

7012  
90-163

42

# ÉVALUATION COMPARÉE PAR ELISA ET PAR DISSECTION DE L'INFECTION PLASMODIALE DES ANOPHÈLES Conséquences sur l'estimation de la transmission du paludisme en 1995 à Ndiop, Sénégal

SOKHNA C.S.\*, DIAGNE N.\*, LOCHOUARN L.\*\*, ROGIER C.\*\*\*,  
TRAPE J.F.\*, SPIEGEL A.\*\*\* & FONTENILLE D.\*\*

**Summary :** A COMPARISON BETWEEN ELISA AND DISSECTION FOR DETECTION OF *PLASMODIUM* INFECTIONS IN *ANOPHELES* MOSQUITOES. CONSÉQUENCES OF THE ESTIMATION OF MALARIA TRANSMISSION IN NDIOP, SENEGAL IN 1995

An entomological study was carried out in Ndiop village, Senegal, an area of sudan-type savana, from January to December 1995, to compare the malaria inoculation rate measured by the dissection of salivary glands of anophelines and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mosquitoes were sampled by night-bite collections. Species from the *Anopheles gambiae* complex were identified using the polymerase chain reaction. 1292 females *Culicidae* were collected. 597 anophelines mosquitoes known to be malaria vectors were captured during 148 man-nights of capture. Of the 572 anophelines investigated, 14 were positive using dissection while 21 were found to be positive with ELISA. The sporozoite rates were 2.5 %, 2.2 % and 3.8 % for *An. arabiensis*, *An. gambiae* and *An. funestus*, respectively. The circumsporozoite rates were 3.5 %, 2.2% and 7.7 % for these three species, respectively. ELISA detected 1.5 times more positive mosquitoes than dissection. These results are discussed with reference to the duration of the sporogonic cycle, the delay before CSP antigens are apparent, and the daily survival rate of *Anopheles* mosquitoes.

**KEY WORDS :** Sporozoite, CSP, malaria, transmission, *An. arabiensis*, *An. gambiae*, *An. funestus*, Sénégal.



La mesure du taux d'infestation des moustiques vecteurs du paludisme est classiquement effectuée à partir de la dissection et de l'observation au microscope des glandes salivaires; elle permet de calculer l'indice sporozoïtique (ISP) correspondant au rapport du nombre de moustiques porteurs de sporozoïtes sur le nombre total de moustiques examinés. Cette observation directe ne permet pas de caractériser l'espèce de *Plasmodium* en cause. Plus récemment, des investigations faites sur la protéine circumsporozoïtique (CSP) exprimée en surface des sporozoïtes et la production d'anticorps monoclonaux contre cette pro-

**Résumé :**

Une étude entomologique a été effectuée à Ndiop, un village de savane soudanienne au Sénégal, afin de comparer le taux d'inoculation du paludisme mesuré par l'examen microscopique des glandes salivaires des anophèles à celui mesuré par la recherche d'antigène CSP (circumsporozoïte protéin) en ELISA dans les têtes-thorax de ces vecteurs. La collecte des moustiques a été faite de janvier à décembre 1995 à partir de captures de nuit sur sujets humains. Un total de 148 hommes-nuits de capture a permis la collecte de 1292 *Culicidae* femelles dont 597 anophèles. Sur 572 anophèles étudiés, 14 étaient positifs en dissection et 21 en ELISA. Pour *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. funestus*, l'indice sporozoïtique a été respectivement de 2,5 % (n = 360), 2,2 % (n = 186) et 3,8 % (n = 26). L'indice circumsporozoïtique a été de 4,2 % (n = 360), 2,2 % (n = 186) et 7,7 % (n = 26). L'ELISA a détecté 1,5 fois plus de moustiques infectés, toutes espèces de moustique confondues, que la dissection des glandes salivaires. Ce rapport de 1,5 est discuté en relation avec la durée du cycle sporogonique, le délai d'apparition de l'antigène CSP et le taux quotidien de survie des anophèles.

**MOTS CLÉS :** Sporozoïte, CSP, paludisme, transmission, *An. arabiensis*, *An. gambiae*, *An. funestus*, Sénégal.

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : Bx16486 Ex: 1

téine spécifique de l'espèce plasmodiale, ont permis la mise au point de nouvelles techniques pour détecter des moustiques infectés, en particulier une méthode immuno-enzymatique (ELISA) (Burkot *et al.*, 1984). Cette méthode permet de calculer l'indice circumsporozoïtique (ICSP) correspondant au nombre de moustiques porteurs de CSP dans leur tête-thorax sur le nombre total de moustiques testés par la technique ELISA. Comparée à la dissection, la technique ELISA présente de nombreux avantages : elle permet de différer l'analyse, de tester rapidement les moustiques capturés, d'avoir une notion sur la charge sporozoïtaire et de préciser l'espèce plasmodiale en cause. Cependant l'ELISA peut surestimer les taux d'infection réels en détectant l'antigène CSP libre, non fixé sur les sporozoïtes, avant que ces derniers aient atteint les glandes salivaires (Boudin *et al.*, 1988; Beier *et al.*, 1990; Adungo *et al.*, 1991; Ferreira & Ferreira, 1993).

