformément aux critères de l'OMS (appendice 1) ; • infestation mixte ou infestation monospécifique par une autre espèce plasmodiale détectée par examen microscopique ; • malnutrition sévère ; • Etat fébrile causé par des maladies autres que le paludisme ou d'autres maladies sous-jacentes chroniques ou graves ; • prise régulière de médicaments, qui gêne la pharmacocinétique antipaludique ; • antécédents d'hypersensibilité ou de contre-indication aux médicaments testés ;	
Le participant répond-il à l'un des critères d'exclusion ? ☐ Oui ☐ Non **(Dans l'affirmative, le participant ne peut participer à l'étude)**	
Si la réponse est affirmative, veuillez préciser le motif de l'exclusion :	
Consentement éclairé et assentiment du participant	
Signature du formulaire de consentement : ☐ Oui ☐ Non Signature du formulaire d'assentiment : ☐ Oui ☐ Non	Numéro d'identification du participant : Date (jour-mois-année) :

Annexe 4 : Calendrier des activités de suivi

	Jour										
	0	1	2	3	7	14	21	28	35	42	Autre jour
Procédure											
Evaluation clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)	(X)	(X)
Température	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)	(X)	(X)
Goutte épaisse pour la numération parasitaire	X		X	X	X	X	X	X	(X)	(X)	(X)
Echantillon d'urine	(X)										
Prélèvement sanguin :											
génotypage	X				X	X	X	X	(X)	(X)	X
hémoglobine ou hématocrite	(X)					(X)		(X)		(X)	(X)
marqueurs moléculaires	(X)				(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
test in vitro	(X)										
concentration d'antipaludiques dans le sang	(X)				(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Traitement											
Médicament à tester	X	(X)	(X)								
Traitement de secours		(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)			(X)

Les parenthèses indiquent des activités effectuées uniquement dans certains cas ou des activités facultatives. Par exemple, le traitement ne sera donné aux jours 1 et 2 que pour des médicaments exigeant une administration sur trois jours. Au jour 1, il conviendra de rechercher une parasitémie si le participant présente un signe quelconque de danger. Le traitement de secours pourra être administré n'importe quel jour, à condition que le participant réponde aux critères d'échec thérapeutique. Les jours supplémentaires sont tous les jours où le participant revient au centre de santé, autres que les jours de suivi programmés, en raison d'une récurrence des symptômes. Ces jours-là, des prélèvements sanguins pourront être effectués de manière systématique ou à la demande du personnel clinique.

Annexe 5 : Dossier individuel du participant

Dossier individuel du participant : Modèle J0, J1, J2, J3, J7, J14, J21, J28 du traitement	
Nom du centre de santé : Localité : District : Province :	Numéro de l'étude : Numéro d'identification du participant : Date de la consultation (jour-mois-année) :

Données démographiques

Date de naissance (jour-mois-année) : ou âge estimatif : en : ☐ mois ou ☐ années

Taille (cm) : Poids (kg) : Sexe : ☐ H ☐ F

Dans le cas d'une personne de sexe féminin, la participante est-elle enceinte ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Incertain
(Dans l'affirmative, la participante ne peut participer à l'étude)

Si elle est enceinte, date des dernières règles (jour-mois-année) :

Température avant le début du traitement

Antécédent de fièvre au cours des dernières 24 heures ? ☐ Oui ☐ Non

Température : °C ☐ Axillaire ☐ Tympanique ☐ Rectale ☐ Orale

Gouttes épaisses pour *P. falciparum* : numération quantitative des plasmodies et numération qualitative des gamétocytes

Nombre moyen de formes asexuées de *P. falciparum* (/µl) :

Présence de gamétocytes de *P. falciparum* ? ☐ Oui ☐ Non

Des espèces autres que *P. falciparum* sont-elles présentes ? ☐ Oui ☐ Non **(Dans l'affirmative, le participant ne peut participer à l'étude)**

Si la réponse est affirmative, quelles espèces ? ☐ *P. vivax* ☐ *P. ovale* ☐ *P. malariae*

Un prélèvement sanguin a-t-il été recueilli, pour PCR ? ☐ Oui ☐ Non

Analyse d'urine pour la détection d'antipaludiques

Test utilisé : Résultat de l'analyse : ☐ Positif ☐ Négatif

Test utilisé : Résultat de l'analyse : ☐ Positif ☐ Négatif

Prise antérieure ou actuelle de médicaments

Le nom de tous les médicaments, y compris les remèdes naturels et les médicaments homéopathiques pris au cours des 14 derniers jours devrait être noté dans la présente section.

Le participant a-t-il pris précédemment ou prend-il des médicaments antipaludiques ? ☐ Oui ☐ Non. Dans l'affirmative, veuillez préciser plus bas. Il convient soit de mentionner la date d'arrêt du médicament, soit de cocher la case « traitement en cours ».

Nom du médicament (nom générique)	Dates	Traitement en cours (Oui = ☒)	Dose journalière totale et unité (p. ex. 400 mg)	Voie d'administration	Indications
	Début du traitement : Fin du traitement :	☐			

	Début du traitement : Fin du traitement :	☐			
	Début du traitement : Fin du traitement :	☐			

Dossier individuel du participant : page 2				
Médicaments administrés				
Nom(s) du (des) médicament(s) antipaludique(s)	Heure de prise (heure, minutes)	Nombre de comprimés	Le participant a-t-il vomi ?	Heure des vomissements (heure, minutes)
			☐ Oui ☐ Non	
			☐ Oui ☐ Non	
Nom des autres médicaments				
			☐ Oui ☐ Non	
			☐ Oui ☐ Non	

Annexe 6 : Formulaire de déclaration des manifestations indésirables graves

Formulaire de déclaration des manifestations indésirables graves	
Nom du centre de santé : Localité : District : Province :	Numéro de l'étude : Numéro d'identification du participant : Date de la consultation (jour-mois-année) : Jour du suivi :
Données démographiques	
Date de naissance (jour-mois-année) : ou âge estimatif : en : ☐ mois ou ☐ années Taille (cm) : Poids (kg) : Sexe : ☐ H ☐ F Dans le cas d'une personne de sexe féminin, la participante est-elle enceinte ? ☐ Oui ☐ Non ☐ Incertain Si elle est enceinte, date des dernières règles (jour-mois-année) :	
Manifestation indésirable grave	
Type de manifestation : ☐ Décès ☐ Manifestation engageant le pronostic vital ☐ Hospitalisation ou prolongation de l'hospitalisation ☐ Incapacité permanente ☐ Anomalie congénitale Date de survenue de la manifestation (jour-mois-année) :	
Décrire la manifestation indésirable grave (en mentionnant tous les résultats de laboratoire pertinents) :	
Décrire comment la réaction indésirable a été traitée :	

Formulaire de déclaration des manifestations indésirables graves (page 2)
Observations (par exemple antécédents médicaux, allergies à des médicaments, exposition antérieure à des médicaments analogues, autres données de laboratoire ; préciser si la réaction a cessé après l'arrêt du médicament ou si elle est réapparue après sa réintroduction) :
Résultats constatés
☐ Rétablissement complet ☐ Participant non encore rétabli ☐ Rétablissement avec conséquences à long terme Si le participant s'est rétabli, indiquer la date du rétablissement (jour-mois-année) :

Médicaments (faire la liste des **médicaments suspectés d'être à l'origine** de la manifestation indésirable grave, ainsi que de tous (les) **médicaments pris simultanément**)

Nom de marque, numéro de lot, nom du fabricant (indiquer en premier les médicaments suspects)	Dose journalière	Voie	Date de début du traitement	Date de la fin du traitement	Indications

