

Etude des déterminants du paludisme chez les militaires français déployés en Guyane dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal

Vincent Pommier de Santi

▶ **To cite this version:**

Vincent Pommier de Santi. Etude des déterminants du paludisme chez les militaires français déployés en Guyane dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal. Médecine humaine et pathologie. Université de Guyane, 2017. Français. NNT : 2017YANE0008 . tel-01831945

HAL Id: tel-01831945
https://theses.hal.science/tel-01831945

Submitted on 6 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Guyane

Discipline : *Santé*

Spécialité : *Recherche clinique, innovation technologique, santé publique*

Présentée et soutenue publiquement le *27 juin 2017* par :

VINCENT POMMIER DE SANTI

Etude des déterminants du paludisme chez les militaires français déployés en Guyane dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal.

JURY

Mr Félix DJOSSOU	MD, HDR	Président du Jury
Mme Magalie DEMAR	PU, HDR	Examinateur
Mr Vincent ROBERT	DR, HDR	Rapporteur
Mr Leonardo BASCO	DR, HDR	Rapporteur
Mr Mathieu NACHER	PU, HDR	Directeur de Thèse
Mr Sébastien BRIOLANT	MD, PhD	Co-Directeur de Thèse

Ecole Doctorale n°587 : *Diversités, Santé et développement en Amazonie*

TABLE DES MATIERES

Résumé **5**

Travaux scientifiques pendant la période de thèse **7**

Contexte du paludisme dans les armées françaises et en Guyane **10**

Introduction **21**

1. Epidémiologie du paludisme en forêt guyanaise **22**

1.1 Paludisme en lien avec l'orpaillage illégal 22

Travail original 1 : Investigation d'une épidémie de paludisme. 22

Travail original 2 : Le paludisme en Guyane lié à l'orpaillage illégal. 35

1.2 - Comportement vectoriel 39

Travail original 3 : Risque de transmission diurne du paludisme en forêt Guyanaise. 39

1.3 - Le réservoir des plasmodies en forêt guyanaise 45

Travail original 4 : Paludisme hyperendémique et risque de résistance à l'artémisinine 45

2. Les déterminants de l'infection palustre chez les militaires français en Guyane . 51

Travail original 5 : Incidence et déterminants de l'infection palustre chez les militaires 51

3. Amélioration de la protection individuelle contre les piqûres de moustiques 81

Discussion - Conclusions **84**

Annexe 1 : Most B, Pommier de Santi V, Pagès F, Uedelhoven W and·Faulde M. Long-lasting permethrin-impregnated clothing: Protective efficacy against malaria in hyperendemic foci as well as laundering and environmental effects on residual bioactivity after worst-case use in the rain forests of French Guiana. Parasitol Res. 2017; 116(2): 677-684. 90

Annexe 2 : Vezenegho SB, Adde A, Pommier de Santi V, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Dusfour I, Girod R, Briolant S. High malaria transmission in a forested malaria focus in French Guiana: how can *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention measures? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016; 111(9): 561-9. 107

Résumé

Les militaires français sont engagés depuis 2002 dans des opérations de lutte contre l'orpaillage illégal en Guyane, en forêt comme sur les fleuves. Malgré un programme de prévention du paludisme dimensionné et organisé par le Service de santé des armées, ces opérations se sont accompagnées d'une augmentation très importante de l'incidence du paludisme, à 80% due à *Plasmodium vivax* et 20% *Plasmodium falciparum*. Cette thèse a pour objectif tout d'abord d'identifier les déterminants humains, vectoriels et parasitaires du paludisme en Guyane, mais aussi d'évaluer les différentes stratégies mises en œuvre au sein des forces armées par le Service de santé des armées pour le prévenir. La première partie de cette thèse permet de mieux décrire le faciès épidémiologique du paludisme en forêt guyanaise. Nous avons clairement établi le lien entre paludisme et orpaillage illégal. Une étude, menée en milieu orpailleur a par ailleurs démontré l'existence de foyers de paludisme hyperendémiques, avec une prédominance de *P. falciparum* et un risque réel d'émergence de résistance aux traitements combinés à base d'artémisinine. Nous pouvons considérer que la population des orpailleurs en situation irrégulière constitue le principal réservoir de *P. falciparum* et *P. vivax* en Guyane. Les investigations entomologiques ont tout d'abord permis de confirmer le rôle d'*Anopheles darlingi* comme vecteur majeur du paludisme en forêt mais aussi l'existence d'une activité de piqûre diurne sous la canopée qui pourrait jouer un rôle déterminant dans la survenue d'épidémie chez les militaires. Elles ont permis en outre de mieux identifier les autres vecteurs secondaires en forêt : *An. nuneztovari* et *An. triannulatus*, mais surtout *An. ininii* et *An. marajoara*, avec des taux d'infection par des plasmodies pouvant dépasser 10%. En seconde partie, une étude de cohorte en population militaire a permis d'estimer la réalité de l'exposition au paludisme par l'utilisation d'outils sérologiques. La distribution des preuves sérologiques d'une infection palustre était en faveur d'une exposition plus fréquente à *P. falciparum*, cohérente avec ce qui est retrouvé chez les orpailleurs. Les taux d'incidence des infections étaient très élevés, autour de 40 pour 100 personnes années que ce soit pour *P. falciparum* ou *P. vivax*. Le seul facteur protecteur était l'observance parfaite de la prise quotidienne d'une chimioprophylaxie par doxycycline. La dernière partie de cette thèse porte sur des travaux menés en parallèle sur l'efficacité des treillis imprégnés de perméthrine qui permettent de conclure à leur efficacité, bien que limitée dans le temps.

Abstract

Since 2002, French armed forces are involved in operations against illegal gold mining in French Guiana, in rain forest and along rivers. Despite a properly dimensioned prevention program against malaria conducted by the French military health service, a drastic increase of malaria incidence has been observed among military personnel, mainly due to *Plasmodium vivax* (80%) and *Plasmodium falciparum* (20%). The first part of this thesis aimed to describe the determinants of malaria in French Guiana forest, including human, vector and parasite features. We have clearly established the link between malaria among military personnel and illegal gold mining sites. A study conducted among gold miners' population has shown hyperendemic malaria foci in the rain forest, mainly due to *P. falciparum,* and highlighted a real risk for emergence of artemisinin resistance. We have demonstrated that illegal miners were probably the main reservoir for *P. falciparum* and *P. vivax* in French Guiana forest. Entomologic investigations supported that *Anopheles darlingi* is the main vector for malaria in rain forest. In addition, we have demonstrated the existence of daytime biting activity by *An. darlingi* in the forest, which might play a key role in malaria epidemic outbreaks among military personnel. Other sylvatic vectors were identified, as *An. nuneztovari* and *An. triannulatus*, but especially *An. ininii* and *An. marajoara* found with *Plasmodium* infection rates up to 10%. The second part of the thesis, focused on a prospective cohort study conducted among French military population, highlighted real malaria exposure using serological tools. Serological evidences of *Plasmodium* infection (SEI) were more frequent for *P. falciparum* than *P. vivax*, in agreement with our findings in illegal gold miners' population. SEI incidence rates were high, around 40 per 100 person-years for *P. falciparum* and *P. vivax*. Only complete compliance to malaria chemoprophylaxis using daily 100 mg doxycycline protected against malaria infection. The last part of the thesis was focused on permethrin impregnated military fatigues. The study concluded this was effective but the duration of protection insecticide-impregnated military fatigues was limited (four months).

Travaux scientifiques pendant la période de thèse

Publications associées au travail de thèse

Premier auteur

Pommier de Santi V, Dusfour I, de Parseval E, Lespinet B, Nguyen C, Gaborit P, Carinci R, Hyvert G, Girod R, Briolant S. Risque de transmission diurne du paludisme en forêt Guyanaise. Med Sante Trop. 2017 Feb; 27(1): 111-112.

Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, Bogreau H, Hyvert G, Nguyen C, Pelleau S, Legrand E, Musset L, Nacher M, Briolant S. Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2016 May; 22(5): 903-906.

Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, Nguyen C, Vezenegho SB, Dusfour I, Girod R, Briolant S. Malaria in French Guiana linked to illegal gold mining. Emerg Infect Dis. 2016 Feb; 22(2): 344-346.

Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, Dusfour I, Mendibil A, Simon F, Deparis X, Pagès F. Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. Malar J. 2016 Jan; 15: 35.

Auteur associé

Most B, **Pommier de Santi V**, Pagès F, Uedelhoven W, Faulde M. Long-lasting permethrin-impregnated clothing: Protective efficacy against malaria in hyperendemic foci as well as laundering and environmental effects on residual bioactivity after worst-case use in the rain forests of French Guiana. Parasitol Res. 2017; 116(2): 677-684.

Vezenegho SB, Adde A, **Pommier de Santi V**, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Dusfour I, Girod R, Briolant S. High malaria transmission in a forested malaria focus in French Guiana: how can *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention measures? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016; 111(9): 561-9.

Vezenegho SB, Adde A, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, **Pommier de Santi V**, Dusfour I, Briolant S, Girod R. Mosquito magnet® liberty plus trap baited with octenol confirmed best candidate for *Anopheles* surveillance and proved promising in predicting risk of malaria transmission in French Guiana. Malar J. 2014 Sep 26; 13: 384.

Communications associées au travail de thèse :

Communications orales

Briolant S, **Pommier de Santi V**. Infectious diseases in gold-miners in the Guiana Shield. 20th consecutive year the Symposium on Immunology and Infectious Diseases. 29 – 31 janvier 2015, Paramaribo Surinam.

Briolant S, **Pommier de Santi V**, Djossou F, Barthes N. Epidemiology of malaria in Eau Claire: an illegal gold mining site in French Guyana. Follow-up meeting for the Guyana Shield and Plan or Artemisinin Resistance Containment and Elimination in South America.

World Health Organization and Pan American Health Organization. 11-13 novembre 2014, Paramaribo Suriname.

Vezenegho S, **Pommier de Santi V**, Adde A, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Dusfour I, Girod R, Briolant S. *Anopheles darlingi* maintains high malaria transmission despite usual vector control measures, Oyapock region, French Guiana. 4èmes Journées Interrégionales de veille sanitaire (JIRVS) des Antilles-Guyane. 5-6-7 novembre 2015, Fort de France Martinique.

Communications affichées

Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, Nguyen C, Bogreau H, Hyvert G, Briolant S. Chercher l'or, trouver le paludisme. 4es Journées Interrégionales de veille sanitaire (JIRVS) des Antilles-Guyane. 5-6-7 novembre 2015, Fort de France Martinique.

Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, Nguyen C, Vezenegho SB, Dusfour I, Girod R, Briolant S. Malaria in French Guiana: reality of a situation closely linked to illegal gold mining. 4es Journées Interrégionales de veille sanitaire (JIRVS) des Antilles-Guyane. 5-6-7 novembre 2015, Fort de France Martinique.

Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N et al. Chercher l'or trouver le paludisme. 16e Journées Nationales d'infectiologie, 10 – 12 juin 2015, Nancy.

Autres publications pendant la période de thèse :

Barthes N, Morin F, **Pommier de Santi V**, Briolant S. Un nodule pulmonaire en Guyane : histoplasmose pulmonaire chez un sujet immunocompétent. Med Sante Trop. 2017; 27(1): 26-28.

Mosnier E, Niemetzky F, Stroot J, **Pommier de Santi V**, Brousse P, Guarmit B, Blanchet D, Ville M, Abboud P, Djossou F and Nacher M. A large outbreak of thiamine deficiency among illegal gold miners in French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2017; 96(5): 1248-1252. doi: https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0906.

Corcostegui SP, Lefort H, Dia A, **Pommier de Santi V**, Carfantan C, Galant J, Lightburn E, Guénot P, Deparis X, Migliani R, Morand JJ. Antibiothérapie et infections cutanées staphylococciques en zone impaludée équatoriale (Guyane). Pratiques en situations conventionnelles et d'exception. Med Sante Trop. 2016; 26(4): 432-437.

Watier-Grillot S, Kaouther C, **Pommier de Santi V**, Manet G, Mayet A, Lamand R, Merens A, Ficko C, Marié J-L, Michel R and Bedubourg G. Bilan de l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives dans les armées françaises entre 1999 et 2013. Bull Acad Vet France. 2016; 169(1): 148-154.

Sanchez MA, Corcostégui SP, De Broucker CA, Cabre O, Watier-Grillot S, Perelle S, Ambert-Balay K, **Pommier de Santi V**. Norovirus GII.17 outbreak linked to an infected post-symptomatic food worker in a French military unit located in France. Food Env Virol. 2017; 9(2): 234-237. doi:10.1007/s12560-016-9274-0.

Christen JR, Mura M, Roudault G, Drogoul AS, Demar M, Briolant S, Garnotel E, Simon F, **Pommier de Santi V**. Evolution of the prevalence of intestinal parasitic infections among the French armed forces in French Guiana. J Travel Med. 2016; 24(1): pii: taw070.