L'objectif de notre étude était de comparer les taux d'inoculation entomologique du paludisme obtenus

\* Laboratoire de Paludologie, ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.

\*\* Laboratoire ORSTOM de Zoologie Médicale à l'Institut Pasteur, BP 220, Dakar, Sénégal.

\*\*\* Service d'Epidémiologie, Institut Pasteur, BP 220, Dakar, Sénégal

Correspondance: C.S. Sokhna.

Tél.: (221) 832-09-62 - Fax: (221) 832-16-75 - e-mail: Cheikh.Sokhna@orstom.sn

par ces deux méthodes dans un village du Sénégal où les vecteurs du paludisme ne sont abondants que sur une courte période de l'année lors de la saison des pluies et le début de la saison sèche et de vérifier si la technique ELISA pouvait être utilisée dans l'étude de la transmission palustre.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### ZONE D'ÉTUDE

Le village de Ndiop (13° 41' Nord, 16° 23' Ouest) est situé en zone de savane soudanienne, à 285 km au sud-est de Dakar et à une dizaine de km au nord de la frontière gambienne (fig. 1). Ce village de 350 habitants est distant de 5 km de celui de Dielmo, où sont également menées des études sur la transmission anophélienne du paludisme, l'infection plasmodiale et la symptomatologie clinique (Trape *et al.*, 1994; Trape & Rogier, 1996). L'alternance annuelle d'une longue saison sèche (novembre à juin) suivie d'une saison des pluies plus courte (juillet à octobre) est caractéristique de la région. La moyenne des précipitations de 1993 à 1996 a été de 673 mm. En 1995, année de l'étude, la pluviométrie était de 860 mm. Pendant la saison des pluies, il existe de nombreuses mares temporaires qui s'assèchent rapidement dès le début de la saison sèche. La température moyenne annuelle est de 26°C (minimum : 24°C en janvier, maximum : 28°C en mai). Les caractéristiques du village ont été décrites par ailleurs (Fontenille *et al.*, 1997b).

Les études parasitologiques et cliniques effectuées à Ndiop montrent que des accès palustres surviennent dans tous les groupes d'âge avec cependant une incidence maximum avant 12 ans (Rogier & Trape, 1995). L'indice plasmodique global est inférieur à 40 % en moyenne pendant la majeure partie de l'année mais peut atteindre 60 % en fin de saison des pluies. *Plasmodium falciparum* est observé sur 98 % des gouttes épaisses positives. Les autres espèces, *P. malariae* et *P. ovale*, sont faiblement représentées avec respectivement 6,5 % et 1 % des gouttes épaisses positives (Ba, 1995).

### COLLECTE ET DISSECTION DES MOUSTIQUES

Les anophèles ont été capturés par huit jeunes adultes volontaires constituant quatre équipes de deux captureurs, deux à l'intérieur et deux à l'extérieur des habitations; chaque captureur travaillant et se reposant alternativement pendant une heure. Les séances de captures de nuit ont été effectuées de 19 h à 7 heures pendant une année à raison d'une capture mensuelle de janvier à avril 1995 pour quatre hommes-nuit et une capture hebdomadaire de mai à décembre 1995 pour

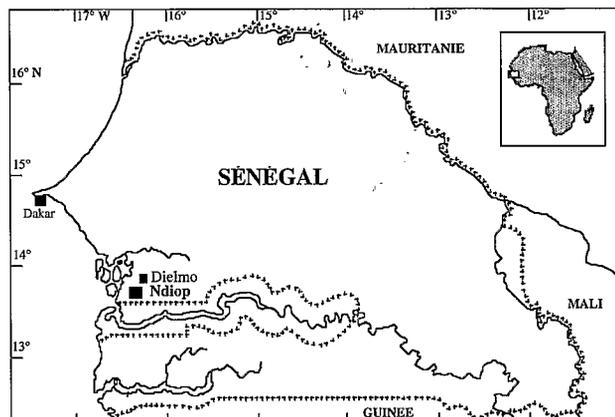


Fig. 1. – Carte du Sénégal montrant la localisation de Ndiop.

16 à 20 hommes-nuit par mois. A la fin de chaque heure, les anophèles ont été collectés, dénombrés et identifiés. Les glandes salivaires ont été disséquées puis placées entre lame et lamelle dans une goutte de sérum physiologique. Les sporozoïtes ont été recherchés au microscope à l'objectif 10X, à l'état frais et sans coloration, après écrasement des glandes salivaires. L'âge physiologique des anophèles a été déterminé par la méthode de Detinova (1963). L'ensemble tête-thorax de toutes les femelles disséquées a été placé dans un tube de 1,5 ml en présence d'un dessiccateur, puis conservé à -20°C. En cas de présence de sporozoïtes, la lamelle a été retirée et rincée avec du sérum physiologique et les glandes salivaires ont été séchées sur la lame puis conservées à -20°C.