Agent chargé de la déclaration

Nom :

Qualifications :

Adresse :

Téléphone :

Télécopie :

Adresse électronique :

Signature : Date :

Annexe 7 : Lignes directrices pour l'analyse des résultats

Résultat final au jour X (X = 28 ou 42)	Résultats non corrigés par PCR	
	Taux de succès ou d'échec cumulé (analyse de Kaplan-Meier)	Proportion (analyse « per protocol »)
Réponse clinique et parasitologique adéquate au jour X	Succès	Succès
Echec thérapeutique précoce	Echec	Echec
Echec clinique tardif avant le jour 7	Echec	Echec
Echec clinique tardif ou échec parasitologique tardif au jour 7 ou ultérieurement	Echec	Echec
Infestation par d'autres espèces	Données censurées (jour de l'infestation)	Exclusion de l'analyse
Participant perdu de vue	Données censurées le dernier jour du suivi, selon le calendrier	Exclusion de l'analyse
Retrait ou non-respect du protocole	Données censurées le dernier jour du suivi, selon le calendrier, avant le retrait ou le non-respect du protocole	Exclusion de l'analyse

Résultat final au jour X (X = 28 ou 42)	Résultats non corrigés par PCR	
	Taux de succès ou d'échec cumulé (analyse de Kaplan-Meier)	Proportion (analyse « per protocol »)
Réponse clinique et parasitologique adéquate au jour X	Succès	Succès
Echec thérapeutique précoce	Echec	Echec
Echec clinique tardif avant le jour 7	Echec	Echec
Echec clinique tardif ou échec parasitologique tardif au jour 7 ou ultérieurement		
• recrudescence de *P. falciparum**	Echec	Echec
• réinfestation par *P. falciparum**	Données censurées (jour de la réinfestation)	Exclusion de l'analyse
• autres espèces, avec recrudescence de *P. falciparum*	Echec	Echec
• autres espèces avec réinfestation par *P. falciparum*	Données censurées (jour de la réinfestation)	Exclusion de l'analyse
• infestation par d'autres espèces	Données censurées (jour de l'infestation)	Exclusion de l'analyse
• PCR indéterminée ou manquante	Exclusion de l'analyse	Exclusion de l'analyse
Participant perdu de vue	Données censurées le dernier jour du suivi, selon le calendrier	Exclusion de l'analyse
Retrait ou non-respect du protocole	Données censurées le dernier jour du suivi, selon le calendrier, avant le retrait ou le non-respect du protocole	Exclusion de l'analyse

* OMS. *Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2008 (http://www.who.int/malaria/resistance).

Annexe 8 : Formulaire de consentement

La présente note d'information est destinée aux parents / tuteurs d'enfants âgés de 6 mois à 14 ans (consentement) qui viennent en consultation au centre de santé et ont été invités à participer à une étude visant à évaluer l'efficacité de l' association médicamenteuse fixe arteméther /luméfantrine pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué.

Nom de l'investigateur principal : Yves Éric DENON

Nom de l'organisation: Programme National de Lutte contre le Paludisme

Nom du promoteur : Ministère de la Santé

Intitulé de la proposition et de la version : Efficacité et innocuité de l'artéméther-luméfantrine pour le traitement du paludisme à Plasmodium falciparum non compliqué à Cotonou

Le formulaire du consentement éclairé comporte deux parties :

I. Information générale (ayant pour objet de vous communiquer des informations sur l'étude menée)

II. Certificat de consentement/ (à signer, si vous acceptez de participer à l'étude)

Il vous sera remis un exemplaire du formulaire intégral de consentement éclairé

Note d'information et consentement éclaire

I. Note d'information aux parents ou tuteurs d'enfants de 0 à 12 ans

Je m'appelle Yves Eric DENON et je travaille pour le Ministère de la Santé. Je mène actuellement une étude sur le traitement du paludisme. Le paludisme est une maladie dangereuse, qui peut toutefois être traitée par des médicaments.

J'invite tous les parents ou tuteurs d'enfants âgés de 6 mois à 14 ans qui habitent dans la région à participer à cette étude.

Je vais vous donner des informations en vous invitant à accepter que votre enfant participe à l'étude. Avant de prendre votre décision, vous pouvez parler avec toute personne avec laquelle vous vous sentez à l'aise. Certains mots vous paraîtront peut-être difficiles à comprendre. N'hésitez pas à m'interrompre pendant la présentation et je prendrai le temps de vous donner des explications. Si vous avez d'autres questions ultérieurement, vous pourrez me les poser ou demander au docteur chargé de l'étude ou au personnel.

Votre participation à l'étude est entièrement volontaire. C'est votre choix personnel de faire participer ou non votre enfant. Que vous choisissiez de faire participer ou non votre enfant, il continuera à bénéficier de tous les services du centre de santé et rien ne va changer.

Vous disposerez de 24h pour donner votre avis.

En cas d'incommodité, nous analyserons avec vous et retiendrons la solution qui vous arrange.

Même si vous donnez votre consentement aujourd'hui vous pouvez décider ultérieurement de changer d'avis et de retirer votre enfant.

Avant que l'étude ne soit rendue publique, nous vous communiquerons les connaissances que nous aurons obtenues. De petites réunions seront organisées dans la communauté ; elles seront annoncées à l'avance. Par la suite, nous publierons les résultats et les ferons connaître, de façon que toute autre personne intéressée puisse en tirer des enseignements.

But

Le but de l'étude est de confirmer que le médicament, qui se nomme artemether luméfantrine, est toujours efficace pour soigner le paludisme.

Objectif

Evaluer l'efficacité et l'innocuité de l'arteméther-luméfantrine pour le traitement des infestations par *P. falciparum* non compliquées à Cotonou.

Méthode

L'étude durera 28 jours. Pendant cette période, votre enfant devra venir au centre de santé une heure par jour, pendant 7 jours suivant le calendrier qui vous sera remis. Au bout de 4 semaines, l'étude sera terminée. A chaque consultation, un médecin examinera votre enfant. Vous pourrez rester avec lui pendant chacune des consultations et pendant le déroulement des tests.

Aujourd'hui, un prélèvement de sang sera effectué et votre enfant recevra la première dose de traitement.

- A la 2e consultation, votre enfant recevra la deuxième dose de traitement.
- A la 3e consultation, votre enfant recevra la troisième dose de traitement et un prélèvement sanguin sera effectué.
- Aux 4e, 5e, 6e, 7e, 8e consultations, un prélèvement de sang sera effectué.

Le traitement sera effectué comme indiqué dans le tableau en annexe 1.

Pour le test sanguin, une goutte de sang sera prélevée au bout du doigt ou au talon. Il ressentira une légère douleur ou aura peut-être une légère appréhension lorsque l'on lui piquera le doigt ou le talon. La douleur devrait disparaître en une journée. Le sang sera recueilli sur une lame et un petit morceau de papier.

Les prélèvements sanguins seront utilisés pour étudier le paludisme dans le sang de votre enfant. L'examen des prélèvements sera réalisé après l'étude et n'aura pas d'incidence sur la réussite du traitement. Le sang servira uniquement à cela. Si vous ne venez pas aux visites prévues, nous nous rendrons à votre domicile.

Confidentialité

Nous ne communiquerons à personne l'identité des participants participant à l'étude. Les informations que nous recueillons dans le cadre de l'étude resteront confidentielles. Toute information concernant votre enfant sera accompagnée non pas de son nom, mais d'un numéro. Seuls les membres de l'équipe de recherche sauront quel est ce numéro, et cette information ne sera pas accessible.

Conflit d'intérêt

Pour éviter des conflits d'intérêt avec le personnel soignant du centre de santé, une équipe indépendante d'agents de santé s'occupera de votre suivi des que vous êtes enrôlés dans l'étude.

