

REPONSE *IN VIVO* A LA CHLOROQUINE AU COURS DU TRAITEMENT DU PALUDISME A *PLASMODIUM FALCIPARUM* EN REGION SUBURBAINE DE KINSHASA, ZAIRE

par

N. P. NGIMBI¹, M. WERY², M. C. HENRY¹ & M. P. MULUMBA¹

¹Service de Parasitologie, Université de Kinshasa,
B. P. 747, Kinshasa XI, République du Zaïre

²Département de Protozoologie, Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold,
Nationaalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique

Résumé — Une enquête a été menée à Kinsuka, zone suburbaine de Kinshasa, de juillet à novembre 1984. 500 individus, surtout des enfants, ont été examinés; 166 parmi eux ont présentés des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* dans leur sang (33,2 % des cas). Ils ont reçu uniformément per os une dose de 25 mg de Chloroquine-base/kg de poids corporel. 101 d'entre eux ont été suivis consécutivement pendant 7 jours.

La majorité des souches de *Plasmodium falciparum* sont sensibles à la chloroquine soit environ 95 % des cas dont 2 % ont présenté une élimination retardée. 5 % des souches sont probablement résistantes à la chloroquine parmi lesquelles 1 cas a été confirmé *in vitro*.

Les présentes observations montrent, une fois de plus, que l'immunité joue un rôle dans la mise en évidence de la résistance. En effet les individus porteurs de souche résistante sont tous des enfants de moins de quatre ans possédant peu ou pas d'anticorps en immunofluorescence.

KEYWORDS : Malaria; *Plasmodium falciparum*; Treatment; Drug Resistance; Chloroquine; Zaïre.

Introduction

La chloroquine est, sans conteste, l'antipaludique le plus largement utilisé en Afrique dans les programmes de contrôle du paludisme; et cela pour deux raisons : son prix peu élevé et son efficacité reconnue sur le paludisme Ouest-Africain.

Malheureusement certains faits risquent de diminuer son utilisation : nous citerons en passant le prurit qui apparaît chez certaines personnes lors du traitement à la chloroquine; mais le fait le plus important est sans doute l'apparition de la chloroquino-résistance.

En effet, c'est depuis 1977 que des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine sont signalées dans l'Est de l'Afrique, spécialement au Kenya et en Tanzanie (1, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 15) alors que les souches d'Afrique étaient, jusque là, considérées comme sensibles.

L'Afrique Centrale semblait échapper à ce phénomène. Mais voilà qu'en 1983, Delacollette *et al.* (5) signalent la présence dans l'Est du Zaïre (Kivu) de souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistantes. Vers la même période, c'est-à-dire en avril 1983, Nguyen-Dinh *et al.* (11)

entreprennent à Kinshasa (à l'ouest) et Mbuji-Mayi (au centre) une enquête qui prouve la bonne sensibilité des souches de *Plasmodium falciparum* de ces régions à la chloroquine. Cette étude ne se limite qu'à des enfants d'âge scolaire et des adultes; il était donc nécessaire d'entreprendre une autre enquête englobant des enfants plus jeunes dépourvus probablement d'une immunité propre.

L'objet de notre étude était donc double : premièrement connaître le degré de sensibilité du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine chez les enfants en bas-âge et deuxièmement surveiller l'extension de la résistance existant déjà à l'est du Zaïre et de l'Afrique, étant donné les multiples déplacements de la population.

Matériel et méthodes

1. Matériel

La présente étude est basée principalement sur des enquêtes sur le terrain et sur quelques observations cliniques. Du 3 juillet au 2 novembre 1984, 500 individus, surtout des enfants ont été examinés, 166 parmi eux étaient porteurs de trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* (33,2% des cas); 132 ont été retenus pour l'étude. 101 individus seulement ont été suivis consécutivement pendant 7 jours.

1.1. Observations cliniques

Il s'agissait de patients, adultes ou enfants qui se présentaient au centre de Santé ou au laboratoire pour un accès de fièvre ou pour une malaria soit disant chronique.

1.2. Enquête sur le terrain

L'enquête sur le terrain s'est effectuée au centre rural de Santé de Kinsuka, installé pour des enquêtes épidémiologiques sur l'Onchocercose; Kinsuka est un village situé en banlieue au sud-ouest de Kinshasa, le long du fleuve Zaïre, en face de l'île des Mimosas.

Sa population très diversifiée est constituée d'individus originaires de presque toutes les régions du Zaïre (Bas-Zaïre, Bandundu, Equateur, Kasai, Kivu, Haut-Zaïre).