### TRAITEMENT DES ANOPHÈLES

Au laboratoire, à Dakar, les têtes-thorax de tous les anophèles ont été broyés dans 400 µl de tampon et l'antigène CSP a été recherché par la technique ELISA décrite par Burkot *et al.*, (1984) et modifiée par Wirtz *et al.* (1987). De même, les glandes salivaires dans lesquelles des sporozoïtes ont été observées, ont été récupérées, broyées dans 200 µl de tampon et testées par ELISA. Des plaques d'immunotitration de 96 puits ont été sensibilisées avec des solutions d'anticorps monoclonaux (AcM) de capture de *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. malariae*. Les anticorps ont été produits par R. Wirtz (Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC, USA). 50 µl de solution de moustique ont été déposés dans chaque puits, puis après incubation, 50 µl d'une solution d'AcM spécifique d'espèce plasmodiale conjugués à la peroxydase ont été ajoutés. Le complexe anticorps-antigène formé a été révélé par une solution de substrat de la peroxydase. La lecture des résultats a été effectuée dans un spectrophotomètre et le seuil de positivité fixé à deux fois la moyenne de la densité optique des témoins négatifs.

L'identification des membres du complexe *An. gambiae* a été faite selon une technique de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) décrite par ailleurs (Fontenille et al., 1993). Les pattes et les ailes ont été broyées et le DNA extrait a été ajouté au milieu réactionnel contenant le tampon de réaction, des dNTPs, les amorces, la Taq polymérase. L'amplification a été faite selon les modalités suivantes : cinq minutes à 94 °C suivies par 30 cycles (dénaturation pendant une minute à 94 °C, hybridation pendant 50 secondes à 50 °C et élongation à 72 °C pendant 50 secondes) et cinq minutes à 72 °C. Les échantillons amplifiés ont été révélés par le bromure d'éthidium après une électrophorèse sur gel d'agarose. L'amplification de l'ADN d'*An. arabiensis*, d'*An. gambiae* et d'*An. melas* a produit respectivement des fragments de 315, 390 et 464 paires de bases. Cette technique a été validée en Afrique de l'Ouest (Fontenille et al., 1993). Un échantillon d'anophèles du complexe *gambiae* a été tiré au sort lors de chaque mission et les individus identifiés par PCR. Par ailleurs, tous les moustiques trouvés positifs en dissection ou en ELISA ont également été identifiés par PCR.

#### ÉVALUATION DE LA TRANSMISSION

Le taux quotidien d'inoculation entomologique désigne le produit du nombre moyen de piqûre par homme et par nuit par l'indice sporozoïtique ou circumsporozoïtique, mesuré chaque semaine dans notre étude. Le nombre annuel de piqûres infectantes a été calculé en additionnant les taux hebdomadaires d'inoculation entomologique (taux quotidien  $\times$  7). Le taux de parturité qui reflète l'âge physiologique moyen d'une population est égal au nombre de femelles pares divisé par la somme des femelles pares et nullipares. Les tests de  $\chi^2$  sur série appariée, de  $\chi^2$  avec ou sans la correction de Yates selon les conditions de validité, ont été utilisés.

## RÉSULTATS

#### BIOLOGIE DES VECTEURS

Les 37 séances de captures sur sujets humains (148 hommes-nuits) effectuées à Ndiop en 1995 ont permis la collecte de 1292 *Culicidae* femelles dont 597 anophèles parmi lesquels 565 du complexe *Anopheles gambiae* (94,6 %), 28 *An. funestus* (4,7 %) et quatre *An. pharoensis* (0,7 %). Un échantillon de 200 femelles (33,5 %) du complexe *An. gambiae* tiré au sort au cours des différentes missions puis testé par PCR a montré la présence de deux espèces jumelles : *An. arabiensis* (66 %) et *An. gambiae* s.s. (34 %). *An. melas* n'a pas été observé.

Le nombre moyen de piqûres par homme par nuit pour la période d'étude a été estimée à 4,0 (2,5 P/H/N d'*An. arabiensis*, 1,3 P/H/N d'*An. gambiae* et 0,2 P/H/N d'*An. funestus*). *An. pharoensis* a été peu fréquent. Il n'est pas vecteur du paludisme dans cette zone. Les deux principales espèces vectrices ont été plus endophages qu'exophages (59,8 % des collections ont été effectuées à l'intérieur pour *An. gambiae* et 57,2 % pour *An. arabiensis*; différence non significative entre les deux espèces :  $p = 0,58$ ). Les premiers anophèles ont été capturés en juillet, environ un mois après la mise en eau des gîtes larvaires par les premières pluies. L'agressivité a atteint un maximum en août-septembre et a fortement diminué début octobre (fig. 2). Les dernières femelles agressives ont été capturées fin octobre. Le taux de parturité moyen a été de 93 %, 91 % et 96 % respectivement pour *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus*.

#### ÉVALUATION DE LA TRANSMISSION, COMPARAISON DISSECTION-ELISA

Sur les 572 femelles d'anophèles disséquées et testées, 14 étaient positives en dissection et 21 en ELISA. Le tableau I présente les résultats par espèces et par méthode. Il n'y a pas de différence significative du taux de positivité entre *An. gambiae* et *An. arabiensis* que ce soit en dissection (2,2%-2,5%,  $p = 0,96$ ) ou en ELISA (2,2 %-4,2 %,  $p = 0,38$ ). L'ELISA détecte 1,5 (IC95%: 1,06-2,11) fois plus de moustiques infectés, toutes espèces de moustique confondues, que la dissection des glandes salivaires; la différence est significative ( $\chi^2$  série appariée corrigée = 4,  $p < 0,05$ ). Une femelle a été trouvée positive en dissection et négative en ELISA.

