

23 Calcium and *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion during Sickle cell anemia

Auteurs : Romy Razakandrainibe¹ Tsiry¹, Domohina Rakotova² Lova Rasoloharimanana³ Ronan Jambou¹

Institutions : 1 Immunology Unit Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo Madagascar, 2 Pediatric Unit , GENHOSOA, Antananarivo Madagascar, 3 Clinical Biology Laboratory, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo Madagascar. romy@pasteur.mg

Background:

Malaria still threatens the lives of millions of children in tropical countries. The factors determining which children die and which survive are complex, but they are likely related to both the host and the parasite. Of the host specific factor, the sickle cell trait remains the best described.

Regulation of intracellular Ca^{2+} is essential for *Plasmodium falciparum* development and survival. Invasion and infection of the red blood cells (RBCs) can induce senescence. In the same line, increased Ca^{2+} level in RBCs can trigger eryptosis. In RBCs with sickle cell trait (HbSS) Ca^{2+} concentration is considerably higher than in normal ones (HbAA) and is associated with premature senescence and eryptosis (sickled RBCs live for only ten to 20 days compared to the 120 days lifespan of normal healthy RBCs). This can limit the lifespan of the parasite in patients with sickle cell anaemia and may explain their relative protection against malaria. However recent studies warn that children with sickle cell anaemia are more likely to die from severe malaria, suggesting that parasites can survive within this hostile environment.

Material and Method:

To investigate the survival (from invasion to development) of malaria parasites within sickled RBCs; homozygous HbSS and HbAA RBCs were co-cultivated in parallel with enriched late stage *P. falciparum* FCM-29 strain. Cultures were used, in one hand, to compare calcium content of HbSS and HbAA infected RBCs by flow cytometry and in the other hand, to quantify changes in gene involved in Ca^{2+} regulation and transportation (*PfATP6*, *PfATP4*, *PfV1*, *PfV2*, *PfCAX*, *PfNHE*) expression by real time PCR.

Results:

Over 72h of culture, we found that parasite grow slower in HbSS RBCs than in HbAA ones with a delay in the life cycle. Using Q-PCR we found no change in *PfATP6*, *PfATP4*, *PfV1*, *PfV2*, *PfCAX*, *PfNHE* expression between the two sets of parasites. By flow cytometry we found a great heterogeneity of Ca^{2+} level in HbSS RBCs, with 21.2% harbouring a high concentration of Ca^{2+} . Double staining of parasitized erythrocytes with Fluo4-AM and hydroethidine showed no significant difference in the Ca^{2+} content of HbAA and HbSS parasitized RBCs (Fluo4 mean of fluorescence 3.33 and 4.40 respectively).

Conclusion:

These results draw question about whether parasites infect only HbSS RBC with a normal intracellular Ca^{2+} level or whether they regulate the Ca^{2+} content of the RBC early after invasion without evidence of modulation of the main cation exchanger expression

24 Facteurs associés avec la séropositivité de la cysticerose dans une commune rurale de haute Matsiatra, Madagascar

Auteurs : Andriambololona Rindra, Marin Benoît, Rakotova Tanamasoandro, Rakotozafy Jean-Claude, Preux Pierre-Marie, Duval, Solofomalala, Baudu Michel, Rodier Marie-Hélène, Dardé Marie-Laure, **Ratsimbazafy Voa**

Institutions : Institut de NeuroEpidémiologie Tropicale, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Centre Hospitalier Universitaire, Faculté des Sciences et Techniques, voa_ratsimbazafy@yahoo.fr

Objectif : Notre étude, menée de janvier à mai 2010 en Haute Matsiatra, avait pour objectif de rechercher les facteurs associés avec la séropositivité à la cysticerose dans une commune rurale, Alakamisy Ambohimaha. Pour y parvenir, les objectifs spécifiques étaient d'évaluer la prévalence de la séropositivité à la cysticerose et de déterminer les contaminations parasitaires et autres facteurs de risque dans l'environnement de vie des sujets séropositifs.