2. Méthodes

2.1. Méthodes parasitologiques

Seuls étaient admis dans l'étude, les individus présentant au moins 1.000 parasites par μl de sang, ne possédant pas d'infections mixtes et n'ayant encore pris aucune médication antipaludique.

Avant l'administration de la chloroquine et 48 heures après, chaque patient devait fournir un échantillon d'urine pour la détection de la chloroquine par le test de Dill et Glazko (9, 17). Ce test devait nous servir

à exclure ceux qui avaient déjà pris la chloroquine et à confirmer l'absorption du produit pendant le traitement.

Le produit utilisé était le sulfate de chloroquine dosé à 100 mg de chloroquine-base fabriqué par Specia. La dose totale administrée per os était uniformément de 25 mg de chloroquine-base/kg de poids corporel, répartis sur 3 jours, selon la posologie recommandée par l'OMS (13).

Les gouttes épaisses étaient lues en comptant les formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par rapport à 200 leucocytes. Dans certaines circonstances, nous avons utilisé le micro-test *in vitro* de Rieckmann (16) surtout pour confirmer une résistance éventuelle.

Comme traitement des cas de résistance rencontrés, nous avons utilisé, en premier lieu la quinine, et ensuite une association de quinine et tétracycline. La quinine utilisée est fabriquée sous forme de bichlorhydrate en solution à 20% par Warner-Lambert à Kinshasa, et administrée per os à la dose de 10 à 20 mg par kg de poids corporel et par jour, soit 1 goutte par kg de poids corporel par jour, pendant 7 jours.

La tétracycline était administrée à la dose quotidienne de 25 mg par kg de poids corporel pendant 5 jours.

2.2. Méthodes statistiques

Pour homogénéiser la variance des données parasitémiques observées, nous avons effectué leur transformation logarithmique; à cette fin, les valeurs nulles de la parasitémie ont été posées égales à 0,01 au lieu de 0.

La comparaison des moyennes (moyennes géométriques) a été effectuée par le test t de Student; le seuil de probabilité (p) de 5% a été adopté pour l'acceptation des différences significatives.

Résultats

1. Evolution du nombre de cas de guérisons après chimiothérapie

1.1. Profil général (Fig. 1)

L'évolution globale montre que la majorité des souches étudiées gardent une très bonne sensibilité à la chloroquine; en effet, 50% d'individus traités sont guéris avant le jour 3 et plus de 75% le jour 4.

Toutefois, en dépit de l'absorption médicamenteuse confirmée par un test de Dill et Glazko positif, 7% d'individus sont restés porteurs de parasites au jour 6 et 5% au jour 7.

1.2. Evolution selon l'âge (Fig. 1)

Deux groupes d'âge ont été étudiés: celui de moins de 5 ans qui compte 33 enfants et celui de 5 ans et plus qui rassemble 68 individus dont huit adultes.

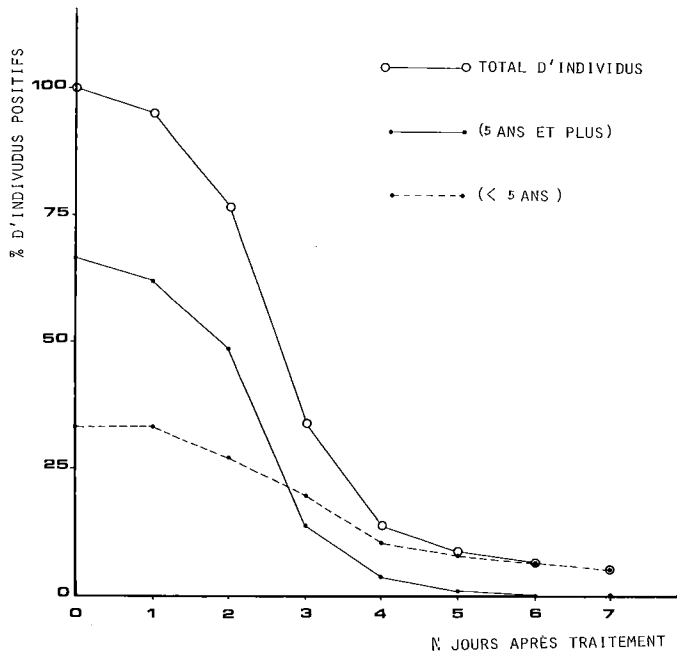


Figure 1.

Evolution post-thérapeutique du nombre de porteurs de trophozoïtes en fonction du temps : comparaison selon l'âge. Traitements à la chloroquine.

La figure 1 montre que la guérison est plus lente chez les enfants de moins de 5 ans que chez les individus de 5 ans et plus; 5 des 33 enfants âgés de moins de 5 ans (15%) ont encore des parasites au jour 7.