Epelboin L, Nacher M, Mahamat A, **Pommier de Santi V**, Berlioz-Arthaud A, Eldin C, Abboud P, Briolant S, Mosnier E, Mendonça Gomes Mdo S, Vreden SG, Pierre-Demar M, Lacerda M, Raoult D, Sampaio de Lemos ER, Djossou F. Q fever in French Guiana: Tip of the iceberg or epidemiological exception? PloS Negl Trop Dis. 2016; 10(5): e0004598.

Paul F, Marimoutou C, **Pommier de Santi V**, Clervoy P. Post-traumatic Stress disorder among French Armed Forces Members in Afghanistan: a new approach. Front Neurol Neurosci. 2016; 38: 228-236.

Pommier de Santi V, Marié J-L, Mahamat A, Djossou F, Lamour T, Raoult D, Edouard S, Davoust B. Spécificité épidémiologiques de la fièvre Q en Guyane. Bull Acad Vet Fr. 2016. 169(1): 148-154.

Corcostegui AP, Dia A, **Pommier de Santi V**, Carfantan C, Lefort H, Galant J, Lightburne E, Deparis X, Migliani R, Morand JJ. Prise en charge des infections cutanées staphylococciques par les médecins et infirmiers militaires déployés en Guyane. Médecine et armées. 2015 ; 43(2): 185-194.

Mosnier E, Carvalho L, Mahamat A, Chappert JL, Ledrans M, Ville M, Renaud M, Chesneau P, Rousset D, Rosine J, **Pommier de Santi V** et al. Epidémies multiples dans des camps d'orpaillage en forêt amazonienne (Guyane Française) en 2013 : Quelles leçons pour l'accès aux soins et la prévention ? Bull Epidemiol Hebd. 2015 ; 11-12: 182-189.

Davoust B, Marié JL, **Pommier de Santi V**, Berenger JM, Edouard S, Raoult D. Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2014; 20(10): 1760-1761.

CONTEXTE DU PALUDISME DANS LES ARMEES FRANÇAISES ET EN GUYANE

Paludisme et armée française

Parmi les risques infectieux rencontrés par les militaires français lors de déploiements, le paludisme est de longue date une préoccupation majeure (1). Deux événements ont ainsi marqué l'histoire et les mémoires : la campagne de Madagascar, en 1895, véritable désastre sanitaire avec près de 6000 cas de paludisme et 30 décès parmi les militaires français ; et l'expédition Salonique ou Front macédonien, en 1916, avec 50% du contingent français atteint de paludisme et 600 décès (2, 3). Actuellement, les déploiements des Forces françaises en zone impaludée concernent presque exclusivement l'Afrique sub-saharienne, à l'exception des départements français de Mayotte et de la Guyane (4). Les personnels militaires peuvent être soit en séjour de longue durée (présence sur le territoire pendant deux à quatre ans) soit en mission de courte durée (présence sur le territoire de quelques semaines à quelques mois). La fin des années 1990 a vu naître le concept des opérations extérieures. Ces opérations sont des engagements avec projection de troupes hors du territoire national, sur un théâtre de crise et ayant pour objectif de contribuer à la gestion de crise. Ces déploiements sont souvent associés à des conditions d'hygiène précaire et à une exposition aux risques infectieux, dont le paludisme (5, 6). Chaque année, près de 40 000 militaires français sont ainsi appelés à servir en zone impaludée, dans une douzaine de territoires et pays différents (7).

Le paludisme est donc considéré comme une priorité de santé publique par le Service de santé des armées (SSA) (8). Pour faire face à ce risque, il met en œuvre une stratégie complète et évolutive, tenant compte des avancées scientifiques et des recommandations nationales et internationales (7, 9). Sa mise en œuvre est formalisée par une Circulaire ministérielle, régulièrement actualisée (10). La stratégie s'articule sur trois axes : limiter le contact homme-vecteur, mettre à disposition une chimioprophylaxie antipalustre adaptée en fonction des résistances de *Plasmodium falciparum*, assurer la meilleure prise en charge possible des cas de paludisme.

Le contrôle vectoriel repose avant tout sur les mesures de protection individuelles contre les piqûres de moustiques. L'objectif est de limiter l'exposition aux piqûres des anophèles. Les moustiquaires de lit en coton imprégné manuellement d'insecticide, historiques, sont

progressivement remplacées par des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action dès la fabrication. L'insecticide utilisé dans les armées est un pyréthrinoïde de synthèse, la perméthrine (11, 12). Chaque militaire déployé en zone impaludé est doté de treillis imprégnés de manière industrielle de perméthrine. Enfin, chaque militaire est doté de flacons de répulsifs cutanés, actuellement à base d'icaridine, et de flacons d'insecticides pour l'imprégnation ou la ré-imprégnation de ses vêtements. À ces mesures s'associent des actions de lutte antivectorielle collectives. Les campements doivent être établis à plus d'un kilomètre des gîtes larvaires potentiels et des populations locales, possibles réservoirs de plasmodies. Les locaux d'habitation doivent être équipés de grillage moustiquaires aux fenêtres et si possible climatisés. Afin que les habitations ne soient pas des gîtes de repos pour les anophèles, de l'insecticide à effet rémanent (perméthrine) est pulvérisé sur les murs intérieurs. Le campement est maintenu propre de tout déchet, désherbé et drainé de ses collections d'eau. Les pulvérisations spatiales d'insecticide (pyréthrinoïdes de synthèse) restent réservées à des situations exceptionnelles, épidémies ou périodes de fortes nuisances vectorielles. Enfin, les collections d'eau persistantes, potentielles gîtes larvaires, sont régulièrement traitées par des larvicides (*Bacillus thuringiensis israelensis* [Bti]) (11, 13). L'ensemble de ces mesures sont préconisées lors des déploiements militaires en zone impaludée. Cependant, les mesures de lutte collectives ne peuvent être mises en œuvre que dans des campements fixes et pérennes.

La chimioprophylaxie antipalustre vient en complément des mesures de protection contre les piqûres de moustiques. Sa prescription reste individuelle, même si le choix des molécules utilisées relève du SSA. Après l'utilisation de la chloroquine, puis de l'association chloroquine-proguanil ou de la méfloquine, la doxycycline est utilisée depuis 2003 en première intention pour toute mission en zone impaludée avec des résistances observées de *P. falciparum* à la chloroquine (14, 15). Le SSA assume sa fabrication et sa délivrance. La posologie est de 100 mg de monohydrate de doxycycline en prise unique quotidienne, pendant toute la durée du séjour et jusqu'à quatre semaines après le retour de zone impaludée. Sa principale limite est sa demi-vie courte (inférieure à 24 heures) qui implique une observance optimale (16). Ses effets secondaires restent limités et bénins, principalement à type de troubles gastro-intestinaux (17). Le SSA dispose en outre d'un laboratoire dédié à la chimiosensibilité des plasmodies aux antipaludiques, Centre national de référence du paludisme (CNRp) associé, qui lui permet d'évaluer sa stratégie de prévention (18, 19). L'absence de résistance prouvée de *P. falciparum* à la doxycycline et l'autosuffisance du SSA

pour sa production en font une molécule de choix pour la chimioprophylaxie antipalustre dans les armées en Afrique comme en Guyane (20, 21).

Parallèlement, le SSA a son propre programme de formation. Il cible en premier lieu les médecins et infirmiers militaires, qui bénéficient, au cours de leur parcours de formation initiale mais aussi dans le cadre du Développement Professionnel Continu, d'enseignements spécifiques sur le paludisme, sa prévention, son diagnostic et son traitement. Ces enseignements sortent du cadre de la simple médecine des voyages et visent à fournir des attitudes pratiques et proches de la réalité de terrain auxquels ces soignants seront confrontés. Ces soignants deviennent des relais d'information et d'éducation auprès des militaires (22). Chaque militaire déployé en zone d'endémie palustre bénéficie ainsi règlementairement d'une information sanitaire sur le paludisme avant son départ (9).

L'évaluation de cette stratégie repose principalement sur les données de la surveillance épidémiologique dans les armées. Depuis 1987, cette surveillance implique les médecins militaires des forces qui ont l'obligation de déclarer chaque lundi par message les cas de paludisme survenus, la semaine précédente, parmi les militaires de leurs unités, quel que soit l'origine de la prise en charge (23). Les cas de paludisme répondent à une définition standardisée : « toute manifestation pathologique avec présence de *Plasmodium* sur frottis sanguin ou goutte épaisse ou QBC® (quantitative buffy coat) positif ou test de diagnostic rapide positif ». Pour chaque cas, une fiche anonyme complète la déclaration par message, indiquant les caractéristiques du malade, le lieu de survenue, les modalités et la qualité de la chimioprophylaxie, le tableau clinique, le diagnostic parasitaire, les modalités de prise en charge, l'évolution, l'indisponibilité et les modalités de protection anti-vectorielle individuelle. Des enquêtes de terrain complètent si besoin les informations fournies par le système de déclaration. Chaque année, un comité scientifique interne au SSA se réunit et cherche à adapter la stratégie au plus près des besoins, en regard des données de la surveillance épidémiologique, de la veille scientifique, du CNRp, des éléments de terrain et des recommandations nationales et internationales.

Le SSA a donc mis en place un programme de prévention du paludisme au sein de la population dont il a la charge qui est cohérent, dimensionné et organisé. Pour autant, des cas de paludisme sont régulièrement déclarés à notre système de surveillance et en moyenne un à deux décès de militaires par paludisme surviennent chaque année. En outre, les opérations extérieures en zone impaludée s'accompagnent souvent d'épidémies majeures (Figure 1). Ce

fut le cas en 2003-2004 pour l'opération Licorne en République de Côte d'Ivoire, en 2008-2011 pour l'opération Harpie en Guyane et en 2014-2016 pour l'opération Sangaris en République Centrafricaine (5, 24). Pour l'Afrique, ces épidémies sont survenues dans le cadre d'opérations souvent complexes, incluant des périodes de combats. Les investigations menées ont fréquemment démontré un manque d'observance aux mesures de prévention, en particulier la chimioprophylaxie antipalustre (16, 25).

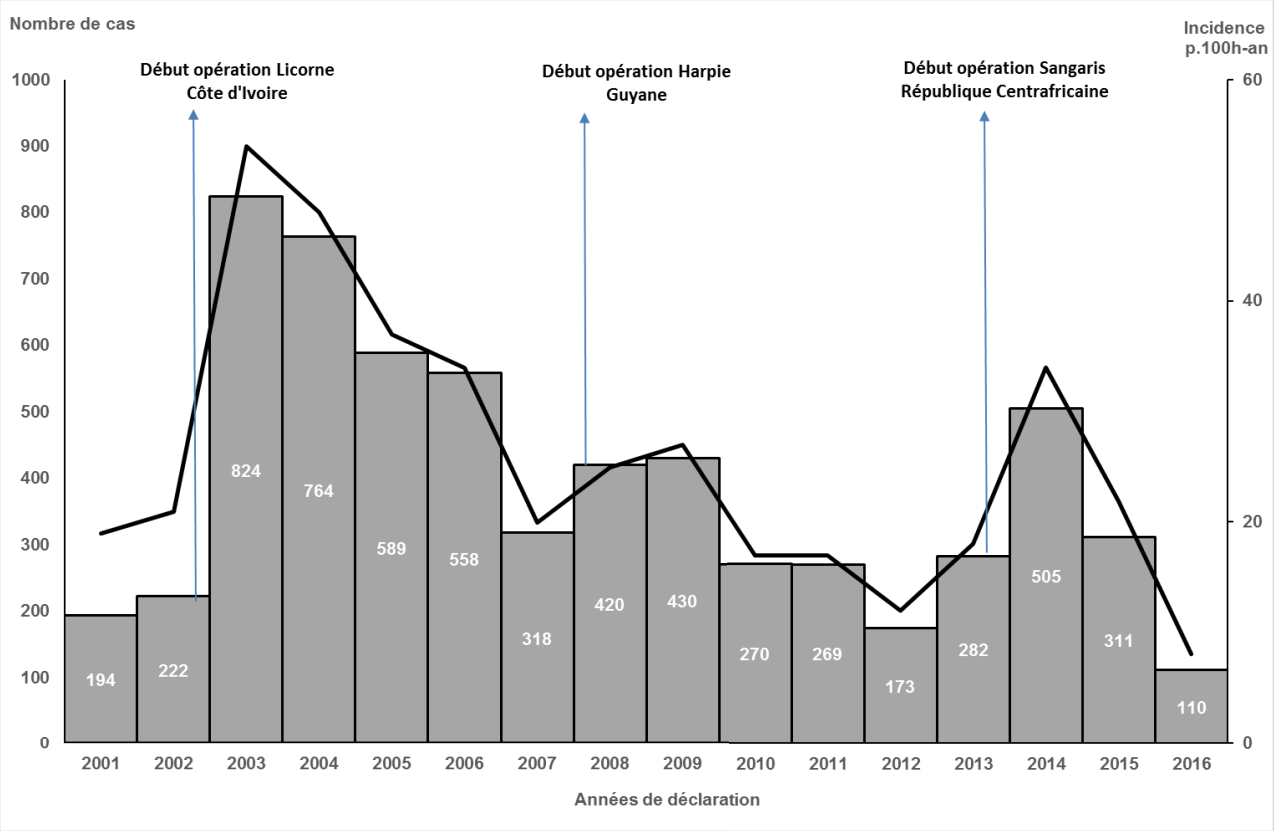


Figure 1 : Nombre de cas et incidence pour 100 personnes-années du paludisme dans les Armées françaises de 2001 à 2016.