	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. funestus</i>
Nombre disséqué et testé	360	186	26
Dissection			
Nombre positif	9	4	1
%	2,5 %	2,2 %	3,8 %
IC95 %	1,1-4,7 %	0,6-5,4 %	0,1-19,6 %
ELISA CSP			
Nombre positif	15 *	4	2
%	4,2 %	2,2 %	7,7 %
IC95 %	2,4-6,8 %	0,6-5,4 %	0,9-25,1 %

IC95 % : intervalle de confiance à 95 %

\* Un *Anopheles* du complexe *gambiae* qui n'a pas pu être déterminé par PCR, capturé le 21 août 1995 alors qu'*An. arabiensis* représentait 90% des anophèles du complexe, a été rattaché à cette espèce.

Tableau I – Répartition du nombre de glandes salivaires positives en dissection et têtes-thorax positifs en ELISA en fonction de l'espèce vectrice. Ndiop 1995.

## Nombre de piqûres par homme par nuit

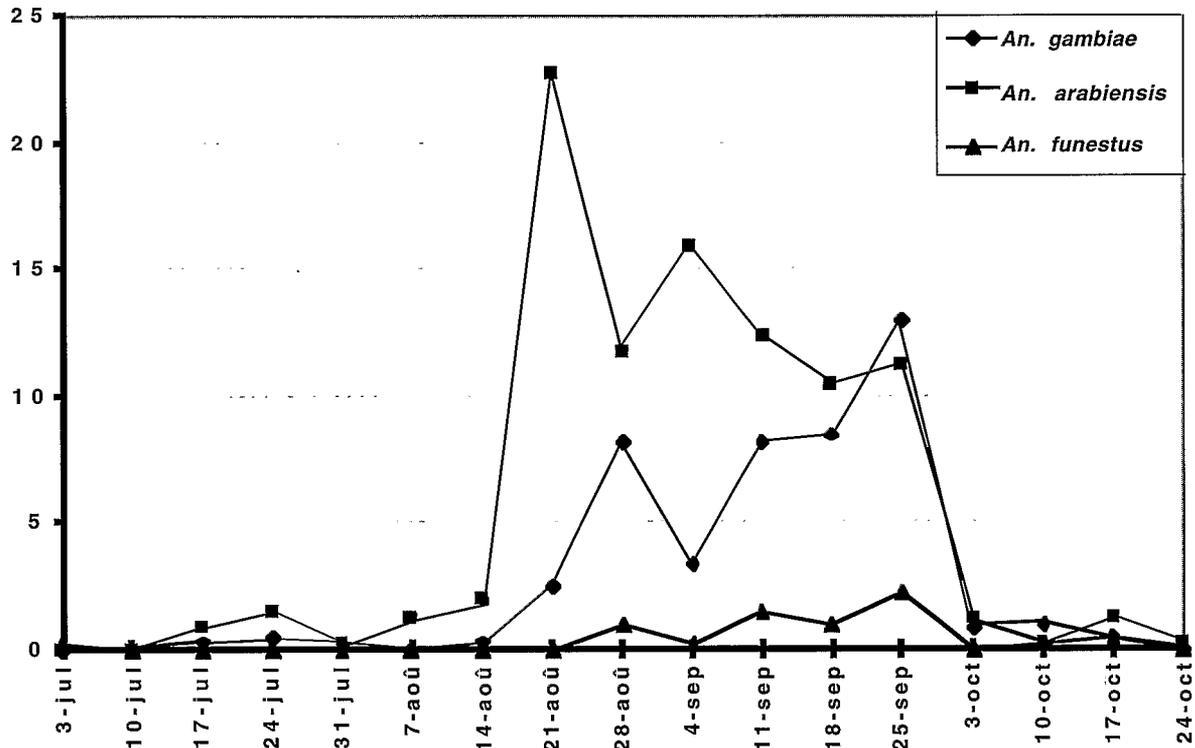


Fig. 2. – Variations du nombre de femelles capturées par homme par jour (ma) pour *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. funestus* en 1995 dans le village de Ndiop, Sénégal.

tive en ELISA (lame de glandes salivaires et tête-thorax) (tableau II). Le moustique positif en dissection et négatif en ELISA vis-à-vis de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* a également été testé vis-à-vis de *P. vivax* afin de vérifier si les sporozoïtes observés n'appartenaient pas à cette espèce réputée absente de la région. Il était également négatif pour *P. vivax*. L'identification spécifique des antigènes circumsporozoïtiques a montré que *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale* étaient présents respectivement dans 90,5 %, 4,8 % et 9,5 % des infections. La transmission de *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale* a été estimée par ELISA respectivement à 36,8, 1,8 et 3,5 piqûres infectantes par homme et par an, survenant principalement en août et septembre (fig. 3). Si on applique le coefficient de surestimation de 1,5, la

transmission était alors de 24,5, 1,2 et 2,3 piqûres infectantes par homme et par an respectivement pour *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale*.