2. Evolution post-thérapeutique de la parasitémie

2.1. Profil général

L'examen des histogrammes des fréquences de différents taux de parasitémie présentée par les sujets étudiés (Fig. 2) permet de rendre compte de la cinétique d'élimination de la parasitémie après traitement : celle-ci est totale chez 95% d'individus après 3 jours de traitement.

L'étude de l'évolution post-thérapeutique de la parasitémie moyenne en fonction du temps montre bien que la majorité des parasites demeurent encore sensibles à la chloroquine (Fig. 3); en effet, à l'échelle logarithmique, alors qu'aux 100% de la parasitémie initiale moyenne correspond la valeur absolue de 12.266 trophozoïtes par μl de sang, avant le jour 3 la valeur moyenne tombe à 50%, soit 13 trophozoïtes par μl de sang.

2.2. Evolution selon l'âge (Fig. 4 et 5)

En considérant les mêmes groupes d'âge que plus haut, nous remarquons que la différence constatée entre les enfants de moins de 5 ans et

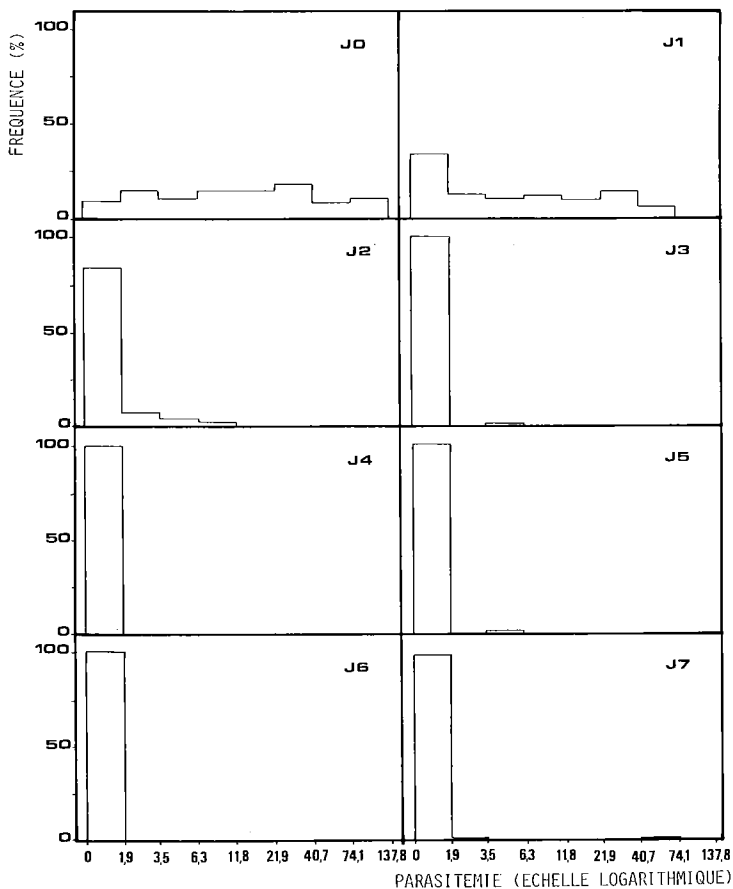


Figure 2.
Distribution des fréquences des taux de parasitémie en fonction du temps après la chimiothérapie.
Fréquence (%)

les individus de 5 ans et plus, est significative ($p < 0,05$) au jour 1 et au jour 2; elle est hautement significative ($p < 0,01$) au jour 3 et très hautement significative ($p < 0,001$) au jour 7.

La différence de réponse à la chloroquine constatée plus haut est donc confirmée statistiquement: la guérison est plus lente chez les enfants de 0 à 5 ans que chez des sujets plus âgés.

2.3. Evolution selon le sexe (Fig. 6 et 7)

Après chimiothérapie antipaludique, on ne note guère entre les sexes de différence statistiquement significative ($p < 0,05$) dans le profil régressif de la parasitémie.