Paludisme et armée française en Guyane

La Guyane est un département français d'outre-mer situé sur le continent Sud-Américain. Le paludisme y est considéré comme endémique même si la situation épidémiologique est hétérogène sur le territoire. Le littoral est considéré comme indemne de paludisme même si quelques foyers de transmission peuvent survenir (26). Trois espèces de *Plasmodium* sont présentes, *Plasmodium vivax*, majoritaire selon les données de la surveillance épidémiologique du paludisme en Guyane, *P. falciparum* et *Plasmodium malariae* qui reste très rarement identifié (27, 28). Le vecteur majeur du paludisme identifié en Guyane est

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi (29-32). Vecteur anthropophile et bien adapté aux environnements modifiés par l'homme, il est présent sur l'ensemble du bassin amazonien (33). Sa période d'activité s'étend sur toute la durée de la nuit avec des pics d'agressivité à la tombée de la nuit et à l'aube. Principalement exophile et exophage, il peut aussi prendre ses repas sanguins à l'intérieur des habitations (34-37). Ses principaux sites de reproduction se trouvent le long des berges des fleuves et rivières, plus particulièrement les zones de crues lors des saisons des pluies (38, 39). Jusqu'à récemment, le paludisme survenait principalement sur les fleuves, où était localisé l'essentiel de la population guyanaise de l'intérieur (27). La mise en œuvre de programmes de lutte contre le paludisme sur les fleuves par les autorités sanitaires en Guyane a sans doute permis une diminution de la transmission et du nombre de cas de paludisme observés (27, 40, 41). Depuis 2009, une diminution du nombre de cas de paludisme déclarés est observée : 3344 cas en 2009, 900 cas en 2012 et 437 en 2015 (28, 42). La mise en place en 2008 de tests de diagnostic rapide associés aux traitements combinés à base d'artémisinine dans les Centres délocalisés de prévention et de soins (CDPS) et la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides aux résidents en zone de transmission palustre en 2012, pourraient expliquer cette diminution (41). Enfin, la mise en place des programmes nationaux de lutte contre le paludisme au Brésil et au Suriname s'est accompagnée d'une diminution marquée de l'incidence du paludisme autochtone sur les fleuves frontaliers Maroni et Oyapock, zones historiques du paludisme en Guyane (43-45).

Parallèlement, le développement de l'orpaillage clandestin a profondément modifié l'environnement, le niveau d'exposition et la transmission du paludisme en forêt profonde guyanaise. Des foyers de transmission du paludisme sont ainsi apparus au cœur de la forêt primaire amazonienne, dans des zones très difficiles d'accès où aucun programme d'étude ou de lutte contre le paludisme n'est envisageable auprès de populations constituées essentiellement d'étrangers en situation irrégulière (46, 47). L'ensemble de ces éléments suggère un faciès épidémiologique du paludisme qui reste mal connu.

Avec 4000 militaires déployés, les Forces Armées en Guyane (FAG) et la Gendarmerie nationale constituent un des contingents militaires français le plus important présent en zone impaludée. Une large partie de ce contingent est impliquée dans la lutte contre l'orpaillage illégal en Guyane. Les actions menées visent à neutraliser les flux logistiques des orpailleurs et démanteler les sites illégaux d'exploitation de l'or. La Gendarmerie nationale a été d'abord impliquée seule dans l'opération Anaconda de 2002 à 2005, puis rejointe par les FAG à partir

de 2006 pour mener des opérations ponctuelles de quelques jours à quelques semaines par an sur les sites d'orpaillage illégaux en forêt guyanaise. Ces opérations se sont accompagnées d'une augmentation de l'incidence du paludisme chez les militaires (Figure 2). Les premières épidémies de paludisme ont alors été observées dans ces unités militaires, pendant et au décours des missions en forêt (48, 49).

De janvier 2008 à février 2010, les militaires ont été engagés dans la mission Harpie de lutte contre l'orpaillage illégal. Alors que cette opération n'était conduite que 3 à 6 mois par an, le nombre de cas de paludisme déclarés en 2008 et 2009 a été multiplié par deux par rapport aux années 2006 et 2007 (Figure 2). Les cas de paludisme contractés en Guyane représentaient alors près des deux tiers de l'ensemble des cas déclarés dans les armées (62,9% des cas en 2008, 66% des cas en 2009 et 65,4% en 2010) (figures 1 et 2). Les accès à *P. vivax* étaient largement majoritaires, représentant 80% des cas de paludisme déclarés. Sur la période 2001-2009, le taux d'incidence du paludisme dans les FAG a augmenté de manière continue et significative, et est passé de 1,6 cas de paludisme pour 100 personnes-années en 2001 à 7,8 cas pour 100 personnes-années en 2009 (50).

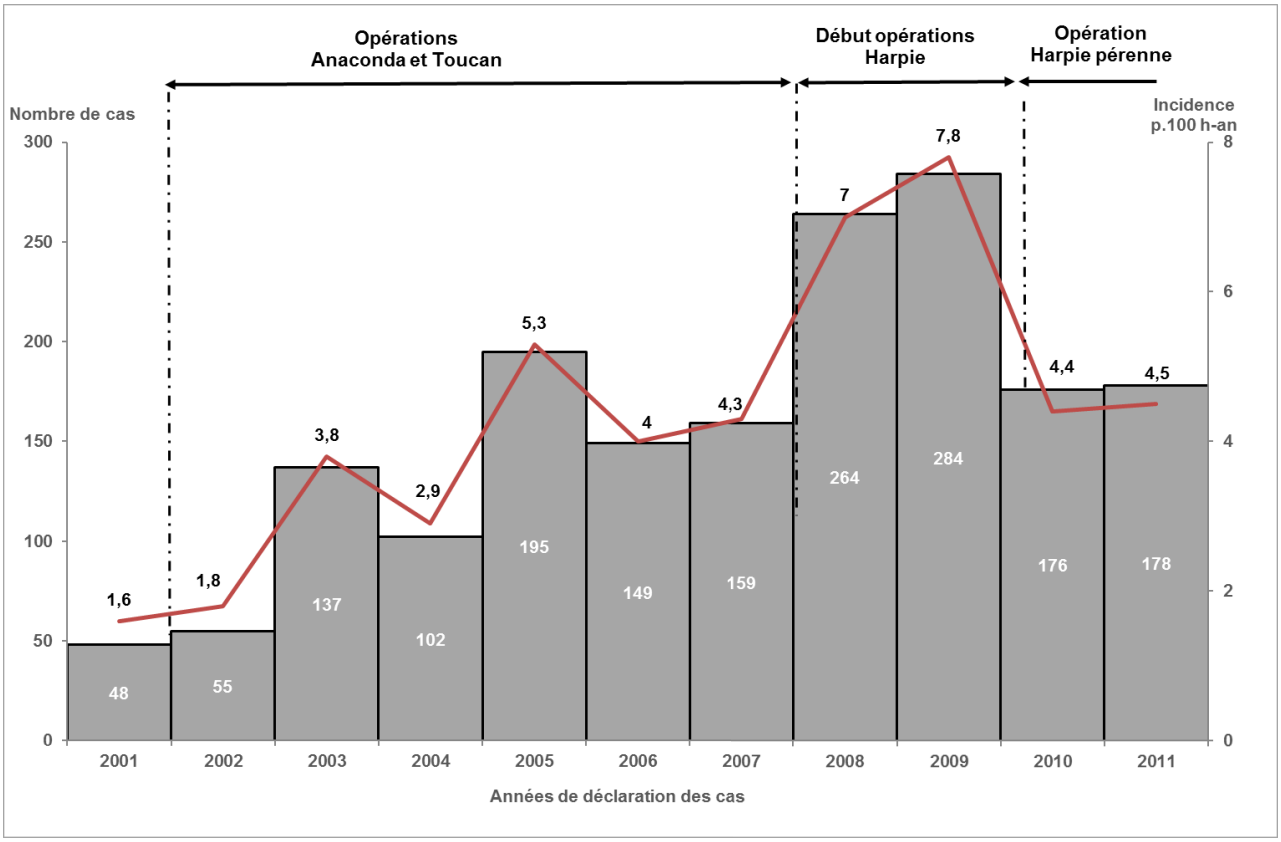


Figure 2 : Nombre de cas et incidence pour 100 personnes-années du paludisme déclarés dans les Armées françaises en relation avec un séjour en Guyane 2001-2012.

Les investigations menées lors des différentes épidémies (une dizaine entre 2004 et 2011), ainsi que l'analyse des données de la surveillance épidémiologique dans les armées, ont identifié à chaque fois une mauvaise observance des mesures de protections individuelles et de la chimioprophylaxie antipalustre (48-50). Ce constat ne suffit cependant pas à expliquer l'absence de maîtrise du risque de paludisme. En effet, la transmission du paludisme en forêt amazonienne reste un domaine peu exploré, particulièrement dans les conditions d'emploi spécifiques des militaires français. Plus particulièrement, la part de l'augmentation du risque palustre attribuable à l'environnement dans lequel étaient déployés les militaires n'a pas été évaluée. De plus, l'efficacité et l'applicabilité des mesures de lutte antivectorielle recommandées dans les armées n'ont jamais été évaluées en forêt équatoriale.

L'intérêt pour les infections par *P. vivax* est relativement récent dans les forces françaises comme au niveau international. La prévention et la prise en charge de ces infections à *P. vivax* jettent plusieurs défis. Tout d'abord celui de l'absence d'efficacité des molécules utilisées en chimioprophylaxie antipalustre sur les formes hypnozoïtes intra-hépatiques de *P. vivax*.

Ensuite, le traitement radical par primaquine, nécessaire pour éviter des accès de reviviscence, nécessite toujours (en France) une autorisation temporaire d'utilisation et est délivré uniquement sur prescription d'un spécialiste hospitalier (51). Chaque militaire présentant un accès à *P. vivax* est donc en indisponibilité opérationnelle pendant au minimum 3 semaines, temps nécessaire au traitement du primo accès et à la mise en place d'une cure radicale par primaquine.

Enfin, ces accès palustres à *P. vivax* restent généralement bénins. La perception du risque de paludisme par les militaires peut donc être différente par rapport au paludisme à *P. falciparum* et pourrait contribuer à diminuer l'adhésion aux mesures de prévention. Le fait d'être en Guyane, en France, sans enjeu opérationnel fort par rapport à un pays étranger, par exemple Africain, peut aussi contribuer à une mauvaise appréciation du risque et donc de l'importance d'appliquer strictement les mesures prophylactiques.

Références

1. Boutin JP, Pradines B, Pages F, Legros F, Rogier C, Migliani R. Epidémiologie du paludisme. Rev Prat. 2005;55:833-40.
2. Aubry P. L'expédition française de Madagascar de 1895. Un désastre sanitaire. Pourquoi. Med Armees. 1979;7:745-51.
3. Sergent ED, Sergent ET. L'armée d'Orient délivrée du paludisme. Charles-Lavauzelle ed. Paris, 1932.
4. Ollivier L, Romand O, Pommier de Santi V, Todesco A, Pages F, Haus-Cheymol R, et al. Surveillance épidémiologique du paludisme dans les armées françaises en 2006. Bull Epidemiol Hebd. 2008;23-24:209-12.
5. Migliani R, Pagès F, Josse R, Michel R, Pascal B, Baudon D. Epidémies de paludisme sur les théâtres d'opérations. Med Armees. 2004;32:293-9.
6. Migliani R, Josse R, Hovette P, Keundjian A, Pagès F, Meynard JB, et al. Le paludisme vu des tranchées, le cas de la Côte d'Ivoire en 2002-2003. Med Trop (Mars). 2003;63(3):282-6.
7. Migliani R, Pradines B, Michel R, Aoun O, Dia A, Deparis X, et al. Malaria control strategies in French armed forces. Travel med Infect Dis. 2014;12(4):307-17.
8. Desjeux G, Balaire C, Pommier de Santi V, Leon C, Aspar AM, Deparis X, et al. Enquête préliminaire sur les besoins de prévention en santé des militaires d'active. Med Armees. 2009;37(5):389-97.
9. Michel R, Demoncheaux JP, Creach MA, Rapp C, Simon F, Haus-Cheymol R, et al. Prevention of infectious diseases during military deployments: a review of the French armed forces strategy. Travel medicine and infectious disease. 2014;12(4):330-40.
10. Direction centrale du Service de santé des armées. Circulaire ministérielle relative à la lutte contre le paludisme dans les armées. Document n°680/DEF/DCSSA/AST/TEC du 3 avril 2009.
11. Pagès F. La lutte antivectorielle dans les armées, une nécessité historique, une adaptation indispensable. Med Trop (Mars). 2009;69(2):165-72.
12. Deparis X, Frere B, Lamizana M, N'Guessan R, Leroux F, Lefevre P, et al. Efficacy of permethrin-treated uniforms in combination with DEET topical repellent for protection of French military troops in Cote d'Ivoire. J Med Entomol. 2004;41(5):914-21.
13. Deparis X, Boutin JP, Michel R, Galoisy-Guibal L, Meynard JB, Pagès F, et al. La stratégie de lutte antivectorielle dans les Armées françaises. Med Trop (Mars). 2001;61(1):87-90.
14. Meynard JB, Bouton JE, Chapoix N, Cesar JF, Thomas E, Ollivier L, et al. Evaluation de l'observance et de la tolérance de la chimioprophylaxie antipalustre au sein des forces françaises en Côte d'Ivoire. Med Armees. 2005;33:57-60.