Bénéfices

Votre enfant est bien suivi et traité gratuitement pendant la durée de l'étude et pourra être pris en compte pour toutes préoccupations liées à la maladie. Si vous décidez que votre enfant participera à l'étude, toutes les maladies liées au paludisme ou au traitement antipaludique seront traitées gratuitement. Vos frais de déplacements seront remboursés pour vous éviter des charges complémentaires.

Risques

Vous devez savoir que le médicament Artemether Luméfantrine a quelques effets secondaires mineurs : fatigue, maux de tête, de ventre et la fatigue.

Le médicament dit « de secours », appellé quinine a quelques effets secondaires mineurs : bourdonnement, vomissement et maux de tête…

Comme indiqué, le médicament peut avoir certains effets indésirables mineurs. Il est aussi possible qu'il provoque des problèmes inattendus ; toutefois, nous suivrons votre enfant étroitement et surveillerons ces effets, s'il y a lieu, ainsi que tout autre problème. Nous vous

donnerons un numéro de téléphone où vous pourrez nous joindre si vous remarquez quelque chose d'inhabituel ou si vous avez des préoccupations ou des questions.

Avantages

Pour l'enfant : votre enfant recevra Six doses de médicaments sur 3 jours. Le médicament artemether luméfantrine est recommandé par le Ministère de la Santé. Comme les parasites qui causent le paludisme peuvent devenir résistants au médicament, le Ministère mène des études de façon régulière pour vérifier qu'il conserve son efficacité. Il est fabriqué par Novartis, sous le nom commercial COARTEM. On sait qu'il est très efficace,

Si nous constatons que le médicament n'est plus efficace, nous utiliserons un médicament dit « de secours ». Il s'appelle Quinine comprimés et est administré sur sept jours.

Vous pourrez également amener votre enfant au centre de santé à n'importe quel moment et demander à voir le Docteur ou l'infirmier. Si votre enfant a des effets secondaires, nous pourrons utiliser un autre médicament, qui sera gratuit et aidera à réduire les symptômes ou les réactions, ou nous pourrons interrompre l'un des médicaments ou plusieurs d'entre eux. Si cela est nécessaire, nous en discuterons ensemble. Vous serez toujours consulté avant de passer à l'étape suivante.

Pour le promoteur (Ministère de la santé) : La participation de votre enfant nous aidera à vérifier que le médicament est toujours efficace, ce qui sera utile à la société et aux générations futures. Cette étude permettra au Ministère de la Santé d'assurer la prise en charge adéquate du paludisme pour toute la population béninoise.

Contacts

Si vous souhaitez des informations supplémentaires sur l'étude, vous pouvez joindre le Programme National de Lutte contre le Paludisme, le Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé (CNERS) ou l'Investigateur Principal aux numéros de téléphone +229 21333930 au numéro +229 95051564

A la fin de l'étude, une copie du résultat sera remise à chacune des structures ci après :

- **Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé (CNERS)**
- **Direction de la Recherche et de la Formation (DRF)**
- **Service de Gestion du Système d'Information (SGSI)**

Protection des données

La présente proposition a été examinée et approuvée par la commission d'éthique du Ministère de la Santé et de l'OMS. Cette commission a pour tâche de vérifier que les

participants à l'étude bénéficient d'une protection. Les informations confidentielles ne seront pas communiquées.

Mesures de prévention

A la fin de l'étude, on vous donnera une moustiquaire pour votre enfant. Vous veillerez à ce qu'il dorme sous la MIILD chaque jour, ainsi il fera moins de paludisme.

II. Formulaire de consentement pour le parent ou tuteur d'enfant de 0 à 14 ans

J'ai été invité à faire participer mon enfant à une étude portant sur un médicament utilisé pour traiter le paludisme.

J'ai lu les informations qui précèdent ou elles m'ont été lues. J'ai eu l'occasion de poser des questions et il a été répondu de façon satisfaisante à toutes les questions que j'ai posées. Je consens librement à ce que mon enfant participe à l'étude.

Nom du participant : _____

Nom du père ou de la mère, ou du tuteur : _____

Signature du père ou de la mère, ou du tuteur :_____

Date : _____

(jour/mois/année)

Signature du témoin : (La signature d'un témoin et l'empreinte digitale du père ou de la mère du participant, ou de son tuteur, ne sont nécessaires que si ces derniers ne savent pas lire et écrire. Dans ce cas, le certificat doit être signé par un témoin sachant lire et écrire. Si cela est possible, cette personne devrait être choisie par le père ou la mère du participant, ou son tuteur, et ne devrait avoir aucun lien avec l'équipe de recherche.)

J'atteste que le formulaire de consentement a été lu fidèlement au père ou à la mère du participant potentiel, ou à son tuteur, qui ont eu la possibilité de poser des questions. Je confirme qu'ils ont donné leur libre consentement.

Nom du témoin : _____ et empreinte digitale du père ou de la mère/du tuteur :

Signature du témoin : _____

Date : _____

(jour/mois/année)



Signature de l'investigateur :

J’ai lu fidèlement le formulaire de consentement au père ou à la mère du participant potentiel, ou à son tuteur, ou atteste que le texte de ce formulaire leur a été lu fidèlement et qu’ils ont eu la possibilité de poser des questions. Je confirme qu’ils ont donné leur libre consentement.

Nom de l’investigateur : Yves Eric DENON

Signature de l’investigateur :_____ Hleuuif

Date : _____

(jour/mois/année)

Une copie du présent formulaire de consentement éclairé a été remise au père ou à la mère du participant, ou à son tuteur. _____ (paraphe de l’investigateur principal/de l’assistant).

Un formulaire d’assentiment sera _____ ou ne sera pas _____ complété.

Annexe 9: Fiche de consentement éclairé

Je soussigné(e) :……Père (ou mère) de :…….…….

Profession :……..…….Adresse :……..

Quartier :……..…….Maison :……..…….

Téléphone :……..

Personne à contacter en cas de besoin :…….

Accepte volontairement que mon enfant adhère à la recherche sur le paludisme initiée par l'équipe du Docteur Dorothée KINDE GAZARD, Professeur Agrégé de Parasitologie à la Faculté des Sciences de la Santé de l'UAC et responsable adjointe de l'Unité d'Enseignement et de Recherche en Parasitologie-Mycologie. Il s'agit d'une recherche dont l'objectif est de caractériser les populations de *Plasmodium falciparum* rencontrées dans le département du Littoral. Mon enfant bénéficiera de bilans biologiques gratuits à partir de prélèvement sanguin et de traitement médical adéquat. Sa participation est volontaire et l'anonymat m'est garanti. Je peux le retirer de l'étude à tout moment si je le souhaite.

Par conséquent, je signe la présente fiche pour notifier ma volonté de lui permettre de participer à l'étude et j'autorise l'équipe de recherche à utiliser les renseignements ci-dessous dans le cadre strict desdits travaux.