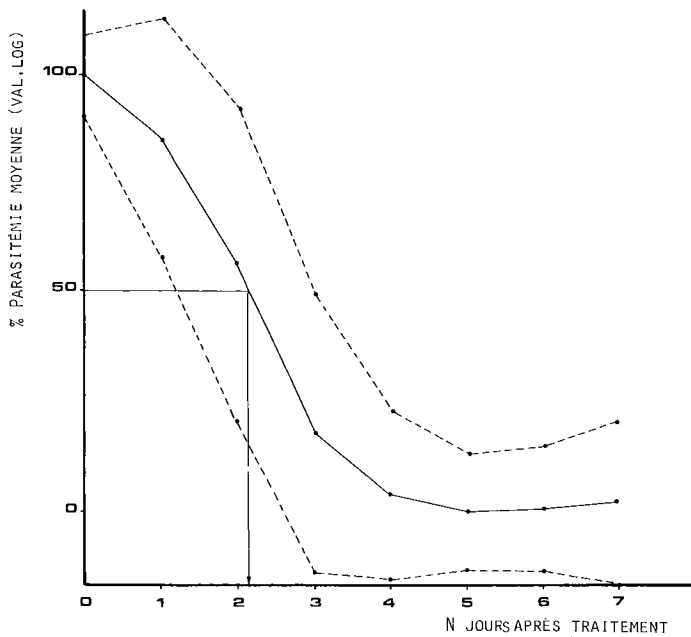


Figure 3.
Evolution post-thérapeutique de la parasitémie.
% parasitémie moyenne (val. log.)

3. Résultats *in vitro*

TABLEAU 1
Réponse à la Chloroquine

Test utilisé	Nombre de cas testés		Cas sensibles		Cas à élimination retardée		Cas résistants	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
<i>In vivo</i>	36	100	33	92	2	5,5	1	2,5
<i>In vitro</i>	36	100	32	89	2	5,5	2	5,5

36 sur 101 personnes suivies *in vivo* ont été soumises au test *in vitro*. Sur les 4 cas de résistance probable *in vivo* qui ont pu être observés, 1 seul cas a été confirmé *in vitro*. En outre dans 1 cas, une résistance *in vitro* a pu être mise en évidence alors que la souche s'est montrée sensible *in vivo* chez un enfant de 7 ans.

4. Observations cliniques des cas probables de chimiorésistance

4 des 5 enfants âgés de moins de 5 ans ayant présenté une parasitémie positive au jour 7, ont pu être retrouvés et examinés. Au jour 0, 3 sur 5 se sont présentés au centre de Santé parce qu'ils avaient de la fièvre; les 2 autres n'en avaient pas au moment du prélèvement. Au jour 7 aucun de ces 4 enfants ne faisait de la température.

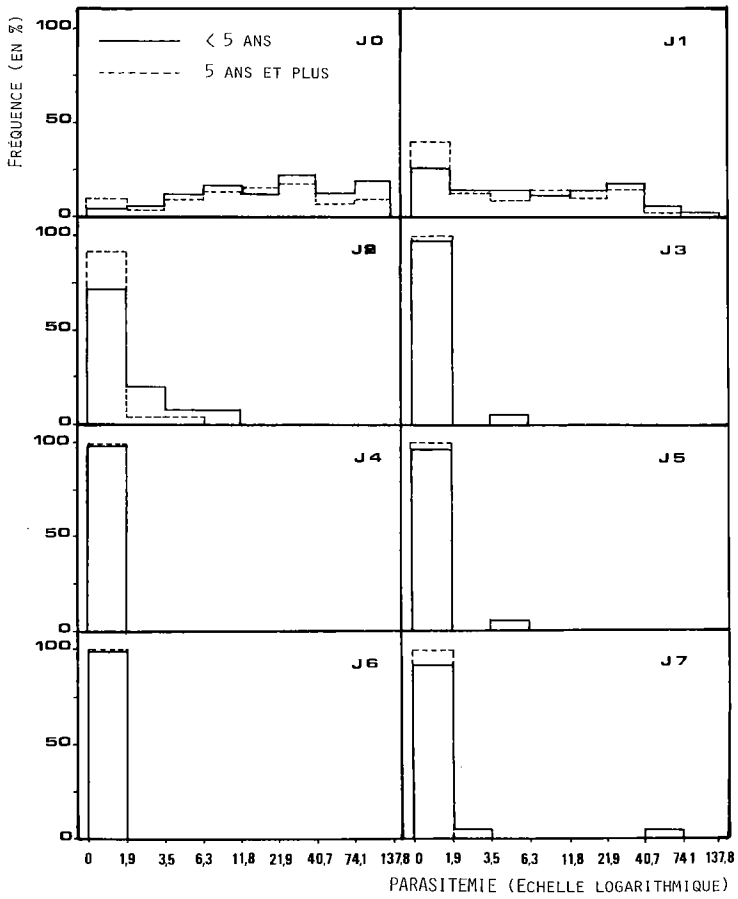


Figure 4.
 Distribution des fréquences des individus selon l'évolution de leur parasitémie
 durant la période post-thérapeutique.
 Comparaison des deux groupes d'âge.