15. Pagès F, Boutin JP, Meynard JB, Keundjian A, Ryfer S, Giurato L, et al. Tolerability of doxycycline monohydrate salt vs. chloroquine-proguanil in malaria chemoprophylaxis. Trop Med Int Health. 2002;7(11):919-24.

16. Resseguier N, Machault V, Ollivier L, Orlandi-Pradines E, Texier G, Pradines B, et al. Determinants of compliance with malaria chemoprophylaxis among French soldiers during missions in inter-tropical Africa. Malar J. 2010;9:41.

17. Meynard JB, Bouton JE, Chapoix N, Cesar JF, Thomas E, Ollivier L, et al. Evaluation de l'observance et de la tolérance de la chimioprophylaxie antipalustre au sein des forces françaises en Côte d'Ivoire. Med Armees. 2005;33:57-60.

18. Wurtz N, Pascual A, Marin-Jauffre A, Bouchiba H, Benoit N, Desbordes M, et al. Early treatment failure during treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with atovaquone-proguanil in the Republic of Ivory Coast. Malar J. 2012;11:146.

19. Rogier C, Pradines B, Bogreau H, Koeck JL, Kamil MA, Mercereau-Puijalon O. Malaria epidemic and drug resistance, Djibouti. Emerg Infect Dis. 2005;11(2):317-21.

20. Briolant S, Wurtz N, Zettor A, Rogier C, Pradines B. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with *pftetQ* sequence polymorphisms and *pftetQ* and *pfmdt* copy numbers. J Infect Dis. 2010;201(1):153-9.

21. Tan KR, Magill AJ, Parise ME, Arguin PM. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(4):517-31.

22. Migliani R, Michel R, Ollivier L, Queryriaux B, Richard V, Boutin JP. Evaluation des pratiques, des attentes et des besoins en matière d'éducation sanitaire collective dans les armées en 2005. Med Armees. 2008;36(1):55-60.

23. Queyriaux B, Texier G, Ollivier L, Galoisy-Guibal L, Michel R, Meynard JB, et al. The French Armed Forces Epidemiologic Surveillance System. Technical appendix in: *Plasmodium vivax* malaria among military personnel, French Guiana, 1998-2008. Emerg Infect Dis. 2011;17(7):1280-2.

24. Mayet A, Lacassagne D, Juzan N, Chaudier B, Haus-Cheymol R, Berger F, et al. Malaria outbreak among French army troops returning from the Ivory Coast. J Travel Med. 2010;17(5):353-5.

25. Sagui E, Resseguier N, Machault V, Ollivier L, Orlandi-Pradines E, Texier G, et al. Determinants of compliance with anti-vectorial protective measures among non-immune travellers during missions to tropical Africa. Malar J. 2011;10:232.

26. Chocho A, Bellony S, Azor P, Chantilly S. Lieux présumés de contamination palustre répertoriés sur le littoral de la Guyane - 2009. Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2011;1:6-10.

27. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:522-33.

28. Ardillon V, Carvalho L, Prince C, Abboud P, Djossou F. Bilans 2013 et 2014 de la situation du paludisme en Guyane. Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2015;1:16-20.

29. Hiwat H, Issaly J, Gaborit P, Somai A, Samjhawan A, Sardjoe P, et al. Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (Diptera: *Culicidae*) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104(3):207-13.

30. Girod R, Roux E, Berger F, Stefani A, Gaborit P, Carinci R, et al. Unravelling the relationships between *Anopheles darlingi* (Diptera: *Culicidae*) densities, environmental factors and malaria incidence: understanding the variable patterns of malarial transmission in French Guiana (South America). Ann Trop Med Parasitol. 2011;105(2):107-22.

31. Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Fouque F. *Anopheles darlingi* bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(7):702-10.

32. Fouque F, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Girod R. Annual variations in the number of malaria cases related to two different patterns of *Anopheles darlingi* transmission potential in the Maroni area of French Guiana. Malar J. 2010;9:80.

33. Moua Y, Roux E, Girod R, Dusfour I, de Thoisy B, Seyler F, et al. Distribution of the habitat suitability of the main malaria vector in French Guiana using maximum entropy modeling. J Med Entomol. 2017;54(3):606-21.

34. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1998;59(2):325-35.

35. Pajot FX, Le Pont F, Molez JF, Degallier N. Agressivité d'*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 *(*Diptera*, Culicidae)* en Guyane française. Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol. 1977;15:15-22.

36. Lourenco-de-Oliveira R, Guimaraes AE, Arle M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, et al. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(4):501-14.

37. de Barros FS, Honorio NA. Man biting rate seasonal variation of malaria vectors in Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):299-302.

38. Molez JF. Mythes représentant la transmission palustre chez les Indiens d'Amazonie et leurs rapports avec deux modes de transmission rencontrés en forêt. Sante. 1999;9(3):157-62.

39. de Oliveira-Ferreira J, Lourenco-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1990;43(1):6-10.

40. Carme B, Ardillon V, Girod R, Grenier C, Joubert M, Djossou F, et al. Situation épidémiologique du paludisme en Guyane [Update on the epidemiology of malaria in French Guiana] (in French). Med Trop (Mars). 2009;69(1):19-25.

41. Mansotte F, Ravachol F, Carlisi R, Caudal J, Pinchon S, Maison D. Promotion des moustiquaires pré-imprégnées à longue durée d'action en Guyane (2006-2008): conception, mise en place et résultats [Operation to promote use of long-lasting insecticidal nets (LLIN) in French Guiana in 2006: design, implementation and results] (in French). Med Trop (Mars). 2010;70(3):249-54.

42. Ardillon V, Carvalho L, Prince C, Djossou F. Bilan 2012 de la situation épidémiologique du paludisme en Guyane. Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2013;4:6-10.

43. Hiwat H, Hardjopawiro LS, Takken W, Villegas L. Novel strategies lead to pre-elimination of malaria in previously high-risk areas in Suriname, South America. Malar J. 2012;11:10.

44. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. Malar J. 2016;15(1):284.

45. Cenci D, Ferreira AC, Santelli S. Situation épidémiologique du paludisme dans l'Etat d'Amapa et dans la municipalité d'Oiapoque (Brésil). Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2012;1-2:17-20.

46. Carme B. Substantial increase of malaria in inland areas of eastern French Guiana. Trop Med Int Health. 2005;10(2):154-9.

47. Berger F, Flamand C, Musset L, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, et al. Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saul, French Guiana, January-April 2009. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(4):591-7.

48. Verret C, Cabianca B, Haus-Cheymol R, Lafille JJ, Loran-Haranqui G, Spiegel A. Malaria outbreak in troops returning from French Guiana. Emerg Infect Dis. 2006;12(11):1794-5.

49. Michel R, Ollivier L, Meynard JB, Guette C, Migliani R, Boutin JP. Outbreak of malaria among policemen in French Guiana. Mil Med. 2007;172(9):977-81.

50. Queyriaux B, Texier G, Ollivier L, Galoisy-Guibal L, Michel R, Meynard JB, et al. *Plasmodium vivax* malaria among military personnel, French Guiana, 1998-2008. Emerg Infect Dis. 2011;17(7):1280-2.

51. Nacher M, Stefani A, Basurko C, Lemonnier D, Djossou F, Demar M, et al. The burden of *Plasmodium vivax* relapses in an Amerindian village in French Guiana. Malar J. 2013;12:367.

INTRODUCTION

Malgré un programme de prévention du paludisme cohérent, organisé, dimensionné et répondant aux recommandations nationales et internationales, le risque palustre n'est pas maîtrisé dans les forces armées en Guyane. La multiplication des épidémies, l'émergence de *P. vivax* et l'augmentation significative et continue de l'incidence depuis 2002 sont concomitantes de l'implication des militaires dans la lutte contre l'orpaillage illégal. Les zones d'orpaillage situées au cœur de la forêt guyanaise ne sont accessibles que par hélicoptère ou en pirogue et à pied. Elles sont de plus associées à un climat d'insécurité et de violence dans lequel ne se côtoient que des orpailleurs en situation irrégulière, des militaires et parfois quelques exploitants aurifères légaux. Cette situation est donc peu propice à la recherche scientifique et explique que le faciès épidémiologique du paludisme auquel sont confrontés les militaires français reste inconnu.

Le programme de prévention du paludisme décliné par le SSA est historiquement ciblé sur une problématique africaine : le parasite *P. falciparum* et le vecteur principal *Anopheles gambiae*. En Guyane, les accès palustres sont majoritairement liés à *P. vivax* et le vecteur principal est *Anopheles darlingi.* La question se pose donc de savoir si ce programme de prévention est adapté au contexte de la Guyane.

La prise en compte du problème du paludisme chez les militaires en Guyane nécessite de prendre en considération le paludisme sous tous ses aspects : épidémiologique, entomologique et parasitologique. Le SSA a donc décidé de la mise en œuvre d'un projet de recherche sur le paludisme en Guyane sur trois ans, de 2012 à 2015, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Guyane. Cette thèse s'inscrit dans le cadre de ce programme et vise à la fois à identifier les déterminants du paludisme chez les militaires français déployés en Guyane dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal, mais aussi à évaluer les différentes stratégies mises en œuvre pour le prévenir. Le but est de proposer des solutions fiables et pérennes afin de maîtriser ce risque.

1. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME EN FORET GUYANAISE

1.1 Paludisme en lien avec l'orpaillage illégal

- **Travail original 1 :** Investigation d'une épidémie de paludisme chez les militaires français après une mission de lutte contre l'orpaillage illégal.

Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, Dusfour I, Mendibil A, Simon F, Deparis X, Pagès F. Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. Malar J. 2016; 15:35.

Résumé

En décembre 2010, une épidémie de paludisme, majoritairement due à *P. vivax*, est survenue chez de militaires français déployés en Guyane dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal. Nous présentons ici les principaux résultats des investigations épidémiologiques et entomologiques menées.

Les données sur les cas de paludisme ont été collectées à l'aide du système de surveillance épidémiologique dans les armées pendant la période épidémique de décembre 2010 à avril 2011. Une étude de cohorte rétrospective a été réalisée pour identifier les lieux présumés de contamination. Secondairement, une campagne de capture d'anophèles a été réalisée sur les sites d'orpaillages illégaux identifiés comme à risque de transmission du paludisme. Des pièges lumineux CDC® et Mosquito Magnet® ont été utilisés pour les captures. Les moustiques ont été identifiés morphologiquement puis par biologie moléculaire par le séquençage du gène *its2* (internal transcribed spacer 2). La recherche d'une infection des anophèles par *P. falciparum* et *P. vivax* a été réalisée par méthode immuno-enzymatique ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay ») et par Polymerase Chain Reaction (PCR).

Au total, 72 cas de paludisme à *P. vivax* ont été déclarés, dont trois étaient des accès mixtes à *P. vivax* et *P. falciparum*. Le taux d'attaque de cette épidémie était de 26,5% (72/272). Des défauts d'application des mesures de protection individuelle contre les piqûres de moustiques et une mauvaise observance de la chimioprophylaxie antipalustre par doxycycline étaient rapportés par les militaires impaludés. La courbe épidémique était bimodale, avec 45,8% des cas de paludisme survenus après le retour en métropole. Le pic épidémique des paludismes

d'importation survenait quatre semaines après le retour de Guyane, soit à la fin de la prise de la chimioprophylaxie par doxycycline. Parmi l'ensemble des lieux de séjour fréquentés pendant la mission, deux sites d'orpaillage illégaux situés au cœur de la forêt guyanaise étaient significativement associés à la survenue des cas de paludisme. Au total, 595 anophèles femelles ont été capturés sur les différents sites. Un diagnostic d'espèce a été réalisé sur 528 spécimens : 305 *Anopheles darlingi,* 145 *An. nuneztovari s.l.*, 63 *An. marajoara* et 15 *An. triannulatus s.l.*. Trois *An. darlingi* étaient infectés par *P. falciparum* (taux d'infection de 1,1%) et quatre *An. marajoara* par *P. vivax* (taux d'infection de 6,4%).