## DISCUSSION

A Ndiop les principaux vecteurs du paludisme sont *An. arabiensis* et *An. gambiae*, comme dans la plupart des régions du Sénégal (Faye *et al.*, 1994; Konaté *et al.*, 1994; Fontenille *et al.*, 1997a; Lemasson *et al.*, 1997). A Ndiop la transmission du paludisme est saisonnière. Elle s'effectue d'août à octobre, seule période où la densité des populations du complexe *An. gambiae* est élevée. Une prédominance d'*An. arabiensis* sur *An. gambiae* a été observée, ce qui est classique en zone de savane sahélienne et soudano-sahélienne où la majeure partie de la transmission est souvent assurée par *An. arabiensis* (Vercruysse & Janclous, 1981; Faye *et al.*, 1992). A Mlomp (Casamance) et à Bandafassi (Sénégal Oriental), *An. gambiae* est largement dominant (Fontenille & Trape, non publié). A Ndiop, *An. funestus* a été capturé en faible nombre. Cependant deux femelles étaient positives en ELISA. Cette espèce qui se raréfie dans beau-

		DISSECTION		Total
		Positif	Négatif	
ELISA CSP	Positif	13	8	21
	Négatif	1	550	551
	Total	14	558	572

Tableau II – Répartition du nombre de femelles vectrices positives et négatives selon la méthode utilisée. Ndiop 1995.

## Taux hebdomadaire d'inoculation entomologique

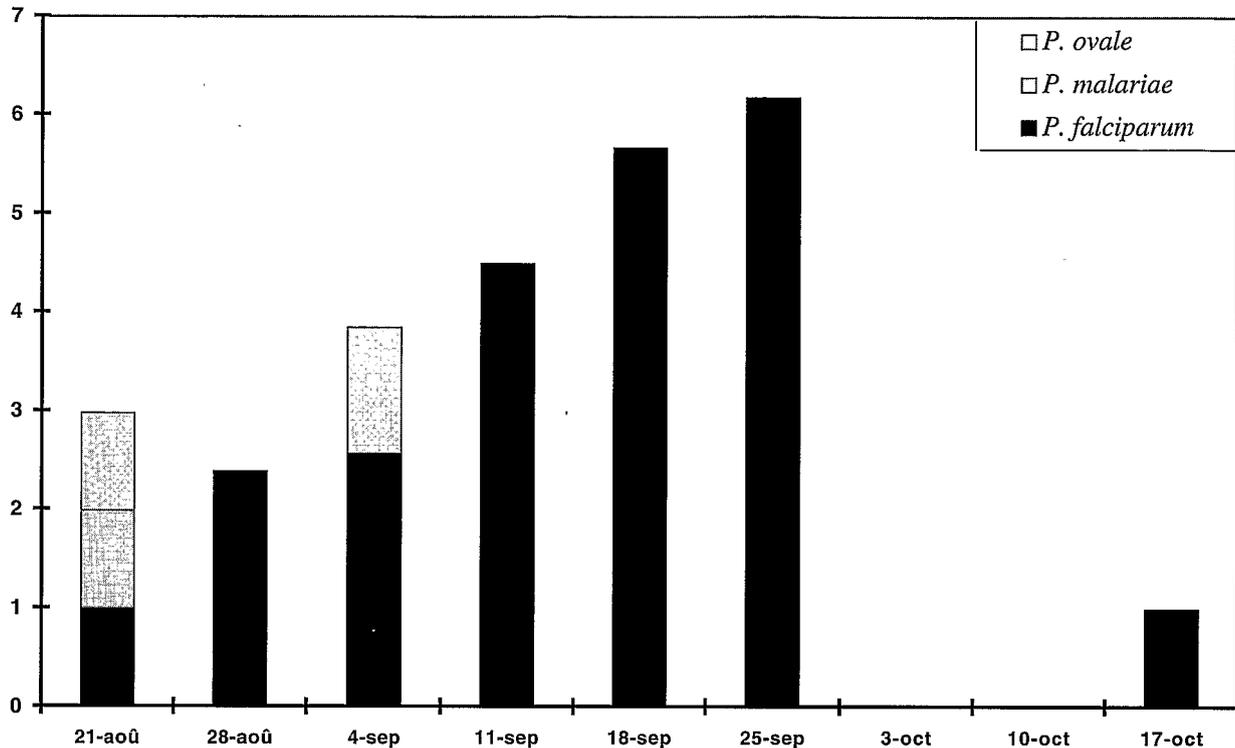


Fig. 3 – Taux d'inoculation entomologique hebdomadaire (h) de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* mesurée en ELISA en 1995 dans le village de Ndiop, Sénégal.

coup de régions du Sénégal (Diagne *et al.*, 1994; Faye *et al.*, 1995b; Mouchet *et al.*, 1996) peut jouer un rôle important dans la stabilité du paludisme dans les zones où elle est vectrice (Konaté *et al.*, 1994; Trape *et al.*, 1994; Fontenille *et al.*, 1997a).