TABLEAU 2
Clinique des cas probables de chimiorésistance

	Age	Poids	Fièvre au jour 0	Fièvre au jour 7	Catégorie de la rate	Présence d'Ac par IFI	Origine ethnique
Enfant n° 1 WEM...	3 ans	10 kg	(+)	(-)	0	(-)	Kasai oriental
Enfant n° 2 ND...	3 ans	11 kg	(-)	(-)	1	douteux à 1/100	Kasai oriental
Enfant n° 3 SOB...	10 mois	10 kg	(+)	(-)	0	(-)	Kivu
Enfant n° 4 MAN...	3 ans	10 kg	(-)	(-)	0	(-)	Kasai oriental
Enfant n° 5 ZAIN...	6 mois	6 kg	(+)	(-)	non retrouvé	non retrouvé	Kivu

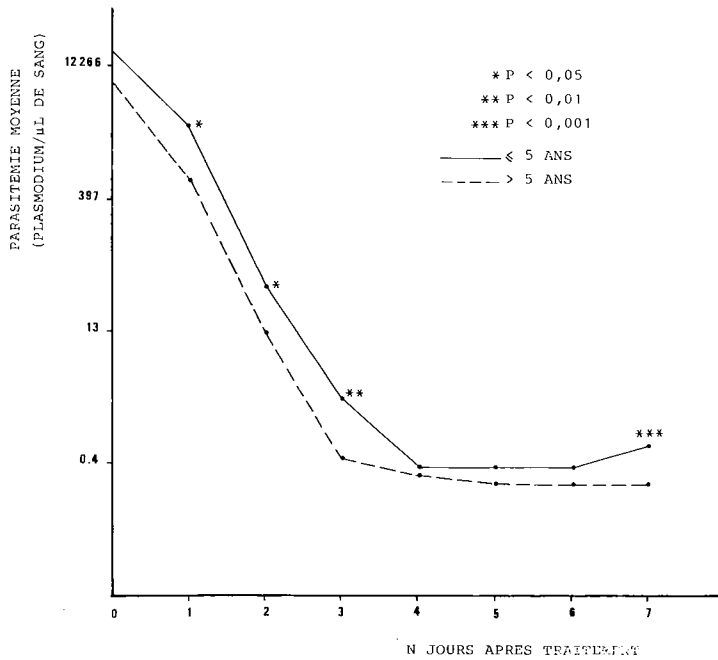


Figure 5.
Evolution post-thérapeutique de la parasitémie selon l'âge.
Traitement à la chloroquine.

Un seul présentait une pointe de rate à l'inspiration profonde (catégorie 1). La recherche d'anticorps par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) en utilisant comme Ag *Plasmodium falciparum* a montré l'absence d'anticorps chez 3 enfants et une réaction douteuse à la dilution 1/100 chez le quatrième. Le seuil de spécificité de la réaction a été fixée au 1/100.

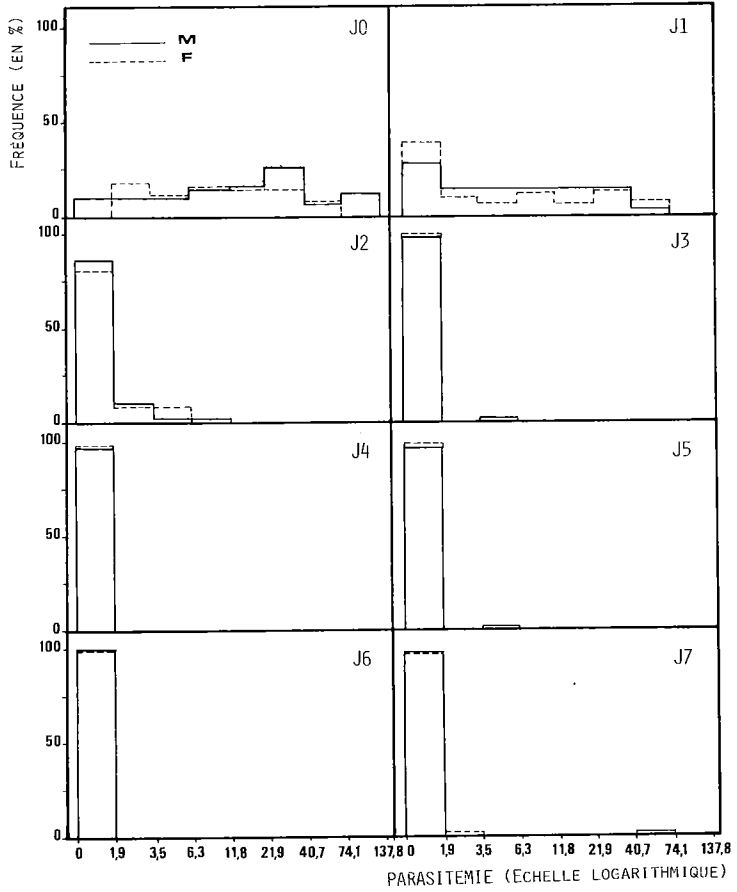


Figure 6.
Distribution des fréquences des taux de parasitémie selon le sexe.