……..le……2010

Signature du représentant

Annexe 10: L'alphabet des acides aminés; codes à une et trois lettres

Code 3 lettres	Code 1 lettre	Acides aminés	Code 3 lettres	Code 1 lettre	Acides aminés
Phe	F	Phénylalanine	Ile	I	Isoleucine
Leu	L	Leucine	Ser	S	Sérine
Tyr	Y	Tyrosine	Cys	C	Cystéine
Thr	T	Thréonine	Asn	N	Asparagine
Lys	K	Lysine	Trp	W	Tryptophane
Val	V	Valine	Pro	P	Proline
His	H	Histidine	Gln	Q	Glutamine
Arg	R	Arginine	Met	M	Méthionine
Ala	A	Alanine	Gly	G	Glycine
Glu	E	Acide Glutamique	Asp	D	Acide aspartique

CAMPAGNE MIILD

Annexe 11: Comparaison de possession de MII parmi les ménages avec ou sans enfants de moins de 5 ans après la campagne gratuite de juillet 2011

	% de ménages possédant au moins une MII parmi les ménages sans enfant de moins de 5 ans			% de ménages possédant au moins une MII parmi les ménages avec au moins un enfant de moins de 5 ans		
Département	**%**	**IC inf.(%)**	**IC sup.(%)**	**%**	**IC inf.(%)**	**IC sup.(%)**
Atacora	99	97,84	99,91	100	100,0	100,0
Donga	91	88,61	94,12	94	91,5	96,2
Alibori	92	89,57	94,83	99	97,8	99,9
Borgou	89	86,36	92,39	97	95,4	98,7
Collines	94	91,63	96,29	98	96,6	99,4
Zou	87	84,01	90,54	93	90,2	95,3
Mono	88	84,44	90,89	97	95,5	98,8
Couffo	94	91,30	96,07	97	95,2	98,6
Ouémé	96	94,53	98,20	97	95,6	98,8
Plateau	89	86,04	92,15	96	93,5	97,5
Atlantique	97	95,89	98,98	98	97,0	99,6
Littoral	92	89,63	94,87	95	92,3	96,8
Total	**92**	**91,24**	**92,78**	**97**	**96,2**	**97,2**
Milieu de résidence						
Rurale	93	92,19	94,01	97	96,6	97,8
Urbaine	90	88,72	91,47	96	95,0	96,8

Annexe 12: Proportion des personnes informées de la campagne MIILD 2011 selon le canal, par département et par Milieu de résidence

Département	ND	Radio	Télévision	Crieurs publics	Chefs religieux/ traditionnel	Relais communautaire	Chef traditionnel	Agents de santé	Autres
					%				
Donga	3	21	0	59	1	11	1	4	4
Ouémé	3	13	4	61	0	16	0	5	2
Alibori	1	20	12	9	11	23	5	6	14
Atacora	1	13	4	52	1	19	0	8	4
Atlantique	2	7	0	59	0	1	0	30	2
Borgou	1	10	0	74	0	7	1	4	4
Collines	9	14	1	48	0	28	0	4	5
Couffo	4	11	0	68	1	9	1	8	3
Littoral	3	18	3	56	2	2	0	10	9
Mono	2	7	3	36	1	40	0	10	3
Plateau	1	7	7	38	1	38	0	6	3
Zou	3	6	6	46	0	0	0	29	13
Total	**3**	**12**	**3**	**50**	**2**	**16**	**1**	**10**	**5**

Annexe 13 : Caractéristiques des femmes enceintes au sein des ménages enquêtés par département et par milieu de résidence ; campagne 2011

	% de ménages avec au moins une femme enceinte				Nombre moyen femme enceinte par ménage		
Départements	**effectifs**	**%**	**Inc. Inf(%)**	**Inc. Sup(%)**	**effectif**	**Inc. Inf(%)**	**InC.Sup(%)**
Atacora	39	10	6,84	12,66	0,1	0,08	0,16
Donga	50	13	9,26	15,74	0,1	0,11	0,18
Alibori	54	14	10,15	16,85	0,1	0,10	0,17
Borgou	74	19	14,69	22,31	0,2	0,18	0,29
Collines	68	17	13,32	20,68	0,2	0,15	0,23
Zou	48	12	8,82	15,18	0,1	0,07	0,17
Mono	55	14	10,38	17,12	0,1	0,10	0,18
Couffo	72	18	14,23	21,77	0,2	0,18	0,28
Ouémé	50	13	9,26	15,74	0,1	0,10	0,17
Plateau	40	10	7,06	12,94	0,1	0,07	0,14
Atlantique	60	15	11,50	18,50	0,2	0,14	0,20
Littoral	42	11	7,50	13,50	0,2	0,13	0,20
Total	**652**	**14**	**12,61**	**14,55**	**0,2**	**0,14**	**0,17**

Annexe 14: Répartition des ménages couverts en MIILD par département et par milieu de résidence

Département	Ménages qui ont reçu au moins une MIILD pendant la campagne de 2011				Ménages qui ont reçu leur 1ère MIILD pendant la campagne de 2011			
	Effectif	%	IC inf.(%)	IC sup.(%)	Effectif	%	IC inf.(%)	IC sup.(%)
Atacora	375	94	91,4	96,1	338	85	80,95	88,05
Donga	379	95	92,6	96,9	259	65	60,07	69,43
Alibori	357	89	86,2	92,3	223	56	50,88	60,62
Borgou	358	90	86,5	92,5	187	47	41,86	51,64
Collines	369	92	89,6	94,9	152	38	33,24	42,76
Zou	345	86	82,9	89,6	185	46	41,36	51,14
Mono	317	79	75,3	83,2	193	48	43,35	53,15
Couffo	354	89	85,4	91,6	266	67	61,87	71,13
Ouémé	307	77	72,6	80,9	153	38	33,49	43,01
Plateau	342	86	82,0	89,0	245	61	56,48	66,02
Atlantique	348	87	83,7	90,3	152	38	33,24	42,76
Littoral	296	74	69,7	78,3	84	21	17,01	24,99
Total	**4147**	**86**	**85,4**	**87,4**	**2437**	**51**	**49,36**	**52,19**
Milieu de résidence								
Rurale	2691	90	88,89	91,05	1647	55	53,28	56,85
Urbaine	1456	81	78,66	82,31	790	44	41,38	45,96

Annexe 15: Indicateurs de couverture universelle par milieu de résidence et par département après la campagne de juillet 2011

Département	% de ménages possédant au moins une MII après la campagne de 2011			% de ménages disposant au moins une MII pour deux membres après la campagne de 2011		
	%	IC inf.(%)	IC sup.(%)	%	IC inf.(%)	IC sup.(%)
Atacora	93	90,5	95,5	71	66,0	75,0
Donga	97	95,0	98,5	71	66,0	75,0
Alibori	97	94,7	98,3	70	65,5	74,5
Borgou	90	86,5	92,5	68	63,2	72,3
Collines	92	89,6	94,9	80	76,1	83,9
Zou	94	91,7	96,3	68	63,4	72,6
Mono	97	94,7	98,3	63	57,8	67,2
Couffo	93	90,2	95,3	57	51,6	61,4
Ouémé	94	91,4	96,1	62	57,0	66,5
Plateau	94	91,1	95,9	68	62,9	72,1
Atlantique	94	91,4	96,1	66	61,6	70,9
Littoral	91	87,9	93,6	69	63,9	73,1
Total	**94**	**92,9**	**94,3**	**67**	**66,2**	**68,8**
Milieu de résidence						
Rural	95	93,9	95,5	69,5	67,8	71,1
Urbain	92	90,5	93,0	64,2	62,0	66,4

Annexe 16 : Utilisation de MII par les groupes vulnérables par département, suivant les milieux de résidence, après la campagne de juillet 2011