L'ELISA, réalisé sur les têtes-thorax, a détecté 1,5 fois plus de moustiques infectés que la classique dissection des glandes salivaires suivie de la recherche des sporozoïtes au microscope. Au Kenya, à partir d'ELISA réalisés directement sur les glandes salivaires, Beier *et al.* (1990) avaient trouvé un coefficient de surestimation de 1,45 et Adungo *et al.* (1991) des coefficients de 1,10 à 1,44. L'indice sporozoïtique déterminé par ELISA a toujours été supérieur ou égal à celui obtenu par dissection, comme l'ont également observé Boudin *et al.* (1988) au Burkina Faso. La technique ELISA ne différencie pas les femelles infectées de celles réellement infectantes pour l'hôte. La limite de cette technique concerne surtout l'inaptitude à certifier la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires de moustiques dont les têtes-thorax eux-mêmes sont porteurs d'antigènes sporozoïtiques (Lombardi *et al.* 1987, Robert *et al.* 1988). Cependant, cette technique présente, par rapport à la dissection des glandes salivaires, l'avantage de pouvoir être réalisée sur du matériel biologique congelé ou séché et conservé plusieurs mois

avant d'être testé. Elle permet également la détermination de l'indice circumsporozoïtique par espèces plasmodiales. Inversement, la fiabilité de la méthode de dissection des glandes salivaires suivie de la recherche des sporozoïtes au microscope n'est pas parfaite. Ainsi, un certain nombre de glandes salivaires faiblement infectées peuvent paraître négatives à l'examen microscopique, même par un microscopiste expérimenté, et l'indice sporozoïtique est alors sous-estimé. Dans une étude réalisée au Kenya, Beier *et al.* (1990) ont obtenu une sensibilité de 92,1 % pour la dissection simple comparée à la dissection suivie de la coloration des glandes salivaires au Giemsa. Par ailleurs des moustiques dont les glandes salivaires sont positives peuvent être négatifs par ELISA. Dans notre étude une lame de glandes salivaires d'*An. arabiensis* a été trouvée positive en dissection et négative en ELISA (lame de glandes salivaires et tête-thorax) même vis-à-vis de *P. vivax*. Cette observation peut s'expliquer soit par une erreur de lecture des glandes salivaires c'est-à-dire un manque de spécificité, car d'autres parasites tels que les microsporidies d'insectes pourraient être confondus avec des sporozoïtes, soit par un faux négatif en ELISA. Beier *et al.* (1990) ont ainsi observé 21 % de faux négatifs sur 38 moustiques dont les glandes salivaires étaient positives à la dissection. Une

étude de concordance sur nos résultats par le coefficient Kappa a cependant montré une bonne concordance entre les deux méthodes (0,735,  $p = 10^{-6}$ ).

Boulanger *et al.* (1988) ont montré que l'antigène CSP est détectable par immunofluorescence indirecte à l'intérieur des oocystes en maturation cinq jours avant que les sporozoïtes aient atteint les glandes salivaires. Il semble cependant que de l'antigène CSP soluble n'apparaisse dans l'hémolymphe et les divers organes du moustiques que lors de la migration des sporozoïtes (Beier *et al.*, 1992), soit environ deux à trois jours avant que les glandes salivaires ne soient infectées (Vaughan *et al.* 1992). Ce délai est par ailleurs fonction de la durée du cycle extrinsèque des *Plasmodium* donc de la température. Plus la température est élevée plus le cycle est court et plus le délai de migration des sporozoïtes est court. Ainsi une des explications de la surestimation du taux d'infection mesuré par ELISA sur les tête-thorax par rapport à la dissection peut être approchée théoriquement. La technique ELISA détecte l'antigène CSP soluble et les sporozoïtes en migration ou dans les glandes salivaires. Ainsi un moustique pourrait être positif en ELISA deux à trois jours avant d'être positif, toute sa vie durant, en dissection et en ELISA. La surestimation de l'ELISA (nombre de moustiques positifs en ELISA/nombre de moustiques positifs en dissection) peut donc être en partie estimée par le nombre de moustiques d'une cohorte présents au jour J divisé par le nombre de moustique présents deux (ou trois) jours plus tard. Le taux de survie journalier « p » est égal à la racine carrée du taux de parturité, considérant un cycle trophogonique de 48 heures (Davidson, 1954). Ainsi s'il y a N moustiques à J0, il y aura  $p^2N$  moustiques à J2 (et  $p^3N$  moustiques à J3). Si les deux méthodes avaient des sensibilité et spécificité de 100 %, et que le taux de survie quotidien des moustiques restait constant au cours du temps, la surestimation théorique de l'ELISA serait égale à  $N/p^2N$  (ou  $N/p^3N$ ), soit  $1/p^2$  (ou  $1/p^3$ ). A Ndiop en 1995, le taux de parturité moyen de 0,92 observé pour les anophèles du complexe *An. gambiae* donne un taux de survie journalier de  $p = 0,959$ , soit  $1/p^2 = 1,09$  (ou  $1/p^3 = 1,13$ ). Ces valeurs différentes du facteur 1,5 observé suggèrent : (1) soit une mauvaise lecture des lames des glandes salivaires, c'est à dire un manque de sensibilité, peu probable en raison de l'attention particulière portée à ce protocole; (2) soit une mauvaise estimation du taux de parturité due à une mauvaise interprétation de l'état des trachéoles ovariennes (Detinova 1963); (3) soit une présence de l'antigène CSP soluble dans le thorax plus précoce que ce qui est supposé; (4) soit enfin une mauvaise spécificité de la méthode ELISA à l'origine de faux positifs.