Méthode :

Le nombre de sujets calculé comme étant nécessaire était de 150. Une campagne préalable avait été réalisée dans chaque fokontany constituant la commune, les écoles et lycées, et le CSB. Tous les jeudis (jour du marché) après recueil du consentement oral des sujets, 5-10mL de sang étaient prélevés au pli du coude, et un questionnaire était rempli à la recherche de signes ou symptômes évocateurs d'une cysticerose ou d'une épilepsie et des facteurs de risque de cysticerose. La séropositivité était établie par une recherche d'Ac avec la méthode EITB (kit Western blot Cycticercosis IgG de LDBio Diagnostics). Sept prélèvements de 200g de sol avaient ensuite été effectués dans l'environnement de vie des sujets séropositifs. Après techniques de triple flottation et de sédimentation, la recherche des parasites était réalisée à l'examen au microscope.

Les variables associées avec la séropositivité ont été recherchées en utilisant le modèle de régression logistique. Une analyse univariée suivie d'une analyse multi variée pas à pas descendante a été conduite. Les Odds Ratio assortis de leur intervalle de confiance à 95% ont été calculés. Le degré de significativité était de 0,05.

Résultats et discussion :

Parmi les 150 sujets majoritairement féminins d'âge moyen 28,3% 14,7ans, 18 étaient séropositifs, soit une séroprévalence de 12% avec un IC 95% [6,8 à 17,2]. Ceci est en conformité avec les prévalences retrouvées dans la littérature pour Madagascar. Sur les échantillons provenant de leur environnement, les parasites retrouvés étaient, dans l'ordre décroissant : des œufs d'*Ascaris* (69,4%), de Trichocéphales (19,5%), d'*Ankylostomidés* (8,3%) et de Taenidés (2,8%). Comme attendu, les sites les plus contaminés étaient ceux à proximité des toilettes où les œufs de Taenidés en particulier avaient été localisés. La recherche des éventuelles variables associées à la séropositivité est en cours.

25 Performance of serological and PCR examination of the spinal cord fluid for the diagnostic of neurocysticercosis

Auteurs : Julien Razafimahefa^{1,2}, Mahenintsoa Rakotondrazaka¹, Ismael ChakirR¹, **Romy Razakandrainibe¹**, Thierry Franchard¹, Mickael Randrianarison³, Noel Zodaly², Marcellin Andriantseho², Ronan Jambou¹

Institutions : 1 Immunology Unit Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo Madagascar, 2 Clinic of Neurology, Befelatanana Hospital, Antananarivo Madagascar, 3 Radiology Unit, CENHOSOA, Antananarivo Madagascar

Neurocysticercosis (NCC) is the most important cause of seizure in tropical countries. In Madagascar seroprevalence of cysticercosis (in blood) can reach 20% in population of the highlands. However biological methods used in blood can give high level of false positivity due to extra-cerebral localisation of the cysts, and can be in same time poorly sensitive when a single cyst is located in brain. Scanners are also poorly available in tropical countries leading treatment of the patients with anti-helminths on behalf of ELISA anti-Ts results. To improve the diagnostic of NCC for patients suffering from recent seizure or cephalae in Madagascar, we developed real time PCR method detecting the *T.solium* COX1 gene and we used it in parallel with a western blot analysis of the spinal cord fluid (SCF). The performance of these methods was compared with the scanographic examination of the patients. Sensitivity of the Q-PCR method for the detection of *T.solium* DNA was established by its own using serial dilution of DNA extracted from cyst, re-diluted in SCF before re-extraction. 0.2 pg/ml of *T.solium* DNA can be detected with less than 40 PCR cycles. Specificity was checked using SCF from patients suffering from other pathologies and with DNA from other parasites. WB was conducted according to Tsang et al (1989).

To date 105 patients attending the clinic of neurology for recent seizure and/or recent and painful headache were included in the study. Among the whole group, patients with seizure are more susceptible to harbour scanographic anomalies (60% and 79% respectively). 80% of them are positive for PCR and/or WB conducted in SCF. However for patients with seizure but with negative scanner, 37% and 56% were positive respectively for WB and PCR in SCF. This claims for an under-detection of lesions by standard scanner in field condition especially for recent infection.