Département	% de femmes enceintes ayant dormi sous MII la nuit précédente le jour d'enquête			% d'enfants de 0 à 59 mois ayant dormi sous MII la nuit précédente le jour d'enquête		
	%	IC inf.(%)	IC sup.(%)	%	IC inf.(%)	IC sup.'%)
Atacora	94	91,80	96,40	97	95,70	98,40
Donga	65	60,60	70,00	93	90,80	95,00
Alibori	65	60,10	69,50	97	96,00	98,60
Borgou	92	89,00	94,40	95	93,30	96,80
Collines	89	86,00	92,10	94	92,00	95,90
Zou	98	96,30	99,20	94	92,30	96,10
Mono	88	84,90	91,30	91	88,90	93,60
Couffo	79	75,30	83,20	88	85,60	91,00
Ouémé	80	76,50	84,30	94	91,60	95,60
Plateau	86	83,00	89,70	92	89,90	94,30
Atlantique	93	90,30	95,40	98	97,10	99,20
Littoral	89	85,80	92,00	78	74,00	81,00
Total	**85**	**84,10**	**86,10**	**93**	**91,90**	**93,10**
Milieu de résidence						
Rurale	83	81,60	84,30	93	91,80	93,30
Urbaine	90	88,30	91,10	93	91,50	93,50

Annexe 17 : Outils de collecte

FICHE N° 1 : ENQUETE DE COUVERTURE EN MIILD /CAMPAGNE JUILLET 2011

Département _____ Commune_____ Grappe : _____ Localité(s): _____

Date _____ Enquêteurs: _____ Contrôleur :

Milieu urbain : Milieu rural :

1 N°Ménage	2 Sexe chef ménage M/F M=1 F= 2	3 Age chef ménage en année	4 Etiez-vous informé de la campagne MIILD ? Oui=1 Non=2	5 Si oui, Comment avez-vous été informé? *(inscrire N°de la liste[2])*	6 Le ménage a- il reçu de coupon pour MIILD ? Oui=1 Non=2	7 Le ménage a-t-il reçu de MIILD gratuitement lors de la dernière campagne de juillet 2011? Oui =1 Non=2 Ne sait pas =3 (si Non passer à Q9	8 Q7 =1 Quel est le nombre de MIILD reçu durant la campagne de juillet 2011 par votre ménage?	9 Quel est le nombre total de personnes vivant dans le ménage au moment de l'enquête ?	10 Combien de moustiquaires votre ménage possède-t il au total au moment de l'enquête?	11 Combien de personnes du ménage ont dormi sous MI la nuit dernière?	12 Nombre d'enfants de 0-59 mois vivant dans ce ménage (y compris les non résidants habituels)	13 Nombre d'enfants de 0-59 mois vivant dans ce ménage qui ont dormi sous MIILD la nuit dernière ?	14 Nombre de femmes en âge de procréer (15 à 49 ans) dans ce ménage au moment de l'enquête?	15 Nombre de femmes enceintes vivant dans ce ménage ?	16 Nombre de femmes enceintes vivant dans ce ménage qui ont dormi sous MIILD la nuit dernière ?
1 ____															
2 ____															
3____															
4____															
5____															
6____															
7____															
8____															
9.____															
10.____															

[3]Radio =1, Télévision=2, Crieur public 3 ; Chef religieux=4 relais communautaire =5 ; Chef traditionnel=6 ; Agent de santé=7 ; Autres=8

FICHE N°2: RAISONS DE NON POSSESSION DES MIILD DANS CERTAINS MENAGES

Department : **N°Grappe** :
Commune : **Arrondissement :** **Village/Hameau/Quartier :**
Milieu urbain : **Milieu rural :**

		Ménage N°	**Ménage N°**	**Ménage N°**	**Ménage N°**	**Ménage N°**
Q1 - N° du ménage?						
Q2 - Nom du chef de ménage ou son représentant ?						
Q3 – niveau d'instruction?						
Q4 - Pourquoi votre ménage n'a pas reçu de MIILD au cours de la campagne de juillet 2011? (***Posez seulement la Q4 et cochez dans la case correspondante la raison évoquée par le chef ménage ou son représentant)***						
Insuffisance de communication	1. Ignore la nécessité de dormir sous MI					
	2. Ignore le lieu ou l'heure de la séance de distribution					
	3. Membres du ménage non informés					
Insuffisance de motivation	4. Distribution reportée à une autre date					
	4. Ne fait pas confiance à l'utilisation des MIILD					
	6. Rumeurs					
	7. Distributeurs partis au moment où je me suis présenté					
Contraintes	8. N'a pas reçu de coupon					
	8. Éloignement du site de distribution					
	9. Période de distribution ne convient pas					
	10. Mauvais accueil					
	11. Chef ménage ou représentant trop occupé					
	12. Attente trop longue					
Autres (préciser)						

FICHE N° 3 : ENQUETE AUPRES DES SERVICES DE SANTE (Chef Poste du CS)

Département : _____ Commune : _____ Date ___/___/___
Nom de la structure : _____
Profession personne interviewée : _____ Enquêteur _____

Eléments à apprécier	Réponse (à encercler)	
	1 = Oui	2 = Non
1. Les différents intrants ont-ils été reçus en quantité suffisante selon les besoins exprimés ?		
a. Coupons	1	2
b. Registres de recensement des ménages	1	2
c. MIILD	1	2
2. Y a t-il eu des problèmes dans la distribution des MIILD et autres intrants ?	1	2
2.1 Si oui, citez les principaux problèmes rencontrés		
a. Rupture de stock	1	2
b. Défaut de moyens de transport	1	2
c. Inaccessibilité géographique	1	2
d. Autres à préciser	1	2
3. Le financement de la campagne a-t-il été disponible à temps (au moins 7jours avant la campagne au niveau des CS) pour :		
a. Mobilisation sociale ?	1	2
b. Formation des distributeurs ?	1	2
c. Paiement des Agents volontaires et superviseurs ?	1	2
d. Transport ?	1	2
4. Le financement disponible était-il conforme au budget prévu pour la campagne:		
a. Mobilisation sociale ?	1	2
b. Formation ?	1	2
c. Paiement des agents volontaires et superviseurs ?	1	2
d. Transport ?	1	2

Eléments à apprécier	Réponse (à encercler)	
	1 = Oui	2 = Non
5. Quelles activités avez-vous menées dans le cadre de la mobilisation sociale		
a. Plaidoyer / leader communautaire	1	2
b. Information/sensibilisation des groupes à risque	1	2
c. Diffusion de message radio	1	2
d. Diffusion de message (affiches, banderoles, etc.)	1	2
e. Diffusion de message par les relais communautaire	1	2
f. Autres	1	2
6. Avez-vous utilisé des radios de proximité lors de la campagne MIILD ?	1	2
7. Selon vous, quelles sont les 3 principales raisons pour lesquelles certains ménages n'ont pas été en possession de MIILD au cours de la campagne ? (plusieurs réponses sont possibles)		
a. Absence du chef de ménage ou son représentant pendant la campagne	1	2
b. Non information	1	2
c. Inaccessibilité géographique	1	2
d. Rupture de stock de MIILD	1	2
e. Rupture de coupon		
f. Autres	1	2
8. Selon vous quelles sont les principales sources d'information sur la campagne MIILD au niveau de la population ?		
a. Crieur public	1	2
b. Média (radio, télé)	1	2
c. Agent de santé	1	2
d. Relais communautaire	1	2
e. Autres	1	2
9. Y a t-il des zones de votre aire sanitaire qui n'ont pas été suffisamment couvertes selon vous ?	1	2
10. Avez-vous calculé votre couverture pour la campagne MIILD ?	1	2
11. Reporter la couverture calculée (à partir d'un document)	/_____%	
12. Quelle quantité de MIILD est restée après la campagne dans la structure ?	/_____ /	
13. Qu'avez-vous fait des restes de MIILD après la campagne (cocher une seule réponse)	1	2

Eléments à apprécier	Réponse (à encercler)	
	1 = Oui	2 = Non
a. Pas eu de restant		
b. Collecté par le niveau hiérarchique		
c. Utilisé pendant (CPN ; VAR)		
d. Toujours dans le centre et non utilisé		
e. Autres		
14. Quelles sont vos suggestions pour améliorer les prochaines campagnes MIILD:		
14.1 La micro planification		
14.2 La mise en place des ressources		
14.3 la communication ?		
14.4 la destruction des déchets ?		