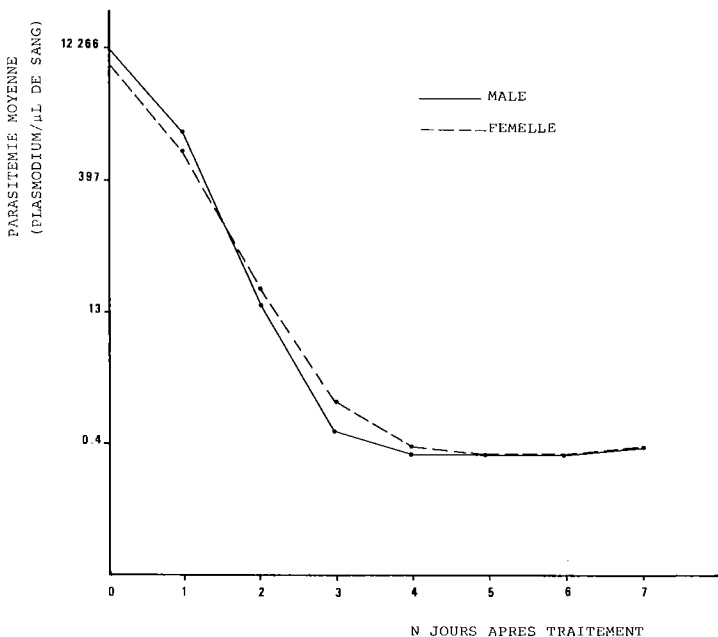


Figure 7.
Evolution post-thérapeutique de la parasitémie selon le sexe.
Traitement à la chloroquine.

Discussion

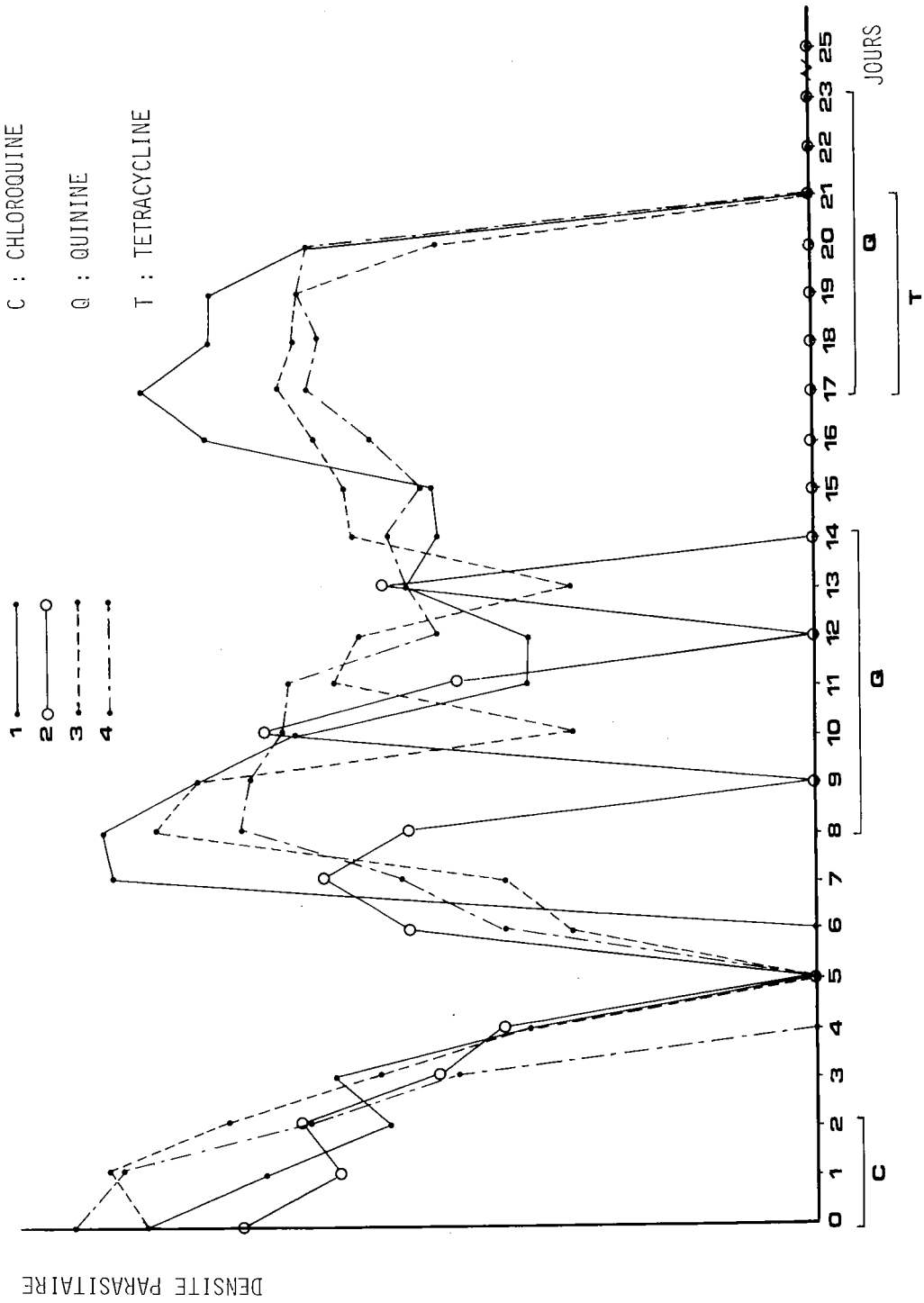
L'étude *in vivo* menée à Kinsuka, banlieue de Kinshasa, chez 101 paludéens soumis à une cure de chloroquine (Nivaquine®) à la dose de 25 mg/kg de poids corporel a mis en évidence 5 cas de résistance probable selon la définition de l'OMS (13) (soit 5%). La résorption de la chloroquine était effective chez tous ces patients.