We are still registering patients in this study and isotype analysis of the WB is also in process to detect IgA, IgD and IgE anti-*T. solium* in SCF and blood of the patients. A score built on both epidemiological and biological data must be defining to improve the diagnostic of NCC. An overall analysis of these data will be presented.

26 Etude prospective de comparaison des avidités IGG anti-toxoplasmiques architect et vidas.

Auteurs : A. Smets (1), C. Pomares (1), J. Quetel (2), F. Ajmia (2), T. Fauchier (2), **P. Delaunay (1)**, P. Marty (1)

Institutions : (1) Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital de l'Archet, CHU Nice, Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, Inserm U 895, BP 3079, 06202 Nice Cedex 3, France. (2) Département de Santé Publique, Hôpital de l'Archet, Hôpital de Cimiez, CHU Nice, Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, 06202 Nice Cedex 3, France. delaunay.p@chu-nice.fr

Le programme officiel français de prévention de la toxoplasmose congénitale recommande le dépistage sérologique mensuel des femmes enceintes séronégatives. Le premier sérum étant souvent prélevé pendant la grossesse, plusieurs techniques ont été développées pour dater la contamination maternelle en cas de séropositivité IgG et IgM sur ce premier sérum avec notamment le dosage de l'avidité des IgG anti-toxoplasmiques. Le but de ce travail est de comparer les avidités réalisées sur les automates Vidas (Biomérieux) et Architect (Abbott). Pour ces 2 techniques, une avidité forte permet d'exclure une infection datant de moins de 4 mois. Nous avons donc testé en prospectif le sérum de 119 femmes enceintes. Dans 93 cas, la toxoplasmose était ancienne avec une contamination datant de plus de 4 mois (IgG Vidas > IgG Architect, présence d'IgM et plus ou moins d'IgA) et dans 26 cas récente (IgG Architect > IgG Vidas, présence d'IgM, présence d'IgA). Nous avons comparé ces données de manière appariée. Les 2 techniques donnent statistiquement des résultats identiques. La technique Vidas est plus corrélée aux conclusions biologiques rendues ($\kappa=0.838$ versus $\kappa=0.724$). En ce qui concerne les avidités intermédiaires, il ne paraît pas possible pour l'une ou l'autre des techniques d'exclure une infection récente.

En conclusion, l'avidité Architect est statistiquement comparable à l'avidité Vidas et peut être utilisée en routine pour exclure une infection récente.

27 Evaluation du risque de contamination alimentaire par *Toxoplasma gondii* : vers de nouveaux moyens de détection.

Auteurs : **I. Villena**, D. Aubert.

Institutions : Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CNR Toxoplasmose, Hôpital Maison Blanche, EA 3800, UFR Médecine, Université Reims Champagne-Ardenne, USC Epitoxo ANSES, Reims, France. ivillena@chu-reims.fr

La toxoplasmose une zoonose cosmopolite dont la prévalence est variable selon les pays, transmise principalement par contamination alimentaire à partir des kystes de *T. gondii* contenus dans la viande ou des oocystes présents dans les végétaux ou l'eau de consommation. Il est cependant difficile d'estimer les risques sanitaires et économiques réels représentés par l'alimentation et la part de chaque denrée dans la transmission. En outre, la prévalence des protozoaires contenus dans l'alimentation est méconnue notamment par absence de méthodes de détection normalisées et du fait d'un manque de données sur le comportement des parasites dans les différentes matrices alimentaires même si leur résistance à diverses substances ou procédés de fabrication est bien documentée. Afin de renforcer les connaissances sur le risque de contamination lié à la consommation de viande en France, nous avons mené avec l'ANSES et la DGAL deux enquêtes sur le portage de *T. gondii* chez les ovins et les bovins. Parallèlement, nous avons mis en place un programme de recherche sur la détection des trois principaux protozoaires transmis par l'alimentation (*Cryptosporidium*, *Giardia* et *Toxoplasma*) en partenariat avec divers laboratoires académiques et des industriels de l'alimentation. Le but est de développer une stratégie commune de détection de ces parasites en particulier sur des matrices complexes (végétaux et mollusques).