Annexe 18: Fiche d'enquête

La personne a-t-elle été traitée pour un accès palustre dans les 15 derniers jours ?

OUI >EXCLUSION NON>INCLUSION

Date : / ____ / _____ / Echantillon n° :

NOM de la personne remplissant le questionnaire :

IDENTIFICATION :

NOM et PRENOM : _____

Age _____ans /—/ Sexe : F /—/ M

Nationalité: /—/ Béninoise /—/ autre_____

HISTORIQUE DU PALUDISME:

Motif de consultation :_____

T° axillaire ou anale à préciser: ° C

Depuis quand avez-vous de la fièvre : nombre de jour? /—/ OUI /—/ NON

Si oui, quel(s) médicament(s) ?_____

A quelle date ?_____

Prenez vous une prophylaxie anti palustre ? /—/ OUI /—/ NON

Si oui, quel médicament à quelle posologie ?_____

Dormez-vous sous moustiquaire imprégnée? /—/ OUI /—/ NON

Diagnostic retenu : paludisme Autres affections

RESULTATS BIOLOGIQUES

Résultat : FS /—/ POSITIF /—/ NEGATIF

Résultat : GE /—/ POSITIVE /—/ NEGATIVE

Densité parasitaire :_____

Déterminée sur : /—/ GE /—/ FS

Espèce(s) plasmodiale(s) :_____

Présence de gamétocytes : /—/ OUI /—/ NON

Test au cyscope® : /—/ POSITIF /—/ NEGATIF

TDR (HRP-2)/ (pan,pLDH) : /—/ POSITIF /—/ NEGATIF

Annexe 19 : Microscope à immunofluorescence Cyscope



Figure 15*:* Microscope fluorescente (Cyscope®) branchée à un ordinateur portable et lames pré-fixées

Source : www.partec.com

Annexe 20 : Etapes de réalisation d'une lame du microscope Cyscope®



Figure 16 : Etapes de réalisation d'une lame du microscope Cyscope®

Source : www.partec.com

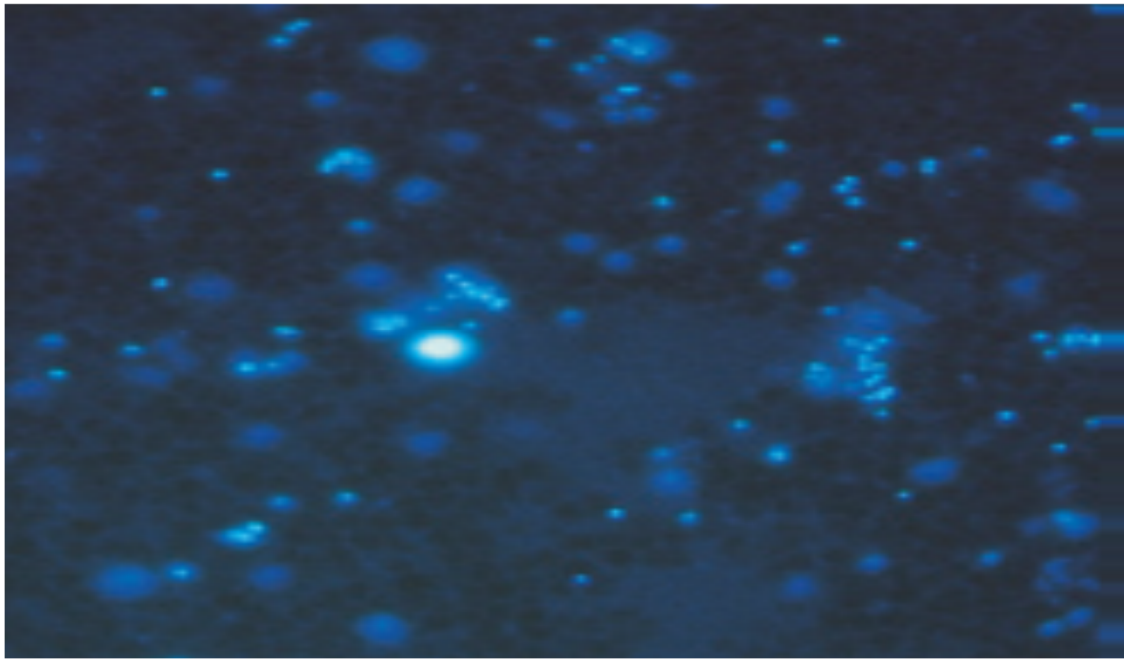


Photo 10 : Image d'une lame positive au Cyscope®

Annexe : Matériels pour l'étude des marqueurs moléculaires de la résistance du Plasmodium à la chloroquine et à la sulfadoxine pyrimethamine

	Prélèvement veineux	**GE/DP**	**Confettis**	**Extraction de l'ADN**	**PCR**	
Consommables	- Gants à usage unique - Garrot - Coton hydrophile - Alcool a 70° - Portoirs pour tubes - Tubes EDTA de prélèvement - Aiguilles + seringues de 5 mL - Sparadrap 18cm*5m	- Gants à usage unique - Lames portes objets - Lamelles - Compresses stériles - Bac de coloration - Boites oms de conservation de lames - Râteliers - Eau distillée	- Gants à usage unique - Micropipettes de 5-100 µL - Pointes filtres de 50 µL - Papier filtre - Sacs plastiques individuels avec silicagel	- Gants à usage unique - Micropipettes de 5-100 µL - Pipettes de 10mL - Pointes filtres de 50 µL et de 1000 µL - Tubes Eppendorf de 1.5 mL - Chronomètres - Eau Bio-mol	- Gants à usage unique - Barrettes - Pointes filtres - Pointes non filtres - Filtres stériles - Papiers pour pont électrique - Micropipettes de 5-100µL - Films pour PCR - Tubes à PCR	- Eau Biomol - Agarose - Tampon TBE - Ethidium bromide - DNA ladder
Réact ifs		- Solution de giemsa à 3 % et à 10%		- Chelex 20% - Saponine 1% - Tampon PBS 1X	- Amorces - Enzymes de restriction	- Taq Polymérase - dNTPs
Appareils		- Microscopes optiques		- Appareil à Bain-marie - Bloc chauffant	- Thermocycleur - Amplificateur - Générateur + cuve de migration - Table à lumière UV	- Hotte à PCR - Bain à sec numérique - Plaque chauffante - Centrifugeuse réfrigérée

TABLE DES MATIERES

Pages

Dédicaces……..……1
Remerciements……...…....2
Sommaire……..…….….3
Liste des figures……..…....5
Liste des photographies…….....6
Liste des graphiques……..…..…7
Liste des tableaux……....9
Liste des annexes…….....13
Sigles et acronymes……...14
Résumé……..17
Abstract…….……....19

Introduction générale…….....21
1.Contexte et justification…….....22
Figure 1 : Nombre de cas confirmés en 2010 …….....…….22
2.Enoncé du problème…….....…24
3.Hypothèses de recherche…….....25
4.Objectifs de la recherche…….....…....26
5.Plan de thèse…….....….....27
6.Cadre d'étude…….....….....28

Chapitre 1 : Généralités sur le paludisme……32
1.1 Définition de concepts…….....33
1.2 Historique de la maladie……..34
1. 3 Epidémiologie ……35
1.3.1 L'agent pathogène ……35
1.3.2L'agent vecteur ……..….....36
1.3.3 Cycle évolutif du paludisme…….....36