Discussion – conclusions

Le lien entre cette épidémie de paludisme et les sites d'orpaillage illégaux a été confirmé, d'un point de vue statistique mais aussi entomologique. *An. darlingi*, habituellement décrit sur les fleuves, est confirmé pour la première fois comme vecteur de *P. falciparum* en forêt guyanaise. Par ailleurs, *An. marajoara*, moustique selvatique, est décrit pour la première fois comme vecteur de *P. vivax* en Guyane avec un taux d'infection très élevé (6,4%). Les sites d'orpaillage illégaux doivent donc être considérés comme des foyers avec un haut niveau de transmission du paludisme. Cette étude a permis aussi de montrer deux failles dans le programme de prévention du paludisme en Guyane. La première est liée à l'utilisation de hamacs dotés de moustiquaires non imprégnées d'insecticides et avec une bâche constituée d'un tissu trop fin permettant les piqûres de moustiques au travers. La seconde est liée à la chimioprophylaxie par doxycycline, inefficace sur les formes hypnozoïtes intra-hépatique de *P. vivax* et donc sur les accès de reviviscence à distance de la période de prise de la chimioprophylaxie. Ajoutées à un manque d'observance des militaires aux mesures de prévention, ces failles ont pu jouer un rôle majeur dans la survenue de cette épidémie.

de Santi *et al. Malar J (2016) 15:35*
DOI 10.1186/s12936-016-1088-x

Malaria Journal

RESEARCH

Open Access

Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana

Vincent Pommier de Santi[1,2*], Romain Girod[3], Marie Mura[4], Aissata Dia[1], Sébastien Briolant[2,4,5], Félix Djossou[6], Isabelle Dusfour[3], Alexandre Mendibil[7], Fabrice Simon[8], Xavier Deparis[1] and Frédéric Pagès[9]

Abstract

Background: In December 2010, a *Plasmodium vivax* malaria outbreak occurred among French forces involved in a mission to control illegal gold mining in French Guiana. The findings of epidemiological and entomological investigations conducted after this outbreak are presented here.

Methods: Data related to malaria cases reported to the French armed forces epidemiological surveillance system were collected during the epidemic period from December 2010 to April 2011. A retrospective cohort study was conducted to identify presumed contamination sites. *Anopheles* mosquitoes were sampled at the identified sites using Mosquito Magnet and CDC light traps. Specimens were identified morphologically and confirmed using molecular methods (sequencing of ITS2 gene and/or barcoding). *Anopheles* infections with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* were tested by both enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR.

Results: Seventy-two *P. vivax* malaria cases were reported (three were mixed *P. falciparum*/*P. vivax* infections), leading to a global attack rate of 26.5 % (72/272). Lack of compliance with vector control measures and doxycycline chemoprophylaxis was reported by patients. Two illegal gold mining sites located in remote areas in the primary forest were identified as places of contamination. In all, 595 *Anopheles* females were caught and 528 specimens were formally identified: 305 *Anopheles darlingi*, 145 *Anopheles nuneztovari* s.l., 63 *Anopheles marajoara* and 15 *Anopheles triannulatus* s.l. Three *An. darlingi* were infected by *P. falciparum* (infection rate: 1.1 %) and four *An. marajoara* by *P. vivax* (infection rate: 6.4 %).

Discussion: The main drivers of the outbreak were the lack of adherence by military personnel to malaria prevention measures and the high level of malaria transmission at illegal gold mining sites. *Anopheles marajoara* was clearly implicated in malaria transmission for the first time in French Guiana. The high infection rates observed confirm that illegal gold mining sites must be considered as high level malaria transmission areas in the territory.

Conclusions: Illegal gold mining activities are challenging the control of malaria in French Guiana. Collaboration with neighbouring countries is necessary to take into account mobile populations such as gold miners. Malaria control strategies in the French armed forces must be adapted to *P. vivax* malaria and sylvatic *Anopheles* species.

*Correspondence: v.pommierdesanti@gmail.com
[1] French Armed Forces Center for Epidemiology and Public Health (CESPA), Camp Militaire de Sainte Marthe, BP 40026, 13568 Marseille Cedex 02, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2016 de Santi et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Keywords: Malaria, French Guiana, Illegal gold mining, Military, *Plasmodium vivax*, Outbreak, *Anopheles darlingi*, *Anopheles marajoara*

Background

French Guiana is a French overseas entity and an Outermost Region of the European Union located on the northeast coast of South America (Fig. 1). It is a sparsely populated area—250,000 inhabitants in 2013—and 85 % of the territory is covered by the Amazon rainforest [1]. An estimated 80 % of the population lives on or close to the coastal area, characterized by malaria cases imported from the interior and, more rarely, indigenous transmission [2]. From 2005 to 2014, the number of malaria cases officially reported in French Guiana (all *Plasmodium* species) decreased from 4479 to 445 [3]. Most of these officially-reported cases currently occur in villages located along the main rivers flowing through the territory, especially those bordering Suriname and Brazil [3]. This is partially offset by an increase in the number of cases related to transmission at illegal gold mining sites. Indeed, such sites located in forested inland French Guiana are probably areas of malaria transmission for *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* [4–7].

In 2009, Suriname estimated that 1140 cases of malaria diagnosed and treated in its clinics were imported cases, mainly from illegal gold mining sites in French Guiana [8]. In 2014, for the border town of Oiapoque (Oyapock River, Brazil), 21.1 % of malaria cases reported were imported from French Guiana, mostly related to illegal gold mining [9]. In the Amazon, the transmission of malaria due to human migration has been called "frontier malaria" [10]. The impact of illegal gold mining on malaria transmission has been highlighted in most parts of the Amazon Basin [11–14].

In French Guiana, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*, known for its anthropophilia and its adaptation to anthropized environments, is considered as the main vector of malaria [15–18]. In the Amazon Basin, it is described as biting all night with two peaks of activity at dusk and dawn. It can enter shelters or homes to take a blood meal, but rests afterwards in the forest [19–22]. Its breeding sites are linked to river banks and flooded areas when rivers overflow during the rainy season [23, 24]. In addition to *An. darlingi*, other anopheline species of the subgenera *Nyssorhynchus* and *Anopheles* have been incriminated in malaria transmission in the Amazon Basin [24–26]. Moreover, *Anopheles* of the subgenus *Kerteszia* are present in French Guiana. These species have been described as biting during the day along forest trails, and they have been suspected of playing a role in malaria transmission [27].

Because of illegal activity and violence, no entomological study has ever been conducted to date at illegal gold mining sites in French Guiana. French military personnel have been involved in a specific military operation to control and reduce illegal gold mining activities in French Guiana since 2005. The main purpose of this operation is to disrupt the logistics of illegal gold mining in the primary forest. To that end, 400 military personnel are permanently deployed at river checkpoints (RCP), forward operational bases on major rivers (FOB) and forward operational posts deep in the forest (FOP) (Fig. 1). Most of them come directly from France for 4-month missions in French Guiana. From forward bases, military personnel conduct short (24–48 h, camping in the forest) or long-term (3–4 weeks) interventions at illegal gold mining positions. During these missions, the malaria prevention strategy in the French armed forces is based on three axes: (1) Health education to encourage compliance with protective measures, (2) Personal protection against vectors including repellents (DEET or picaridine), use of permethrin-impregnated combat uniforms, long trousers and long-sleeved shirts from dusk to dawn (patrols and guards), deltamethrin-impregnated cotton bed nets in forward bases and hammocks with mosquito nets when camping deep in the forest (individual vector-bite protection equipment is provided to each soldier) and (3) Chemoprophylaxis based on 100 mg of doxycycline daily during their entire stay and for 4 weeks after leaving the malaria transmission area (terminal prophylaxis) [28]. Despite such strategies, deployments at illegal gold mining sites have resulted in several outbreaks and in an increase of malaria incidence among French forces, with *P. vivax* accounting for more than 80 % of reported cases [29].

In December 2010, the French military health surveillance system detected a *P. vivax* outbreak among three military units deployed from France to French Guiana for a 4-month mission. To explain this outbreak, a case series study was first conducted to describe the outbreak, followed by a retrospective cohort study to determine areas at risk for malaria transmission. In a second stage, an entomological study was conducted in the determined areas to identify the vectors involved and determine the level of malaria transmission.

Methods

Epidemiological investigation

Data were collected during the epidemic period from December 2010 to April 2011. A malaria case was

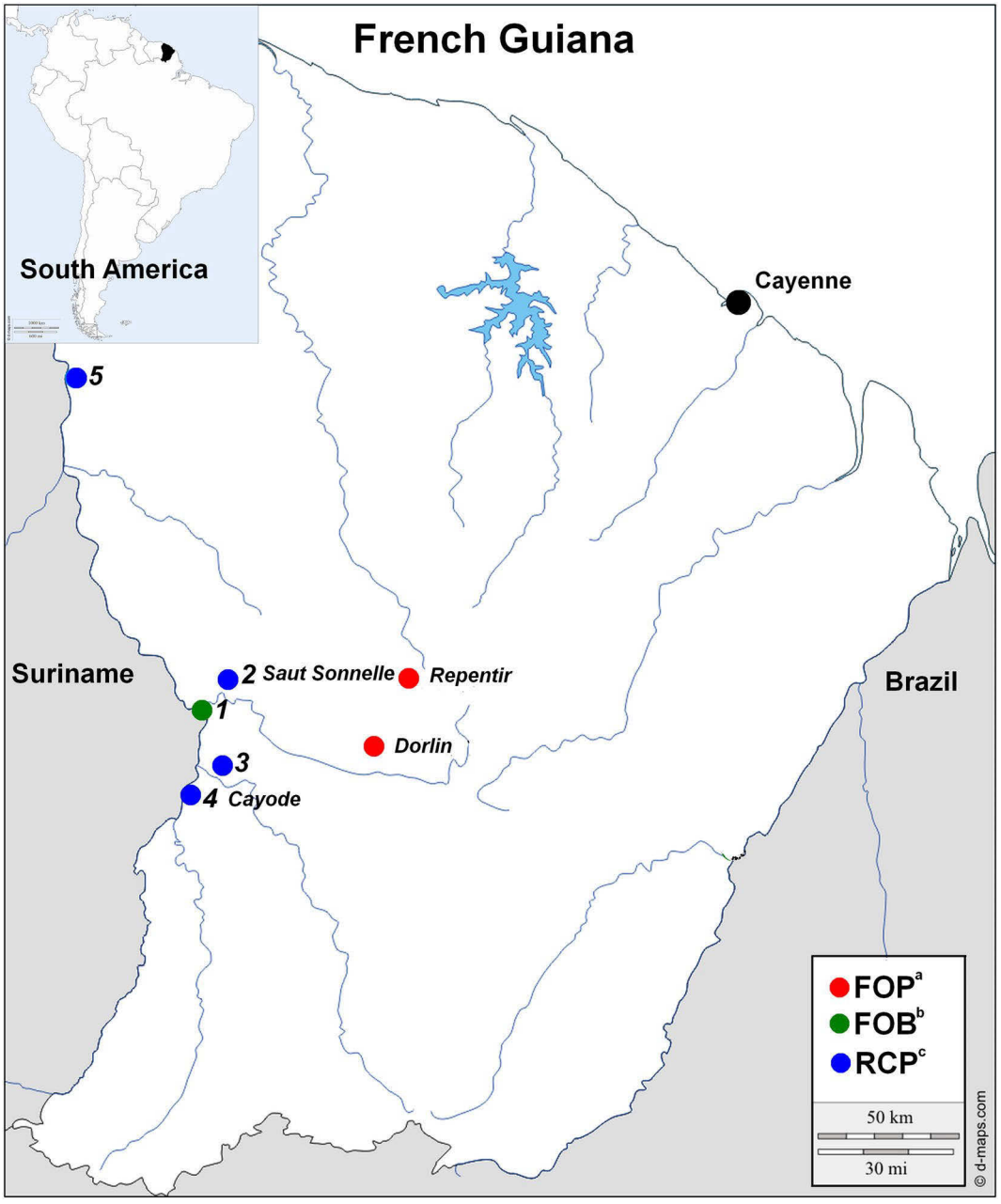


Fig. 1 Map of French Guiana and location of French military units in 2010–2011. Legend: [a]*FOP* forward operational post, [b]*FOB* forward operational base, [c]*RCP* river check point. *1*—Maripasoula FOB, *2*—Saut Sonnelle RCP, *3*—Cayodé RCP, *4*—Twenké RCP, *5*—Providence RCP. Names in *italics* correspond to mosquito sampling sites

mandatorily defined as any pathologic event or symptom associated with confirmed parasitological evidence (*Plasmodium* spp. in blood smears or quantitative buffy coat or positive malaria rapid diagnosis tests) contracted in French Guiana. Cases were reported to the French armed forces epidemiological surveillance system in French Guiana (indigenous cases) and in continental France for military units that had returned to France (imported cases). During missions, the French armed forces malaria prevention strategy was implemented [28]. The hammocks used were made of a single thin layer of fabric with a non-treated polyester mosquito net. For each malaria case, military physicians had to complete a mandatory specific form containing administrative, geographic and

clinical information, compliance with individual protection measures against mosquito bites (repellent applied to skin, use of permethrin-impregnated combat uniform and bed or hammock net), compliance with chemoprophylaxis and biological data [29]. The level of compliance with vector control measures was assessed as either "never", "seldom", "often" or "always", and proper compliance was defined as "always". Chemoprophylaxis compliance was assessed as a daily 100 mg dose of doxycycline during the 8 days preceding a malaria attack. A retrospective cohort study was conducted to identify places of stay related to a *P. vivax* attack during the 4-month mission. These different locations were available for the two main military units affected by the epidemic.