28 Démographie canine et les risques rabiques dans la Commune Rurale d'Ambohibary, Moramanga

Auteurs : Raharisoa O. Eveline ; Ratsitorahina M.; Rasambainarivo J.H.

Institutions : jrasamb@moov.mg

La rage demeure un problème de santé publique majeur dans des nombreux pays en développement dont Madagascar. Cependant, il n'existe pas des données fiables sur la démographie canine et les risques d'épidémie de rage particulièrement dans la zone rurale.

Nous avons réalisé une étude transversale par un sondage à plusieurs degrés pour évaluer la couverture vaccinale contre la rage chez les chiens et les risques de transmission de la rage dans la commune rurale d'Ambohibary, zone péri-urbaine de Moramanga. Nous avons visités 903 foyers dans les 30 hameaux tirés au hasard. Nous avons ainsi recensé 556 chiens dont 1,07% peuvent être qualifiés de chiens errants sans maître et 98,93% sont des chiens à propriétaire. La densité de la population canine est estimée de 1 chien par 12 personnes, le sex-ratio entre chien Mâle/Femelle est de 1,17. La taux de couverture vaccinale des chiens est seulement de 3,36%. Les principales causes de la non vaccination sont l'ignorance de l'intérêt de la vaccination (18,6%), le problème financier (5,8%) et la difficulté d'accès au cabinet du vétérinaire. En ce qui concerne les attitudes pratiques à prendre en cas de morsure de chien, 81,6% des foyers n'ont qu'une connaissance incomplète. Plus de la moitié des personnes mordues ignorent les mesures à prendre et seulement 10% ont été consulté au Centre de Traitement Antirabique. Pour lutter contre la rage en zone rurale, il apparait ainsi indispensable d'une part, de renforcer périodiquement l'information concernant la maîtrise de la population canine et d'autre part, de motiver les propriétaires à faire vacciner leurs chiens.

29 L'écologie des chiens dans la ville d'Antananarivo

Auteurs : Ratsitorahina M. ; Rasambainarivo J.H., Raharimanana Soloherilala, Rakotonandrasana H., Andriamiarisoa Marie-Perle, Rakalomanana A. Fidilalao, Richard V.

Institutions : jrasamb@moov.mg

Les chiens restent les principaux agents de propagation de la rage à Madagascar.

Une étude transversale a été menée auprès de 1541 ménages, entre Octobre 2007 et Janvier 2008. L'objectif était de mieux connaître l'écologie des chiens dans la Communauté Urbaine Antananarivo, Madagascar. Les résultats estiment la population canine dans la ville à environ 261000 têtes dont 11% sont des chiens errants. Le ratio moyen est ainsi de 1 chien pour 5 personnes. Une grande majorité des ménages (89%) se disent propriétaires d'un chien. Toute fois la plupart des chiens à propriétaires (71%) ne sont pas restreints par des clôtures, ils vont chercher leurs aliments à l'extérieur et côtoient ainsi d'autres chiens. Seuls 7,2% des chiens avaient des certificats signés confirmant la vaccination contre la rage. Une faible proportion des chiens (11,7%) sont nourris avec des aliments industriels commerciaux.

30 Le risque rabique, vue à travers la démographie canine, les paramètres épidémiologiques des chiens et la connaissance de la population sur la rage à Moramanga, Madagascar.