1.3.3.1 Cycle schizogonique chez l'homme…….....36
1.3.3.2 Cycle sporogonique chez l'anophèle femelle…….....37
1.3.4 Répartition géographique du paludisme …….....38
1.3.5 Les faciès épidémiologiques…….....39
1.3.6 Ethiopathogénie…….....…39
1.4 Diagnostic du paludisme …….....….39
1.4.1 Manifestations cliniques du paludisme …….....…….39
1.4.1.1 Paludisme simple…….....39
1.4.1.2 Paludisme grave…….....40
1.4.2 Diagnostic biologique…….....….40
1.4.2.1Examens d'orientation…….....……40
1.4.2.2 Examen de confirmation…….....……40
1.5 Traitement du paludisme…….....43
1.5.1 Paludisme simple à *Plasmodium falciparum*…….....43
1.5.1.1 Définition…….....…...43
1.5.1.2 Objectifs thérapeutiques…….....……..43
1.5.1.3 Recommandations thérapeutiques…….....……..43
1.5.1.4 Traitement des cas particuliers…….....…...43
1.5.1.5 Gestion des cas d'échec thérapeutique…….....…….44
1.5.2 Paludisme grave à *Plasmodium falciparum*…….....44
1.5.2.1 Définition…….....….44
1.5.2.2 Objectifs thérapeutiques…….....……...44
1.5.2.3 Recommandations thérapeutiques…….....……..45
1.5.2.4 Traitement d'urgence des signes de gravité et des complications ….....……...45
1.6 Les molécules antipaludiques…….....45
1.6.1 Classification…….....….45
1.7Protocoles de prévention antipaludique…….....……....46
1.7.1 La prévention médicamenteuse…….....……...46
1.7.2 La lutte anti-vectorielle intégrée et la prévention mécanique…….....46
1.7.3 Prévention vaccinale…….....….46
1.8 La chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques……...……47

1.8.1 Définition de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques.....47
1.8.2 Chimiorésistance au Bénin…….....…47
1.8.3 Etude de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques…….....….47
1.8.3.1 Tests in vitro …….....……..47
1.8.3.2 Dosage sanguin de médicaments …….....…….48
1.8.3.3 Tests in vivo …….....……48
1.8.3.4 Techniques moléculaires …….....…48
1.8.4 Facteurs d'apparition et d'extension des résistances…….....…51
1.8.4.1 Facteurs liés à l'homme …….....….51
1.8.4.2 Facteurs liés au parasite …….....……..52
1.8.4.3 Facteurs liés au vecteur et à l'environnement …….....……52
1.8.4.4 Facteurs liés aux antipaludiques …….....…….52
1.8.5 Génome du *Plasmodium falciparum* …….....…….52
1.8.6 Mécanismes de résistance du *Plasmodium* aux amino-4-quinoleïnes …..……53
1.8.7 Bases moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine…….....….55
1.8.7.1 Cibles thérapeutiques : DHFR et DHPS…….....……55
1.8.7.2 Mécanisme d'action de la sulfadoxine-pyriméthamine…….....…….56
1.8.7.3 Mécanismes de résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine …….....57
1.9 La gestion des déchets médicaux…….....57
1.9.1 Définition et caractérisation des déchets médicaux…….....……..57
1.9.2 Production des déchets médicaux issus de la lutte contre le paludisme…….....58

Première partie : la prise en charge du paludisme…….....60
Chapitre 2 : évaluation de l'efficacité thérapeutique de artemether luméfantrine dans les cas de paludisme simple…….....….....61
2.1 Matériels et méthodes…….....62
2.1.1 Conception de l'étude…….....…….....63

2.1.2 Population visée par l'étude…….....…..63
2.1.3 Date et durée de l'étude…….....63
2.1.4 Matériels utilisés pour l'étude…….....63
2.1.5 Critères d'inclusion et d'exclusion des patients…….....……..65
2.1.6 Traitement des cas de paludisme…….....67
2.1.7 Critères d'évaluation…….....69
2.1.7.1 Evaluation de l'efficacité et de l'innocuité…….....….70
2.1.7.2 Evaluations clinique et biologique…….....70
2.1.8 Collecte et traitement des données…….....…74
2.2 Résultats…….....75
2.2.1 Description de la population d'étude…….....……...76
2.2.2 Répartitions des enfants en fonction du sexe…….....….76
2.2.3 Répartitions des enfants en fonction de l'âge…….....….77
2.2.4 Répartitions des enfants en fonction des ethnies…….....……77
2.2.5 Cas de paludisme…….....……78
2.2.6 Paludisme en fonction du sexe…….....78
2.2.7 Le statut des enfants en fonction de la classe d'âge…….....……..79
2.2.8 Apyrexie chez les patients traités par artemether luméfantrine ……..….....79
2.2.9 La clairance parasitaire…….....……79
2.2.10 Efficacité et innocuité de artemether lumefantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection…….....80
Tableau X: Efficacité thérapeutique de artemether lumefantrine dans un cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection…….....80
2.2.11 Innocuité de artemether lumefantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* associé ou non à une autre affection…….....80
2.3 Discussion…….....81
2.3.1 De l'intérêt de l'étude…….....82
2.3.2 De la Prévalence du paludisme…….....……82
2.3.3 De la clairance parasitaire…….....…..83
2.3.4 De l'apyrexie chez les patients traités à artemetherlLuméfantrine …….....83
2.3.5 De l'efficacité et l'innocuité …….....83

2.3.6 Innocuité d'artemether luméfantrine dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* …….....……..85
Chapitre 3 : évaluation de la prise en charge gratuite des cas de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et la femme enceintes ….....86
3.1 Matériels et méthodes…….....87
3.1.1 Type et durée de l'étude…….....……88
3.1.2 Cibles de l'étude…….....……88
3.1.3 Echantillonnage …….....….89
3.1.4 Techniques et outils de collecte des données…….....89
3.1.5 Traitement et analyse des données…….....…..90
3.1.6 Dispositions éthiques …….....90
3.2 Résultats…….....….91
3.2.1 Centres de santé objet de l'évaluation…….....…92
3.2.2 Effectivité de la mise en œuvre de la gratuité …….....…….92
3.2.3 Respect des directives de la prise en charge des cas…….....….93
3.2.4 Disponibilité des intrants…….....…….94
3.2.5 Effectivité de la prise en charge gratuite chez les bénéficiaires déclarés …...95
3.2.6 Cas de paludisme simples et graves pris en charge gratuitement en 2012 et 2013…….....…96
3.2.7 Remboursement des frais de prise en charge gratuite aux formations sanitaires en 2013 par l'Etat béninois…….....…….97
3.2.8 Remboursements effectués…….....……...98
3.2.9 Pourcentage de centre de santé rencontrant des difficultés pour la confirmation des cas…….....……..98
3.2.10 Effet de la prise en charge gratuite sur la fréquentation des centres de santé….....98
3.3 Discussions…….....…100
3.3.1 Evaluation de la prise en charge gratuite du paludisme…….....….101
3.3.2 Effectivité de la prise en charge gratuite du paludisme …….....…..101
3.3.3 De la méthodologie…….....101
3.3.4 Disponibilité des intrants de lutte contre le paludisme…….....101

3.3.5 Effectivité de la prise en charge gratuite chez les bénéficiaires déclarés …..102
3.3.6 Influence de la prise en charge gratuite sur la fréquentation…….....102