Entomological investigation

Mosquito field sampling

Entomological investigation in the field was guided by epidemiological investigation results. *Anopheles* mosquitoes were sampled from June to July 2011. As classic human landing collections could not be conducted, different traps were used: Mosquito Magnet® (MM) traps (Woodstream Corporation, Lititz, PA) and Center for Disease Control and Prevention (CDC) light traps. One MM trap baited with octenol was deployed along the Maroni River (border with Suriname) at the two river checkpoints of Cayodé and Saut Sonnelle, for 1 month (Fig. 1). Traps were checked after dawn and before dusk every day. Two mosquito collection sessions were conducted at two illegal gold mining sites: Repentir from June 9 to 15, and Dorlin from June 24 to July 15 (Fig. 1). Due to safety and logistical reasons, French military personnel accompanied the research team in the field. Each time, a medical entomologist was present to install traps during the first nights. Three MM traps baited with octenol were in use night and day during the stay and checked after dawn and before dusk. Two CDC light traps were used, but only for the first three nights due to the short lifespan of batteries in the rainforest and logistical limitations.

All mosquitoes were stored individually in numbered vials with desiccant, and were preserved at −20 °C until processing at the medical entomology unit of the Institut Pasteur de la Guyane (IPG), Cayenne (French Guiana), or at the medical entomology unit of the Institute for Biomedical Research of the French Armed Forces (IRBA), Marseille (France). Before storage at −20 °C, mosquitoes were conserved at ambient temperature in the rainforest for 1–15 days according to the date of collection.

Water collections in the study areas were examined for anopheline larvae. Larval surveys were conducted in the immediate vicinity of the settlements. Larvae and pupae were sampled using a standard dipping method in water collections [30]. Bromeliads recovered from fallen trees were also explored for larvae of the subgenus *Kerteszia*. Larvae and pupae were reared in the field. The neonate adult mosquitoes were stored by date and breeding site in numbered vials with desiccant and preserved at −20 °C, until processing.

Anopheles identification

Adult mosquitoes collected or neonate mosquitoes were sorted by genera, and *Anopheles* specimens were morphologically identified based on keys in use in the Guiana Shield [31–34].

Mosquitoes caught with traps are often in bad condition, and some specimens are difficult to identify [35]. Furthermore, as no catches had ever been conducted at some of the selected sampling sites, species never described in French Guiana but present in neighbouring countries may have been present deep in the forest. Morphological identifications were then completed by molecular analysis following established protocols. Mosquito DNA was extracted, Internal transcribed spacer 2 (ITS2) gene was processed by PCR-RFLP and sequenced for a selected sample and for specimens infected by *P. falciparum* or *P. vivax* [36, 37]. DNA barcodes were also used for the final identification of some specimens [38].

Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax detection

Heads and thoraces of a sample of *Anopheles* females were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *P. falciparum* and *P. vivax* strains VK210 and VK247 circumsporozoite protein (CSP) [39]. However, using ELISA to research human *Plasmodium* infection of the *Anopheles* captured in deep forest has two major drawbacks: the lack of a cold chain and the possibility of non-specific cross-reactions with non-human *Plasmodium*. The lack of a cold chain leads to a deterioration of parasite proteins detected by ELISA, which could explain the lack of detection of infected *Anopheles* mosquitoes. Furthermore, zoophilic *Anopheles* can be infected by "animal" *Plasmodium* that could generate false positives by cross reaction and thus be considered of importance to human health [40]. Therefore, a RT-PCR detection of *Plasmodium* infection was systematically carried out for each *Anopheles* specimen [41]. The CSP index for each *Plasmodium* species was calculated as the proportion of mosquitoes found to be positive for CSP or for *Plasmodium* DNA.

Statistical analysis

Univariate analysis was conducted to determine places of stay during the 4-month mission related to the risk of malaria. Relative risk of contracting malaria was calculated for each place of stay. The results are expressed as a

percentage of subjects for incidence and attack rates and as a percentage for compliance with protection measures. Excel and SAS 9.3® software were used. Geographic maps used were free open access [42].

Results

Epidemiological investigation

The epidemic lasted 7 months, with a total of 72 *P. vivax* malaria cases, including three mixed *P. falciparum*/*P. vivax* infections. Three military units (N = 272) deployed for 4 months (September 2010–January 2011) were affected by the epidemic: one infantry company (n = 138), one sapper company (n = 116) and one platoon of Gendarmes (n = 18) (Fig. 2). These three units had joint missions during their stay in French Guiana. The first *P. vivax* malaria case occurred on October 21, 2010, 7 weeks after deployment to French Guiana, and the last case on April 28, 2011, 4 months after returning to France (Fig. 2). The overall attack rate was 26.5 % (72/272). Attack rates for the infantry company, the sapper company and the platoon of Gendarmes were comparable: 24.6 % (34/138), 28.4 % (33/116), 27.8 % (5/18), respectively. The epidemic curve had two peaks, the first at the end of the mission in French Guiana (indigenous cases) and the second after the soldiers' return to France (imported cases) (Fig. 2). Indigenous cases accounted for 54.2 % (39/72) and imported cases for 45.8 % (33/72). Malaria occurred with a median delay of 36 days [interquartile interval (28–86 days)] after returning to France. In all, 82 % (27/33) of imported cases occurred after terminal doxycycline chemoprophylaxis. One of the patients presented a malarial splenomegaly and a splenic rupture after a seemingly harmless abdominal trauma.

Compliance with personal protection measures against mosquito bites was completed for 61 cases. Bed or hammock nets were always used by 59 % (36/61), insect repellents by 46 % (28/61) and permethrin-impregnated combat uniforms by 52 % (32/61) of the cases. Several of the patients stated that they had been bitten through the cloth of their hammock during nights spent in deep forest. Evaluation of chemoprophylaxis compliance was not relevant for malaria attacks occurring more than 28 days after returning to France (n = 27). But for other cases, proper compliance (patient's self-evaluation) with doxycycline in the 8 days preceding a malaria attack was 40 % (18/45).

Places of stay during the 4-month mission in French Guiana were available for infantry and sapper companies (N = 254). Two locations were associated with malaria: the illegal gold mining sites of Dorlin [relative risk = 2.68

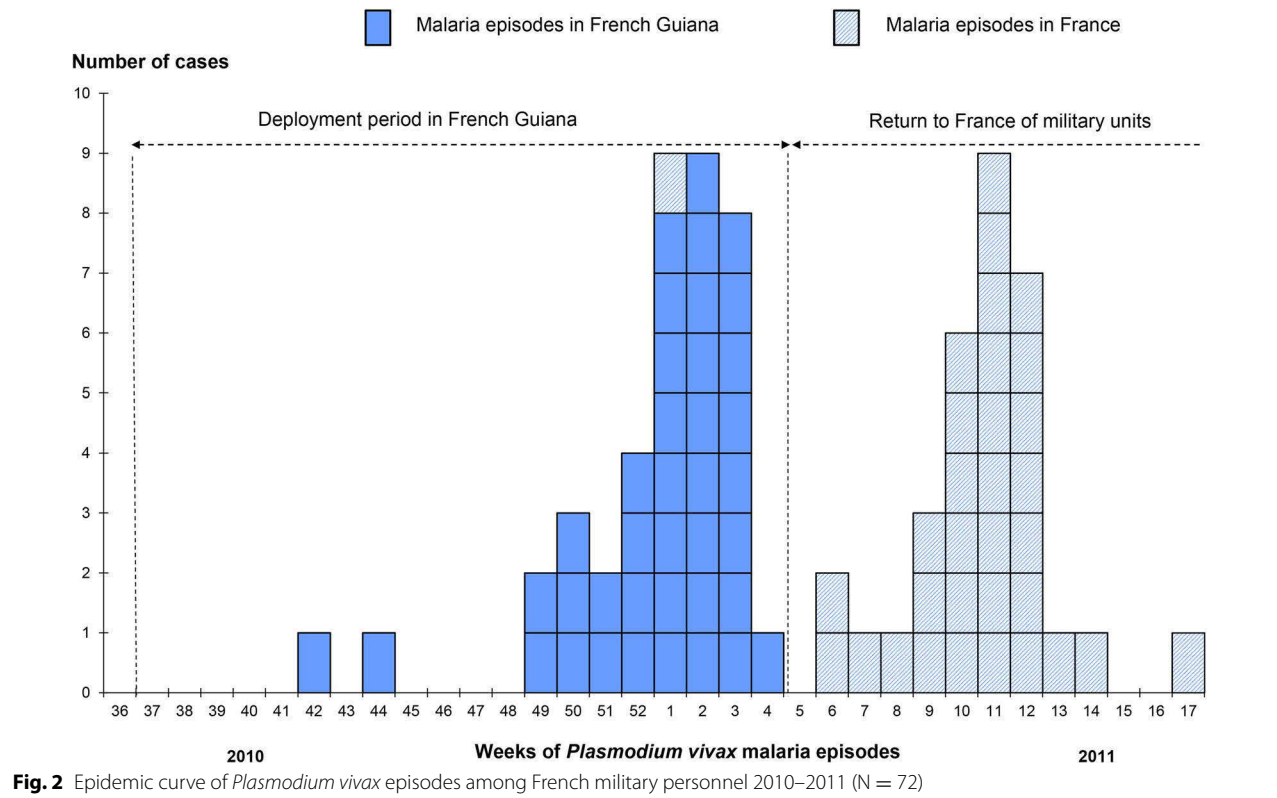


Fig. 2 Epidemic curve of *Plasmodium vivax* episodes among French military personnel 2010–2011 (N = 72)

CI 95 % (1.61–4.46)] and Repentir [relative risk = 5.35 CI 95 % (3.08–9.30)] (Table 1; Fig. 1).

Entomological investigation

Mosquito collection and identification

During the survey in June and July, 595 female *Anopheles* were caught only at night, including 554 specimens at the two illegal gold mining sites and 41 specimens at both river checkpoints (40 with MM at Cayodé, one with CDC light trap at Saut Sonnelle). In Repentir, 166 *Anopheles* mosquitoes were caught: 164 using two MM traps over the entire period and two using two CDC traps for three nights. In Dorlin, 388 *Anopheles* mosquitoes were caught: 370 using two MM traps over the entire period and 18 using two CDC traps for three nights. Morphological identification was difficult due to the damage caused to specimens by traps and the presence of moisture. It allowed the probable species identification of 398 specimens: 249 *Anopheles darlingi*, 88 *Anopheles nuneztovari* s.l., 53 *Anopheles albitarsis* s.l. and seven *Anopheles triannulatus* s.l. Morphological identification was inconclusive for 199 specimens (199 *An.* spp.) (Table 2). Molecular identification by ITS2 PCR-RFLP made it possible to formally identify 528 specimens: 305 *An. darlingi*, 145 *An. nuneztovari* s.l., 63 *An. albitarsis* s.l. and 15 *An. triannulatus* s.l. (Table 2). For 27 specimens (six *An. triannulatus* s.l., seven *An. albitarsis* s.l., nine *An. triannulatus* s.l. and five *An. darlingi*), the products of ITS2 PCR were sequenced and compared to available sequences. The sequencing confirmed the molecular identification for 26 specimens. The overall consistency of morphological identification was 91 %. Table 3 summarizes the distribution of the species processed with ITS2 PCR-RFLP by location. Furthermore, six members of the *An. albitarsis* complex caught were molecularly identified using DNA barcoding. At the two sites where they were caught, all specimens were *Anopheles marajoara* [43].