Auteurs : **Rakotonirainy N.***, Ratsitorahina M**, Rasambainarivo J.*

Institutions : *Département de Médecine Vétérinaire, Université d'Antananarivo, BP 375 Antananarivo 101, Madagascar **Unité d'Epidémiologie, Institut Pasteur de Madagascar, BP1274 Antananarivo 101 Madagascar, norofaliana@pasteur.mg

Dans de nombreux pays en voie de développement dont Madagascar, le chien constitue le principal réservoir et vecteur de la rage à l'homme. Une bonne connaissance de la population canine est nécessaire pour mettre en place un plan de lutte efficace contre cette maladie. Une enquête transversale, par échantillonnage aléatoire systématique stratifié à 2 degré, a été menée du 19 janvier au 10 février 2010 dans la Commune Urbaine de Moramanga pour estimer la taille de la population canine et la connaissance de la population sur la rage. La collecte des informations sur la connaissance attitude pratique dans les foyers s'est fait par tirage au sort d'une personne dans le foyer. Au total, 477 chiens et 746 foyers ont été enquêtés. Parmi ces chiens, 300 étaient des chiens domestiques et 177 étaient des chiens de rue dont 43 étaient sans propriétaire connu. Le sexe ratio (male femelle) était de 1.6 chez les chiens domestiques et de 2 chez les chiens de rue. Selon le mode de vie, 71% de ces chiens étaient libres de sortir dans la rue à volonté, donc pouvaient être en contact avec d'autres chiens, alors que le taux de vaccination antirabique n'était que de 11.7%. Le nombre de chien dans la commune était estimé à 4990 donnant un ratio chien homme de 1 chien pour 7.2 hommes. Sur les 746 foyers enquêtés, 93% (52/743) des répondants ont déjà entendu parlé de la rage. 91% connaissaient qu'une morsure transmette une maladie mais seul 75.4% pensaient à la rage en priorité comme maladie pouvant être transmis par morsure. Moins de 1/3 des personnes enquêtées savaient les soins corrects qu'il faut faire immédiatement après une morsure. Ils n'étaient que de 30.1% à être au courant qu'il faut emmener le chien mordeur chez le vétérinaire et 30% abattraient le chien ou ne feraient rien du tout. Seule 19.1% affirment qu'une rage déclarée n'est plus curable. L'ampleur du risque rabique chez les personnes est liée au nombre important de chien errant occasionnel et à une très faible connaissance de la population de la rage.

31 *Amblyomma variegatum*, cas d'une tique colonisatrice : phylogéographie au niveau mondial et structuration dans un territoire colonisé, Madagascar

Auteurs : **Huber Karine**, Jacquet Stéphanie, Frédéric Stachurski, Vachierey Nathalie, Aprelon Rosalie, Martinez Dominique
Institutions : INRA, CIRAD, DRZV/FOFIFA CIRAD, karine.huber@cirad.fr

Amblyomma variegatum (Fabricius, 1794) est une tique dure de la famille des Ixodidae, vectrice d'Ehrlichia ruminantium, bactérie responsable de la cowdriose, une maladie des ruminants domestiques et sauvages sévissant en Afrique subsaharienne, à Madagascar et dans les Caraïbes. En Afrique, son berceau d'origine, l'espèce est présente en zone subsaharienne du Sénégal à l'Éthiopie, dans tous les pays d'Afrique de l'ouest et centrale et dans une grande partie de l'Afrique orientale. Dans l'Océan Indien, *A. variegatum* a été signalée pour la première fois à Madagascar en 1899, bien que son introduction soit probablement bien plus ancienne et contemporaine de l'importation des premiers zébus. Cette tique est également présente à La Réunion, sur l'île Maurice et aux Comores. A l'ouest du continent africain, cette tique a été décrite dans les îles du Cap Vert et dans les Caraïbes¹, là encore, elle a été introduite, avant le milieu du 18^{ème} siècle, par du bétail infesté en provenance d'Afrique. Les îles d'Antigua et de la Guadeloupe ont été les premières à être infestées. Depuis une cinquantaine d'années, cette tique a progressivement envahi presque la totalité des îles des Petites Antilles et même, pendant quelques années, Puerto Rico. Dans plusieurs de ces pays et régions, des tiques ont été collectées afin d'avoir une vue d'ensemble, tant au niveau génétique que démographique, des phénomènes qui ont conduit à la distribution et à la structuration actuelle des populations d'*A. variegatum*. L'étude devait aussi caractériser la structure génétique des populations d'*A. variegatum* et ainsi avoir une meilleure compréhension du mode de reproduction des tiques, de la taille des populations ainsi que du mode et de l'intensité de leur dispersion. Des approches de phylogéographie et de génétique des populations ont été menées à l'aide de marqueurs mitochondriaux et microsattellites. Deux types d'échantillonnages ont été réalisés : le premier couvrait l'ensemble de l'aire de répartition d'*A. variegatum* et l'autre, a été réalisé à un niveau local à Madagascar. Cette étude a permis de mettre en évidence, au niveau mondial, deux lignées d'*A. variegatum*, une lignée « mondiale » présente sur toute l'aire de répartition de la tique et une lignée « Afrique de l'Est » restreinte à l'Afrique de l'Est et à l'Océan Indien. Les résultats de structuration sont en concordance avec les hypothèses d'introduction de la tique à Madagascar et dans l'Océan Indien depuis l'Afrique de l'Est, et d'introduction dans la Caraïbe depuis l'Afrique de l'Ouest. A Madagascar, il a été mis en évidence une forte diversité génétique chez les tiques *A. variegatum* et l'existence de populations bien structurées mais de manière hétérogène. Cette structure est probablement influencée par l'interaction complexe de différents facteurs géographiques, climatiques et anthropiques.