En ce qui concerne notre laboratoire, la spécificité de l'ELISA semble supérieure à ce que d'autres auteurs ont observé. De 1992 à 1994, les glandes salivaires de

4 613 femelles d'*Anopheles pharoensis*, possible vecteur secondaire du paludisme dans la vallée du fleuve Sénégal, ont été disséquées et observées au microscope. Aucune ne portait de sporozoïtes. Dans le même temps 3 247 têtes-thorax de femelles d'*An. pharoensis* de la même région ont été testés en ELISA. Tous étaient également négatifs (Faye *et al.* 1995a). Dans ce cas la spécificité de la méthode était de 100 %.

En conclusion, la surestimation de l'ELISA par rapport au nombre probable de moustiques portant effectivement des sporozoïtes dans les glandes salivaires dépend de la température, du taux de parturité, de la sensibilité et de la spécificité de l'ELISA dans le laboratoire où se fait l'étude. Les valeurs obtenues par ELISA ne permettent pas de calculer la valeur exacte de l'indice sporozoïtique, mais elles permettent des comparaisons relatives entre les espèces vectrices, les régions et la dynamique de la transmission.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Charles Bouganali, Mamadou Dansokho et Henri Manga pour leur assistance technique et les habitants de Ndiop qui ont assuré la capture des moustiques. Nous exprimons également nos plus vifs remerciements à Luiz Pereira Da Silva, Pierre Druilhe, Odile Mercereau-Puijalon, Christian Roussillon pour l'appui apporté à cette étude et à Vincent Robert pour ses conseils et sa lecture critique du manuscrit.

Ce travail a bénéficié d'un soutien financier de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (Orstom) et du Ministère de la Coopération et du Développement (France).

## BIBLIOGRAPHIE

- ADUNGO N.I., MAHADEVAN S., MULAYA N.L., SITUBI A.P. & GITHURE J.I. Comparative determination of *Plasmodium falciparum* sporozoïte rates in Afrotropical *Anopheles* from Kenya by dissection and ELISA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1991, 4, 387-394.
- BA F. Le paludisme en zone mésoendémique: étude longitudinale entomo-parasitologique à Ndiop, Sénégal. *Mémoire de DEA*, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, 1995, 62 p.
- BEIER J.C., PERKINS P.V., KOROS J.K., ONYANGO F.K., GARGAN T.P., WIRTZ R.A., KOECH D.K., & ROBERTS C.R. Malaria sporozoïte detection by dissection and ELISA to assess infectivity of Afrotropical *Anopheles*. *Journal of Medical Entomology*, 1990, 27, 377-384.
- BEIER J.C., VAUGHAN J.A., MADANI A. & NODEN B.H. *Plasmodium falciparum*: release of circumsporozoïte protein by sporozoïtes in the mosquito vector. *Experimental Parasitology*, 1992, 75, 248-256.