Plasmodium falciparum **and** *Plasmodium vivax* **detection**

Homogenates of the heads and thoraces of a sample of 345 *Anopheles* females were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *P. falciparum and P. vivax* strainVK210 and VK247 circumsporozoite protein. According to ELISA, none of those specimens was infected by a human *Plasmodium*. All the specimens were tested by RT-PCR for *P. falciparum* and *P. vivax*. DNA was extracted directly for 243 specimens not tested using ELISA and using the homogenates prepared for ELISA for the 345 others. By RT-PCR, infected anophelines were only found among samples from Dorlin. Three

Table 1 Places of stay in French Guiana related to *Plasmodium vivax* attack among French military forces (N = 254, univariate analysis)

	N	Nb *P. vivax*	Incidence (%)	RR	CI 95 %	*p* value
Dorlin						*0.0117*
No	245	61	24.9	1		
Yes	9	6	66.7	*2.68*	*1.61–4.46*	
Repentir						*<0.0001*
No	143	13	9.1	1		
Yes	111	54	48.6	*5.35*	*3.08–9.30*	
Twenké						0.2760
No	213	59	27.7	1		
Yes	41	8	19.5	0.70	0.36–1.36	
Cayodé						0.2631
No	196	55	28.1	1		
Yes	58	12	20.7	0.73	0.42–1.28	
Maripasoula						0.9236
No	35	9	25.7	1		
Yes	219	58	26.5	1.03	0.56–1.89	
Saut Sonnelle						0.4119
No	136	33	24.3	1		
Yes	118	34	28.8	1.19	0.79–1.79	
Providence						0.3565
No	219	60	27.4	1		
Yes	35	7	20.0	0.73	0.36–1.47	

Statistically significant results are in italics

Table 2 Distribution by species of the 595 anopheles caught in French Guiana in June–July 2011

Molecular identification	Morphological identification					
	***An. albitarsis* s.l.**	***An. darlingi***	***An. nuneztovari* s.l.**	***An. triannulatus* s.l.**	***An.* spp.**	**Total**
An. albitarsis s.l.	*48 (90.5 %)*	4			11	63
An. darlingi	3	*224 (90.0 %)*	1		77	305
An. nuneztovari s.l.		2	*83 (94.3 %)*	1	59	145
An. triannulatus s.l.	1		3	*6 (85.7 %)*	5	15
An. spp.		19	1		47	67
Total of KI	52	249	88	7	199	595

In italic values between parentheses, consistency between morphological identification and molecular analysis for each species

Table 3 Distribution by site of sampling of the 595 anopheles caught in French Guiana from June to July 2011

	An. marajoara	***An. darlingi***	***An. nuneztovari* s.l.**	***An. triannulatus* s.l.**	***An.* spp.**	**Total**
Dorlin	62	262	20	2	42	388
Repentir		11	125	13	17	166
Cayodé		32			8	40
Saut Sonnelle	1					1
Total	63	305	145	15	67	595

An. darlingi were infected by *P. falciparum* (infection rate of 1.1 %) and four *An. marajoara* were infected by *P. vivax* (infection rate of 6.4 %) (Table 4).

Larvae collection

In Repentir, larval prospecting was done in ponds, pools, puddles and all-terrain vehicle (ATV) ruts. Some bromeliads were recovered from fallen trees. *Anopheles* larvae were found only in two ATV ruts filled by rainfall. They were reared in the field, but only one adult emerged, morphologically identified as *An. nuneztovari* s.l., with identification confirmed by ITS2 PCR-RFLP. No *Anopheles* larvae were found in the different bromeliads. In Dorlin, larval prospecting was done in ponds, pools, puddles and ATV ruts around the illegal settlement. No larvae were found.

Discussion

This study reports on one of the largest malaria outbreaks among French forces deployed to French Guiana [44, 45]. For the first time, an entomological study was conducted in the field, particularly at illegal gold mining sites, to evaluate infection rates and characterize *Anopheles* species implicated in malaria transmission.

Epidemiological investigation

High *P. vivax* malaria attack rates, ranging from 24.6 to 27.8 %, were observed in the three military units

Table 4 *Anopheles* species collected in Dorlin and Circumsporozoite Protein Index for *P. vivax* and *P. falciparum*

Anopheline species	MM traps[a]	CDC traps[b]	*P. falciparum*		*P. vivax*	
			n	**CSP[c] (%)**	**n**	**CSP[c] (%)**
An. darlingi	262		3	1.1	0	–
An. marajoara	44	18	0	–	4	6.4
An. nuneztovari s.l.	20		0	–	0	–
An. triannulatus s.l.	2		0	–	0	–
An. spp.	42		0	–	0	–
Total	370	18	3	1.1	4	6.4

[a] Mosquito Magnet® traps baited with octenol

[b] Centers for Disease Control and Prevention light traps

[c] Circumsporozoite Protein index

conducting the same mission: to control illegal gold mining in French Guiana. The epidemic curve presents two peaks.

The first peak corresponds to indigenous malaria cases and could be partly attributed to a lack of adherence to doxycycline chemoprophylaxis. Only 40 % of the patients stated proper chemoprophylaxis compliance in the 8 days before onset of symptoms. Comparable results had already been observed in previous malaria outbreaks among French forces [46, 47]. In a large prospective study conducted on 19 French military units, assessment of levels of compliance with chemoprophylaxis was based on the self-reported daily medication doses missed during the mission, and the average prevalence of appropriate compliance was estimated at 46.2 % [46]. Direct observation therapy is not used in the French forces [28]. During missions in the forest, taking doxycycline is more closely supervised by commanders in direct contact with soldiers. Most of the indigenous cases occurred at the end of the 4-month mission, when soldiers returned from the forest to the coast, which is free of malaria and where taking daily doses of doxycycline becomes an individual behaviour. The perception of lower malaria risk and the lack of group support at the end of the mission could explain poor levels of compliance with chemoprophylaxis [46]. Doxycycline has been shown to be highly effective as a blood schizonticidal agent, killing erythrocytic stages of the malaria parasite [48, 49]. But due to doxycycline's short half-life and the mechanism of action, its efficiency depends on proper compliance.

The second peak occurred after leaving French Guiana, with 82 % of *P. vivax* malaria imported cases occurring after terminal doxycycline chemoprophylaxis. These patients did not experience *P. vivax* malaria or fever during the 4-month mission, and their first clinical episodes were probably hypnozoite-induced relapses. Doxycycline does not affect the liver stage of the parasite, which also means that it does not kill *P. vivax* hypnozoites and, therefore, does not prevent *P. vivax* malaria relapses [48, 50, 51]. Considering *P. falciparum* resistance to malaria drugs, and in order to optimize compliance with a homogeneous prescription, 100 mg of doxycycline once a day is currently the first line chemoprophylaxis in the French armed forces [28]. Malaria chemoprophylaxis strategies in the French armed forces are mainly aimed at preventing *P. falciparum* malaria during deployments to Africa. The involvement of French forces in endemic *P. vivax* malaria transmission areas is more recent and has led to an increase in *P. vivax* incidence [29]. The Australian Defence Force encountered the same problem with *P. vivax* relapses when they became involved in the United Nations mission in East Timor from 1999 to 2000 [52, 53]. Considering the lack of prophylaxis activity of doxycycline against *P. vivax*, a daily dose of 100 mg of doxycycline during operations and 22.5 mg of primaquine daily for 2 weeks on returning to Australia were administered [54]. Attack rates observed in their forward battalions ranged from 5 to 13 %, well below those observed in the present study (>25 %). Similarly, in 2006, CDC experts recommended presumptive antirelapse therapy (terminal prophylaxis) with primaquine for 2 weeks in persons heavily exposed to *P. vivax* [55]. However, the French National Agency for Medicines and Health (ANSM) has limited the use of primaquine to patients with *P. vivax* attacks in order to prevent relapses. Therefore, liver-stage prophylaxis with primaquine for delayed-onset malaria cannot currently be used by French forces.

Scrupulously observing individual protection measures against mosquito bites is essential in such contexts. Their combined proper use will theoretically reduce exposure to biting mosquitoes, but not enough to significantly reduce the incidence of malaria among non-immune troops [56, 57]. Military personnel deployed in the interior of French Guiana live in wooden houses with corrugated aluminium roofs, without ceilings or windows. During missions in the forest, they stay directly at illegal gold mining sites, sleeping in hammocks under a waterproof tarp. Poor compliance with personal protection measures against mosquitoes was observed during missions. It suggests a failure by commanders in direct contact with soldiers to apply French armed forces health recommendations. However, hammock protection failure (mosquito bites through the fabric of the hammock during the night) most certainly played an important role in this epidemic.

Entomological investigation

The main entomological investigations were conducted at Repentir and Dorlin. Both sites were identified as presumed contamination locations by the epidemiological investigation. These sites have been subjected to human pressure for many years. After an initial period of legal activity, the mining site of Repentir was rehabilitated before being closed. But the area was then invaded by undocumented gold miners. In December 2010, military intelligence estimated that more than one thousand undocumented people were living and working in this area. The river was diverted for gold mining purposes and ponds and puddles were created. The forest was cleared for gold mining and many excavations were made that were then flooded by the river or filled by rainfall. In some places, the primary forest was destroyed and replaced by savannas, secondary forest or glades. Wells were also dug. The rest of the surrounding primary forest was criss-crossed by footpaths and ATV tracks. In

late 2010, French military forces took up positions in this area and undocumented workers left to the nearest illegal gold mining site: Dorlin. Dorlin is an old illegal gold mining site that has been exploited for 20 years. No rehabilitation of the area has ever been carried out. Military intelligence estimated that more than one thousand undocumented people were present here and working at this illegal gold mining site. Many illegal settlements were still present on the site during entomological investigations. Rivers have been diverted; the primary forest has been extensively cleared, replaced by savanna or secondary forest over large areas. Mining excavations have been transformed into lakes and ponds. Backhoes and bulldozers have been used to dig hills in the search for auriferous veins and footpaths and ATV tracks criss-cross the area.

Current entomological investigations confirm that these anthropic modifications are highly favourable to the development of *Anopheles* mosquitoes. Adult *Anopheles* from four species that could play a role in malaria transmission were collected with traps, in high densities in some places and periods. Larval prospecting was not significant due to the large size of the areas, the high number of potential breeding sites and the limitations of entomological activities due to security measures.

Morphological and molecular analysis made it possible to identify 89 % (528/595) of the *Anopheles* mosquitoes caught. Species identified were among the most frequently observed *Anopheles* species in French Guiana and the Amazon Basin [31]. However, this study confirms for the first time the role of *An. marajoara* as a *P. vivax* vector in the French Guiana rainforest. Infected anophelines were found only at the illegal gold mining site of Dorlin. The high infection rates observed confirm that illegal gold mining sites in French Guiana should be considered as high level malaria transmission areas. Thanks to the setting up of a forward operational post and legal mining operations, Repentir site was free of undocumented gold miners for 6 months before the entomological investigation. This could explain the absence of infected anopheles in this area. However, during the 1-week mission spent in Repentir, one *P. falciparum* malaria case occurred in a legal gold mining operation close to the FOP, suggesting a continuation of low malaria transmission. The use of traps did not enable the calculation of entomological inoculation rates (EIRs) or make it possible to clearly measure the number of infected bites per soldier in Repentir or Dorlin. Nevertheless, the number of *Anopheles* mosquitoes caught with traps at those sites was very high compared to previous studies in French Guiana. This suggests that anopheles densities were very high at these sites. Furthermore, CDC light traps that seemed to be more attractive to *An. marajoara* were only used for 3 days, and the abundance of this species was probably underestimated. Considering this, the malaria transmission risk could be considered as very high both at Dorlin and Repentir. These findings are consistent with other studies conducted at illegal gold mining sites including a study in Venezuela where the *An. marajoara* and *An. darlingi* association has already been described [58]. The combination of poor adherence of soldiers to protective measures and a stay in an area with a high level of malaria transmission explained the outbreak.

Illegal gold mining has modified the epidemiology of malaria in French Guiana, which was previously limited to the villages located on the main rivers flowing into the territory, in particular the Maroni and Oyapock rivers. Uncontrolled and mobile populations of undocumented gold miners could reintroduce malaria in the malaria-free coastal area of French Guiana, where competent vectors are abundant. The risk of an introduction of *P. vivax* malaria is probably higher, as *P. vivax* gametocytes are produced within the first cycles of infection [59]. This situation is challenging for malaria control and elimination in French Guiana, but also in all neighbouring countries of the Guiana Shield. There is a need to join and coordinate the efforts of all countries in order to successfully control malaria in the region.

Conclusions

Despite a decrease in the incidence of malaria in French Guiana, uncontrolled foci of malaria transmission are present in the deep forest. Gold mining is associated with malaria transmission in all the countries of the Guiana Shield. Collaboration with neighbouring countries is necessary to take into account mobile populations such as gold miners. Military personnel are especially exposed during missions at illegal gold mining sites. Malaria control strategies in the French armed forces must be adapted to *P. vivax* malaria and sylvatic *Anopheles* mosquitoes. To that end, the French military health service and Institut Pasteur de la Guyane initiated a large research programme in 2012 to evaluate human, mosquito and parasite aspects of *P. vivax* malaria transmission at illegal gold mining sites in French Guiana.

Abbreviations

RCP: river checkpoints (RCP); FOB: forward operational bases on main rivers; FOP: forward operational post in deep forest; MM traps: Mosquito Magnet® traps; CDC traps: Centers for Disease Control and Prevention light traps; PCR: polymerase chain reaction; ITS2: mosquito internal transcribed spacer 2; CSP: circumsporozoite protein.