Deuxième partie: diagnostic Biologique du paludisme…….....104
Chapitre 4 : évaluation de la performance des TDR et du Cyscope en référence à la goutte épaisse…….....105
4.1 Matériels et méthodes…….....106
4.1.1 Matériel d'étude…….....107
4.1.2 Méthode d'étude…….....…107
4.1.3 Réalisation des examens biologiques…….....……109
4.1.4 Collecte des données…….....112
Tableau XXI: Récapitulatif indicatif des résultats (Harper, 1999)……...……..113
4.1.5 Considérations éthiques …….....……114
4.1.6Limites du travail …….....114
4.2 Résultats…….....…..115
4.2.1 Caractéristiques de la population étudiée…….....116
4.2.3 Utilisation de la moustiquaire imprégnée…….....……117
4.2.4. Température corporelle chez les enfants de moins de 5ans……....118
4.2.5 Caractéristiques cliniques et paracliniques des enfants de moins de 5 ans…..118
Tableau XXIV: Répartition de la positivité de la GE en fonction de la température chez les enfants de moins de 5 ans…….....118
4.2.6 Caractéristiques paracliniques des patients étudiés par rapport aux tests réalisés (GE, Cyscope®)…….....….119
4.2.7 Performances des différentes techniques utilisées (TDR et Cyscope®) par rapport à
4.3 Discussion…….....123
4.3.1 Evaluation de la performance des TDR et du Cyscope® versus GE dans le diagnostic biologique du paludisme…….....124
4.3.2 De la méthodologie…….....….124
4.3.3 Intérêt de l'étude…….....…..124
4.3.4 Outil de diagnostic…….....…124
4.3.5 Des caractéristiques paracliniques …….....….125

Chapitre 5 : évaluation de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du Plasmodium falciparum…….....130
5.1 Matériels et méthodes…….....131
5.1.1 Cadre d'étude…….....132
5.1.2 Matériel de laboratoire…….....……132
5.1.3 Population d'étude…….....132
5.1.4 Méthode d'étude…….....133
5.1.5 Déroulement de l'étude…….....……134
5.1.6 Réalisation de la GE/FS …….....……136
5.1.7 Confection des confettis …….....…….137
5.1.8 Extraction de l'ADN plasmodique…….....…….137
5.1.9 Amplification des séquences spécifiques d'ADN …….....…..138
5.1.10 Marqueurs moléculaires pour la résistance de Plasmodium falciparum à la chloroquine…….....139
5.1.11 Marqueurs moléculaires pour la résistance de Plasmodium falciparum à la Sulfadoxine pyriméthamine…….....….143
5.1 .12 Traitement des données…….....……..148
5.1.13 Considérations éthiques…….....……149
5.2 Résultats…….....…..150
5.2.1 Caractéristiques générales de la population…….....151
5.2.2 Caractéristiques des enfants à l'inclusion …….....….152
5.2.3 Taux de portage de Plasmodium falciparum…….....…..153
5.2.4 Résultats des marqueurs de la résistance de Plasmodium falciparum à la chloroquine…….....……153
5.2.5 Résultats obtenus après digestion pour le gène pfcrt……..155
5.2.5 Résultats des marqueurs de la résistance de Plasmodium falciparum à la Sulfadoxine pyriméthamine…….....161
5.2.5.1 Résultats de la PCR-RFLP…….....….161
5.3 Discussions…….....164
5.3.1 De l'intérêt de l'étude…….....165
5.3.2 De la méthodologie…….....……165

5.3.3 La zone d'étude et période d'étude …….....…….166
5.3.4 Techniques de mise en œuvre…….....166
5.3.5 Des résultats obtenus…….....167
5.3.5.1 Les résultats de l'enquête sociodémographique pour l'évaluation de la résistance de Plasmodium falciparum à la chloroquine et à la sulfadoxine…….....167
5.3.5.2 Résistance de Plasmodium falciparum à la Chloroquine …….....168
5.3.6 Résistance de Plasmodium falciparum à la Sulfadoxine …….....…170

Troisième partie : prévention du paludisme….....176
Chapitre 6: évaluation post campagne de distribution des MIILD pour la couverture universelle en 2011…….....177
6.1Matériels et méthodes.....178
6.1.1 Enquête auprès des ménages…….....……...179
6.1.2 Enquête au niveau des services de santé…….....…….180
6.1.3 Pré test et finalisation des outils:…….....181
6.1.4 Déroulement de la collecte…….....182
6.1.5 Ressources humaines…….....182
6 .1.6 Assurance qualité de la collecte des données…….....182
6.1.7 Traitement et analyse des données…….....…...183
6.1.8 Collecte des données sur les emballages de MIILD…….....….....184
6.2 Résultats évaluation post campagne MIILD 2011….....….....185
6.2.1 Caractéristiques de l'échantillon…….....186
6.2.2 Couverture des ménages en MIILD par la campagne…….....189
6.2.3 Possession et utilisation des MIILD après la campagne 2011…….....……194
6.2.4 Utilisation de MII par les ménages…….....….....201
6.2.5 Communication et couverture en MIILD…….....…….204
6.2.6 Résultats auprès des services de santé sur la campagne MIILD….……207
6.2.7 Raisons de non possession en MIILD de certains ménages…….....…..210
6.2.8 Production des déchets par les emballages des MIILD…….....211
6.2.9 Collecte des emballages vides de MIILD…….....212
6.2.10 Destruction des emballages vides de MIILD…….....……..213

6.3 Discussion…….....….215
6.3.1 De la méthodologie…….....….....216
6.3.2 Couverture en MIILD dans les ménages au cours de la campagne…...….....217
6.3.3 Communication pour la campagne…….....….....218
6.3.4 Couverture en MII après la campagne de distribution……...……...219
6.3.5 Utilisation des MII par les groupes vulnérables…….....220
6.3.6 Gestion des emballages de MIILD…….....221

Conclusion générale 222
Recommandations.....226
Perspectives.....228
Bibliographie 230
Publications.....247
Annexes.....300
Annexe 1 : Tableau posologique de Artemether Lumefantrine.....301
Annexe 2 : Classification des résultats du traitement[1].....302
Annexe 3 : Formulaire de dépistage……..…...303
Annexe 4 : Calendrier des activités de suivi.....305
Annexe 5 : Dossier individuel du participant.....306
Annexe 6 : Formulaire de déclaration des manifestations indésirables graves.....308
Annexe 7 : Lignes directrices pour l'analyse des résultats.....310
Annexe 8 : Formulaire de consentement 311
Annexe 9: Fiche de consentement éclairé.....317
Annexe 10: L'alphabet des acides aminés; codes à une et trois lettres.....318
Annexe 11: Comparaison de possession de MII parmi les ménages avec ou sans enfants de moins de 5 ans après la campagne gratuite de juillet 2011.....319
Annexe 12: Proportion des personnes informées de la campagne MIILD 2011 selon le canal, par département et par Milieu de résidence.....320

Annexe 13 : Caractéristiques des femmes enceintes au sein des ménages enquêtés par département et par milieu de résidence ; campagne 2011.....321
Annexe 14: Répartition des ménages couverts en MIILD par département et par milieu de résidence 322
Annexe 15: Indicateurs de couverture universelle par milieu de résidence et par département après la campagne de juillet 2011.....323
Annexe 16 : Utilisation de MII par les groupes vulnérables par département, suivant les milieux de résidence, après la campagne de juillet 2011.....324
Annexe 17 : Outils de collecte.....325
Annexe 18: Fiche d'enquête.....330
Annexe 19 : Microscope à immunofluorescence Cyscope 332
Annexe 20 : Etapes de réalisation d'une lame du microscope Cyscope®.....333
Annexe 21 : Matériels pour l'étude des marqueurs moléculaires de la résistance du Plasmodium à la chloroquine et à la sulfadoxine pyrimethamine.....334

Table des matières.....335