Les 5 cas de résistance probable ont été tous observés dans le groupe des enfants âgés de moins de 4 ans (soit 15%) du groupe.

L'étude *in vitro* ayant permis de confirmer 1 cas, on peut conclure qu'il existe à Kinshasa des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine.

La résistance constatée est de niveau RI, caractérisée par une disparition de la parasitémie au jour 4 et une recrudescence au jour 7 (Fig. 2).

L'immunité semble jouer un grand rôle dans la mesure de la sensibilité des souches à la chloroquine; tous les cas de résistance se retrouvent dans le groupe des sujets les moins immuns, c'est-à-dire les enfants âgés de moins de 4 ans; chez 4 des 5 cas examinés, la palpation de la rate est pratiquement négative et les anticorps antimalariens n'ont pas été décelés par l'IFI; 2 des 5 enfants ne présentaient pas de fièvre au jour 0; ceci confirme les observations d'autres auteurs (2).



DENSITE PARASITAIRE

Figure 8. Evolution post-thérapeutique des 4 cas probables de chimiorésistance.

Par contre l'enfant de 7 ans qui n'a pas présenté de résistance *in vivo* mais bien *in vitro* avait un titre d'anticorps égal à 1/800 en IFI. Ceci montre bien que l'immunité intervient dans la réponse d'une infection à la chloroquine.

Nous avons observé que les enfants paraissaient en bonne santé malgré la persistance de la parasitémie. Celle-ci n'a disparu qu'après une cure de quinine associée aux tétracyclines au jour 21 pour 3 des 4 cas; 1 cas s'est négativé au jour 15 (Fig. 8). Cette persistance de la parasitémie n'est probablement pas due à une résistance du parasite à la quinine mais à un sous-dosage thérapeutique, la dose donnée étant de 10-20 mg/kg/j pendant 7 jours; de plus les enfants ont vomi et craché le médicament au début de la cure.

A part ces quelques observations de résistance, les souches de *Plasmodium falciparum* sont encore très sensibles à la chloroquine à Kinshasa : la parasitémie a presque disparu au jour 3 (Fig. 2 et 3). Curieusement les 5 enfants ayant une souche résistante *in vivo* appartiennent à des ethnies de l'est du Zaïre (Kivu et Kasai). Kinsuka est un village où presque toutes les ethnies et principalement celles de l'est, sont représentées et où la population est fort mobile (il y a beaucoup d'anciens soldats). Quand Nguyen-Dinh *et al.* (11) ont fait leur enquête à Kinshasa en 1983 ils n'ont mis en évidence aucune souche résistante ni *in vivo* ni *in vitro*, sans doute parce que la population examinée était plus âgée et que d'autre part, les individus qui la composaient étaient essentiellement originaires du Bas-Zaïre et du Bandundu (habitants des zones de Mont Ngafula, Ngaba et Livulu).

Ce phénomène de résistance progresse à travers le Zaïre d'Est en Ouest et tend à s'installer à Kinshasa.