- BOUDIN C., ROBERT V., VERHAVE J.P., CARNEVALE P. & MEUWISSEN J.H. E. T. Utilisation de la technique ELISA dans le dépistage des moustiques infectés par *Plasmodium falciparum*. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 1988, 66, 87-97.
- BOULANGER N., MATILE H. & BETSCHART B. Formation of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta Tropica*, 1988, 45, 55-65.
- BURKOT T.R., WILLIAMS J.L. & SCHNEIDER I. Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1984, 33, 783-788.
- DAVIDSON G. Estimation of the survival-rate of anopheline mosquitoes in nature. *Nature*, 1954, 174, 792-793.
- DETINOVA T.S. Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les diptères présentant une importance médicale. *OMS, Monographie*, 1963, 47, 220p.
- DIAGNE N., FONTENILLE D., KONATE L., FAYE O., LEGROS F., LAMIZANA M.T., MOLEZ J.F. & TRAPE J.F. Les anophèles du Sénégal. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1994, 87, 267-277.
- FAYE O., DIALLO S., GAYE O. & MOUCHET J. Évaluation de l'efficacité du fenitrothion sur la densité du vecteur et prévalence du paludisme à Pout, Sénégal. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1992, 72, 103-112.
- FAYE O., GAYE O., FAYE O. & DIALLO S. La transmission du paludisme dans des villages éloignés ou situés en bordure de la mangrove au Sénégal. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1994, 87, 157-163.
- FAYE O., FONTENILLE D., GAYE O., SY N., MOLEZ J.F., KONATE L., HEBRARD G., HERVE J.P., TROUILLET J., DIALLO S. & MOUCHET J. Paludisme et riziculture dans le delta du fleuve Sénégal (Sénégal). *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1995a, 75, 179-189.
- FAYE O., GAYE O., FONTENILLE D., HEBRARD G., KONATE L., SY N., HERVE J.P., TOURE Y., DIALLO S., MOLEZ J.F. & MOUCHET J. La sécheresse et la baisse du paludisme dans les Niayes du Sénégal. *Cahiers Santé*, 1995b, 5, 299-305.
- FERREIRA M.U. & FERREIRA C.S. Malaria sporozoite rates in *Anopheles* mosquitoes: theoretical comparability of salivary gland dissection with the ELISA detection method. *Medical and Veterinary Entomology*, 1993, 7, 304-306.
- FONTENILLE D., FAYE O., KONATE L., SY N. & COLLINS F.H. Comparaison des techniques PCR et cytogénétique pour la détermination des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Sénégal. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1993, 68, 239-240.
- FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIAGNE N.A., SOKHNA C.S., LEMASSON J.J., DIATTA M., KONATE L., FAYE F., ROGIER C. & TRAPE J.F. High annual and seasonal variations in malaria transmission by Anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Sénégal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997a, 56, 247-253.
- FONTENILLE E. D., LOCHOUARN L., DIATTA A. M., SOKHNA C.S., DIA I., DIAGNE N., LEMASSON J.J., BA K., TALL A., ROGIER C. & TRAPE J.F. Four-year entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997b, 91, 647-652.
- KONATE L., DIAGNE N., BRAHIMI K., FAYE O., LEGROS F., ROGIER C., PETRARCA V. & TRAPE J. F. Biologie des vecteurs et transmission de *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* dans un village de savane d'Afrique de l'Ouest (Dielmo, Sénégal). *Parasite*, 1994, 1, 325-333.
- LEMASSON J.J., FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIA I., SIMARD F., BA K., DIOP A., DIATTA A.M. & MOLEZ J.F. Comparison of behaviour and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *Journal of Medical Entomology*, 1997, 34, 396-403.
- LOMBARDI S., ESPOSITO F., ZAVALA F., LAMIZANA L., ROSSI P., SABATINELLI G., NUSSENZWEIG R.S. & COLUZZI M. Detection and anatomical localisation of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and sporozoites in the Afrotropical malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1987, 37, 491-494.
- MOUCHET J., FAYE O., JULVEZ J. & MANGUIN S. Drought and malaria retreat in the Sahel, West Africa. *The Lancet*, 1996, 348, 1735-1736.
- ROGIER C. & TRAPE J. F. Etude de l'acquisition de la prémunition en zones d'holo- et méso-endémie palustre à Dielmo et à Ndiop (Sénégal): résultats préliminaires, 1990-1994. *Médecine Tropicale*, 1995, 55, 71S-76S.
- ROBERT V., VERHAVE J.P., PONNUDURAI T., LOUWE L., SCHOLTENS P. & CARNEVALE P. Study of the distribution of circumsporozoite antigen in *Anopheles gambiae* infected with *Plasmodium falciparum* using the Enzyme linked immunosorbent assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1988, 82, 389-391.
- TRAPE J.F., ROGIER C., KONATE L., DIAGNE N., BOUGANALI H., CANQUE B., LEGROS F., BADJI A., NDIAYE G., NDIAYE P., BRAHIMI K., FAYE O., DRUILHE P. & PEREIRA DA SILVA L. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994, 51, 123-137.
- TRAPE J.F. & ROGIER C. Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitology Today*, 1996, 12, 236-240.
- VAUGHAN J.A., NODEN B.H. & BEIER J.C. Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *Journal of Parasitology*, 1992, 78, 716-724.
- VERCRUYSE J. & JANCLOES M. Etude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans la zone urbaine de Pikine (Sénégal). *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 1981, 19, 165-178.
- WIRTZ R.A., ZAVALA F., CHAROENVIT Y., CAMPBELL G.H., BURKOT T.R., SCHNEIDER I., ESSER K.M., BEAUDOIN R.L. & ANDRE R.G. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bulletin of the World Health Organisation*, 1987, 65, 39-45.

Reçu le 26 juillet 1997  
 Accepté le 28 mai 1998

## PARASITE

Tarif 1998 des annonces classées  
Prices for Classified  
(FF hors taxes)

Diffusion internationale : 600 exemplaires/International circulation : 600 copies

Format/Size	(mm)	Coût Price	+ +	Frais techniques (typons) Technical costs (films)
1 page	L 170 × H 220	7 550		550
2/3 page	L 170 × H 140	5 050		550
1/2 page	L 85 × H 220	3 800		450
1/3 page	L 170 × H 70	3 300		450
1/4 page	L 85 × H 110	2 850		350
1/6 page	L 85 × H 70	1 900		350

Particuliers : publication gratuite en fonction des contraintes éditoriales – règlement des seuls frais techniques.  
Individuals : publication free of charge according to editorial constraints – payment of technical costs only.

Contact : PRINCEPS Editions, 64 av. Charles de Gaulle, F-92130 Issy-les-Moulineaux  
Annonces classées/Classified : Fax 33 (1) 40 95 72 15