32 Evolution de la distribution de la tique *Amblyomma variegatum* à Madagascar

Auteurs : Rahajarison Patrick, Arimanana Armel, Raliniaina Modestine, **Stachurski Frédéric**
Institutions : CIRAD et FOFIFA/DRZV frederic.stachurski@free.fr

La tique *Amblyomma variegatum* est l'une des espèces causant le plus de dégâts (pertes directes - blessures, réduction de la croissance et de la production laitière,...- et indirectes, dues aux maladies transmises ou associées) chez les ruminants d'Afrique subsaharienne. Probablement introduite à Madagascar depuis plus de dix siècles par des bovins en provenance d'Afrique orientale, cette tique était encore rare sur les hauts-plateaux du centre de l'île il y a 30 ans. Uilenberg et al (1979) estimaient ainsi que, si elle pouvait être retrouvée entre 1100 et 1400 m d'altitude «le long des routes suivies par les troupeaux de bœufs en provenance des régions basses de l'ouest et en marche vers l'abattoir de la capitale», il n'était en revanche pas certain qu'elle puisse se maintenir dans la région de Tananarive sans l'apport continu en provenance de l'Ouest». En 2010, une enquête menée dans la région d'Antsirabe a montré que la tique est désormais installée dans pratiquement toutes les zones situées en-dessous de 1600 m, avec toutefois des nuances en fonction de la végétation, *A. variegatum* préférant les savanes arbustives aux paysages de rizières. Elle est même signalée à plus de 1700 m (Faratsiho). Au nord d'Antananarivo, une enclave pourtant moins élevée (Mangamila, 1400 m) reste encore indemne. Une étude menée en saison froide (juin-septembre) dans trois sites de cette région a montré que les températures qui y ont régné en 2010 (T° moyennes 14,7°C à 17,1°C, T° minimales de 5,5°C à 6,8°C) n'ont pas empêché le développement de nymphes gorgées placées sur le terrain. Même sur le site le plus froid (2 050 heures, soit près de 3 mois, sous 15°C et 275 heures sous 10°C), les conditions n'ont pas causé la mort des nymphes même si elles ont entraîné un fort ralentissement de leur développement : la métamorphose en adultes de nymphes placées début juin sur le terrain est intervenue en 16 à 20 semaines contre 4-6 semaines au Burkina Faso à une époque équivalente (saison sèche froide). De ce fait, le stade devant survivre aux conditions les plus difficiles est la nymphe gorgée, qui subit une diapause de développement, et non l'adulte à jeun qui subit alors, du fait de la trop faible humidité, une diapause comportementale (pas d'activité de recherche des hôtes). De nouveaux essais seront menés en saison sèche 2011 à des altitudes plus élevées (1500 à 2000 m) pour déterminer s'il existe des conditions climatiques entraînant la mort des stades non parasitaires et interdisant donc l'installation de cette tique.