Nous pouvons conclure que :

1. des souches résistantes à la chloroquine existent à Kinshasa;
2. on les détecte le plus facilement chez les individus non-immuns, âgés de moins de 4 ans. Les souches résistantes semblent cliniquement bien supportées;
3. la grande majorité des souches de *Plasmodium falciparum* ont gardé une grande sensibilité à la chloroquine.

A la suite de ces conclusions il nous semble judicieux, avant de passer à une autre drogue antipaludique pour traiter la malaria chez les enfants âgés de moins de 4 ans, de tester la sensibilité du parasite à des doses supérieures à 25 mg/kg de poids corporel, ou d'utiliser l'amodiaquine (Flavoquine®), Camoquine®, une autre 4-aminoquinoléine (16). La dose de 35 mg de chloroquine-base/kg de poids corporel est recommandée par certains auteurs français (3).

Remerciements — Nous remercions sincèrement les Citoyens Makengo Nzambi, Technicien au Service de Parasitologie, Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa et Benkanga Impeli, Infirmier au Centre de Santé de Kinsuka, qui nous ont apporté une aide technique très appréciée tant sur le terrain qu'au laboratoire.

In vivo response of *P. falciparum* to chloroquine in a suburban area of Kinshasa (Zaire).

Summary — A survey was carried out in Kinsuka, a suburban area of Kinshasa, between July and November 1984. 500 individuals, mainly children were examined amongst whom 166 showed trophozoites in the thick blood film (33,2 %).

A standard dose of 25 mg of chloroquine base per kg of body weight was given. 101 children were followed daily during 7 days.

The majority (95%) of the strains of *P. falciparum* were sensitive to chloroquine, among which two (2%) showed a delayed clearance. 5% of the strains were found to be probably resistant. The resistance was confirmed *in vitro* for one strain.

The present observations show once more that immunity has an influence on the demonstration of resistance. The individuals harbouring resistant strains are all children below the age of 4 showing little or no antibodies detectable in immunofluorescence.

REFERENCES

1. Aronsson B, Bengtsson B, Bjorkman A : Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Madagascar and Kenya. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 1981, **75**, 367-373.
2. Carme B, Gentilini M : Résistance de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléines en Afrique. *Rev. Méd. du Congo*, 1981, **1**, 57-63.
3. Charmot G, Coulaud JP, Le Bras J : La chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique : situation actuelle et propositions de méthodes de surveillance. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1983, **76**, 129-136.
4. De Cock KM, Armittage J, Markey AC, Draper CD : Possible case of RIII chloroquine resistant malaria from East Africa. *Lancet*, 1983, **i**, 773-774.
5. Delacollette C, Binyingo Embonga, Malengreau M : Response to chloroquine of infections with *Plasmodium falciparum* in the Kivu region of Zaire. Preliminary observations. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1983, **63**, 171-173.
6. Eke RA : Possible chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Nigeria. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1979, **28**, 1074-1075.
7. Fadeke Aderounmu A : Chloroquine-sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Ibadan, Nigeria : correlation of *in vivo* and *in vitro* sensitivity. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1981, **75**, 637-640.
8. Fogh S, Jepsem S, Effers P : Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1979, **73**, 228-229.
9. Lelijveld J, Kortmann H : The eosin colour test of Dill and Glazko : a simple field test to detect chloroquine in urine. *Bull. WHO*, 1970, **42**, 477-479.
10. Mazier D, Danis M, Druille P, Karabinis A, Brucker C, Felix H, Gentilini M : Paludisme à *Plasmodium falciparum* multi-résistant contacté en Tanzanie. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1984, **77**, 44-51.
11. Nguyen-Dinh P, Schwartz IK, Sexton JD, Bomboto B, Botomwito B, Kalisa R, Ngimbi NP, Wéry M : *In vivo* and *in vitro* susceptibility to chloroquine of *Plasmodium falciparum* in Kinshasa and Mbuji-Mayi, Zaire. Communication at the Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (San Antonio, Texas), 1983.
12. Olatunde A : Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* and malaria in Africa. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1977, **71**, 80-81.
13. O. M. S. : Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. OMS, Sér. Rapp. techn., 1973, n° 529.
14. Peterson T, Kyronseppa M, Pitkanen T : Chloroquine resistant *falciparum* malaria from East Africa. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1981, **75**, 112-113.
15. Varnai F : Chloroquine-resistant malaria case imported from Tanzania. OMS Doc. Roneo, WHO/MAL/81.943.
16. Watkins WM, Sixsmith DG, Spencer HC, Boriga DA, Kariuki DM, Kipingor T, Koech DK : Effectiveness of amodiaquine as treatment for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* infections in Kenya. *Lancet*, 1984, **i**, 357-359.
17. Wéry M, Coosemans M : La résistance médicamenteuse dans le paludisme. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1980, **60**, 137-162.