Authors' contributions

VPS and FP designed the study and wrote the manuscript; VPS conducted the epidemiological study, analysed data and contributed to field collection; FP performed field collection, analysed and interpreted entomological data and carried out morphological and PCR identification; RG and ID supported morphological identification and ELISA tests and helped draft the manuscript; MM, AM, FS, CC and FD managed the patients and contributed to epidemiological

data collection; XD and AD contributed to study design and epidemiological data collection; SB contributed to epidemiological data analysis and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Author details
[1] French Armed Forces Center for Epidemiology and Public Health (CESPA), Camp Militaire de Sainte Marthe, BP 40026, 13568 Marseille Cedex 02, France. [2] Direction Interarmées du Service de Santé en Guyane, Quartier La Madeleine, BP 6019, 97306 Cayenne Cedex, French Guiana. [3] Medical Entomology Unit, Institut Pasteur de la Guyane, 23 Avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne Cedex, French Guiana. [4] Institut de Recherche Biomédicale des Armées, BP 73, 91223 Brétigny sur Orge Cedex, France. [5] Laboratory of Parasitology, Institut Pasteur de la Guyane, 23 Avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne Cedex, French Guiana. [6] Unit of Infectious and Tropical Diseases, Andrée Rosemon Hospital, Avenue des Flamboyants, Cayenne, French Guiana. [7] Antenne médicale de Castres, Quartier Fayolle – 68 avenue J. Desplat, CS 50025, 81108 Castres Cedex, France. [8] Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Laveran Military Teaching Hospital, 34 Boulevard Laveran, BP 50, 13013 Marseille, France. [9] Cire Océan Indien, Institut de Veille Sanitaire, 2 bis, av Georges Brassens, CS 61002, 97743 Saint-Denis Cedex 9, Réunion, France.

Acknowledgements
The authors thank Fanny Jarjaval for participating in the entomological study, Pierre Olivier Miloche, Cyril Carfantan, Christophe Rapp and Catherine Verret for data collection. Financial support was made available by the French Military Health Service, for which we are grateful.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interest.

Received: 17 June 2015 Accepted: 10 January 2016
Published online: 22 January 2016

References

1. Institut national de la statistique et des études economiques (INSEE). http://www.insee.fr/fr/regions/guyane/default.asp?page=faitsetchiffres/presentation/presentation.htm.
2. Chocho A, Bellony S, Azor P, Chantilly S. Lieux présumés de contamination palustre répertoriés sur le littoral de la Guyane - 2009. Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2011;1:6–10.
3. Ardillon V, Carvalho L, Prince C, Abboud P, Djossou F. Bilans 2013 et 2014 de la situation du paludisme en Guyane. Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2015;1:16–20.
4. Berger F, Flamand C, Musset L, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, et al. Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saul, French Guiana, January–April 2009. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:591–7. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0582.
5. Carme B. Substantial increase of malaria in inland areas of eastern French Guiana. Trop Med Int Health. 2005;10:154–9. doi:10.1111/j.1365-3156.2004.01365.x.
6. Carme B, Ardillon V, Girod R, Grenier C, Joubert M, Djossou F, et al. Update on the epidemiology of malaria in French Guiana. Med Trop. 2009;69:19–25 **(in French)**.
7. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:522–33.
8. Hiwat H, Hardjopawiro LS, Takken W, Villegas L. Novel strategies lead to pre-elimination of malaria in previously high-risk areas in Suriname, South America. Malar J. 2012;11:10. doi:10.1186/1475-2875-11-10.
9. Situação Epidemiológica Fronteiras Brasil Guiana Francesa. Portal da Saúde Ministério da Saúde. https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Fronteiras_2015_05_28/casos_notificados_2013_2014.
10. Sawyer DR. Malaria on the Amazon frontier: economic and social aspects of transmission and control. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1986;17:342–5.
11. Valle D, Lima JM. Large-scale drivers of malaria and priority areas for prevention and control in the Brazilian Amazon region using a novel multi-pathogen geospatial model. Malar J. 2014;13:443. doi:10.1186/1475-2875-13-443.
12. Spencer BR. Gold mining and malaria in the Brazilian Amazon. Masters thesis. New Haven:Yale University; 1996.
13. Duarte EC, Fontes CJ. Association between reported annual gold mining extraction and incidence of malaria in Mato Grosso-Brazil, 1985–1996. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:665–8.
14. Barbieri AF, Sawyer DO. Heterogeneity of malaria prevalence in alluvial gold mining areas in Northern Mato Grosso State, Brazil. Cad Saude Publica. 2007;23:2878–86.
15. Hiwat H, Issaly J, Gaborit P, Somai A, Samjhawan A, Sardjoe P, et al. Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (*Diptera*: *Culicidae*) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:207–13. doi:10.1016/j.trstmh.2009.07.007.
16. Girod R, Roux E, Berger F, Stefani A, Gaborit P, Carinci R, et al. Unravelling the relationships between *Anopheles darlingi* (*Diptera*: *Culicidae*) densities, environmental factors and malaria incidence: understanding the variable patterns of malarial transmission in French Guiana (South America). Ann Trop Med Parasitol. 2011;105:107–22. doi:10.1179/136485911X12899838683322.
17. Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Fouque F. *Anopheles darlingi* bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:702–10.
18. Fouque F, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Girod R. Annual variations in the number of malaria cases related to two different patterns of *Anopheles darlingi* transmission potential in the Maroni area of French Guiana. Malar J. 2010;9:80. doi:10.1186/1475-2875-9-80.
19. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:325–35.
20. Pajot FX, Le Pont F, Molez JF, Degallier N. Agressivité d'*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 (*Diptera*, *Culicidae*) en Guyane française. Cah ORSTOM SerEnt Med Parasitol. 1977;15:15–22.
21. Lourenco-de-Oliveira R, Guimaraes AE, Arle M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, et al. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:501–14.
22. de Barros FS, Honorio NA. Man biting rate seasonal variation of malaria vectors in Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:299–302.
23. Molez JF. Myths concerning malarial transmission among Amazonian Indians and their relation with 2 types of transmission encountered in the Amazonian forest. Sante. 1999;9:157–62 **(in French)**.
24. de Oliveira-Ferreira J, Lourenco-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1990;43:6–10.
25. Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R. Incrimination of *Anopheles* (*Anopheles*) *intermedius* Peryassu, *An.* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldon, *An.* (*Nys.*) *oswaldoi* Peryassu as natural vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:429–32.
26. Branquinho MS, Lagos CB, Rocha RM, Natal D, Barata JM, Cochrane AH, et al. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87:391–4.
27. Pajot FX, Molez JF, Le Pont F. Anophèles et paludisme sur le haut Oyapock (Guyane française). Cah ORSTOM SerEnt Med Parasitol. 1978;16:105–11.
28. Migliani R, Pradines B, Michel R, Aoun O, Dia A, Deparis X, et al. Malaria control strategies in French armed forces. Travel Med Infect Dis. 2014;12:307–17. doi:10.1016/j.tmaid.2014.05.008.
29. Queyriaux B, Texier G, Ollivier L, Galoisy-Guibal L, Michel R, Meynard JB, et al. *Plasmodium vivax* malaria among military personnel, French Guiana, 1998–2008. Emerg Infect Dis. 2011;17:1280–2. doi:10.3201/eid1707.100009.
30. Service MW. Mosquito ecology. New York: Wiley; 1976.
31. Shannon RC. Anophelines of the Amazon valley. Proc Entomol Soc Wash. 1933;35:117–43.
32. Floch H, Abonnenc E. Anophèles de la Guyane Française. Arch Inst Pasteur Guyane. 1951;236:1–92.
33. Fauran P, Pajot FX. Complement to the catalog of the *Culidae* Recorded from French Guiana (South America). Mosq News. 1974;6:99–110.

34. Fauran P. Catalogue annoté des Culicidés signalés en Guyane Française. Arch Inst Pasteur Guyane. 1961;22:1–15.
35. Dusfour I, Carinci R, Gaborit P, Issaly J, Girod R. Evaluation of four methods for collecting malaria vectors in French Guiana. J Econ Entomol. 2010;103:973–6.
36. Cienfuegos AV, Rosero DA, Naranjo N, Luckhart S, Conn JE, Correa MM. Evaluation of a PCR-RFLP-ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. Acta Trop. 2011;118:128–35. doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.004.
37. Zapata MA, Cienfuegos AV, Quiros OI, Quinones ML, Luckhart S, Correa MM. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Uraba, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:67–72.
38. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quinones ML, et al. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. Parasit Vectors. 2012;5:44. doi:10.1186/1756-3305-5-44.
39. Burkot TR, Zavala F, Gwadz RW, Collins FH, Nussenzweig RS, Roberts DR. Identification of malaria-infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg. 1984;33:227–31.
40. Durnez L, Van Bortel W, Denis L, Roelants P, Veracx A, Trung HD, et al. False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. Malar J. 2011;10:195. doi:10.1186/1475-2875-10-195.
41. Vo TK, Bigot P, Gazin P, Sinou V, De Pina JJ, Huynh DC, et al. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101:422–8. doi:10.1016/j.trstmh.2006.09.004.
42. d-maps.com. http://d-maps.com/pays.php?num_pay=243&lang=fr.
43. Dusfour I, Jarjaval F, Gaborit P, Mura M, Girod R, Pages F. Confirmation of the occurrence of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *marajoara* in French Guiana. J Am Mosq Control Assoc. 2012;28:309–11.
44. Verret C, Cabianca B, Haus-Cheymol R, Lafille JJ, Loran-Haranqui G, Spiegel A. Malaria outbreak in troops returning from French Guiana. Emerg Infect Dis. 2006;12:1794–5. doi:10.3201/eid1211.060530.
45. Michel R, Ollivier L, Meynard JB, Guette C, Migliani R, Boutin JP. Outbreak of malaria among policemen in French Guiana. Mil Med. 2007;172:977–81.
46. Resseguier N, Machault V, Ollivier L, Orlandi-Pradines E, Texier G, Pradines B, et al. Determinants of compliance with malaria chemoprophylaxis among French soldiers during missions in inter-tropical Africa. Malar J. 2010;9:41. doi:10.1186/1475-2875-9-41.
47. Ollivier L, Michel R, Carlotti MP, Mahe P, Romand O, Todesco A, et al. Chemoprophylaxis compliance in a French battalion after returning from malaria-endemic area. J Travel Med. 2008;15:355–7. doi:10.1111/j.1708-8305.2008.00219.x.
48. Tan KR, Magill AJ, Parise ME, Arguin PM. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. Am J Trop Med Hyg. 2011;84:517–31. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0285.
49. Briolant S, Almeras L, Fusai T, Rogier C, Pradines B. Cyclines and malaria. Med Trop (Mars). 2007;67:86–96 **(in French)**.
50. Schwartz E, Parise M, Kozarsky P, Cetron M. Delayed onset of malaria—implications for chemoprophylaxis in travelers. N Engl J Med. 2003;349:1510–6. doi:10.1056/NEJMoa021592.
51. Clyde DF, Miller RM, DuPont HL, Hornick RB. Antimalarial effects of tetracyclines in man. J TropMed Hyg. 1971;74:238–42.
52. Peragallo MS, Croft AM, Kitchener SJ. Malaria during a multinational military deployment: the comparative experience of the Italian, British and Australian Armed Forces in East Timor. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96:481–2.
53. Kitchener S, Nasveld P, Russell B, Elmes N. An outbreak of malaria in a forward battalion on active service in East Timor. Mil Med. 2003;168:457–9.
54. Kitchener S. Epidemiology of malaria from East Timor among Australian Defence Force personnel. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96:376–7.
55. Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:402–15.
56. Pages F. Vector control for armed forces: a historical requirement requiring continual adaptation. Med Trop. 2009;69:165–72 **(in French)**.
57. Deparis X, Frere B, Lamizana M, N'Guessan R, Leroux F, Lefevre P, et al. Efficacy of permethrin-treated uniforms in combination with DEET topical repellent for protection of French military troops in Cote d'Ivoire. J Med Entomol. 2004;41:914–21.
58. Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. Med Vet Entomol. 2007;21:339–49. doi:10.1111/j.1365-2915.2007.00704.x.
59. Claustre J, Venturin C, Nadire M, Fauran P. Malarial vectors in French Guiana: study in an epidemic focus near Cayenne (1989–1998). Bull Soc Pathol Exot. 2001;94:353–7 **(in French)**.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



- **Travail original 2 :** Le paludisme en Guyane lié à l'orpaillage illégal.

Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, Nguyen C, Vezenegho SB, Dusfour I, Girod R, Briolant S. Malaria in French Guiana linked to illegal gold mining. Emerg Infect Dis. 2016; 22(2): 344-346.

Résumé

Les missions de lutte contre l'orpaillage illégal en forêt guyanaise se sont accompagnées d'une augmentation de l'incidence du paludisme avec de nombreuses épidémies chez les militaires français. Lors de ces missions, les militaires passent entre une à trois semaines sur les sites d'orpaillage. La plupart des cas de paludisme surviennent pendant ou juste après la mission et les lieux présumés de contamination sont donc identifiables. Tous les cas de paludisme déclarés à la surveillance épidémiologique dans les armées sur la période 2008-2014 ont été analysés et les coordonnées GPS (« global positioning system ») des lieux présumés de contamination téléchargés dans un système d'information géographique pour produire une carte de la distribution des cas. Au total, 74,7% (554/742) des cas de paludisme étaient liés à des missions sur des sites d'orpaillage illégaux.

En parallèle, deux investigations entomologiques ont été menées sur deux sites d'orpaillage liés à deux épidémies de paludisme : Eau Claire et Dagobert. Les anophèles ont été identifiés morphologiquement puis par PCR et par le séquençage des gènes *its2* (internal transcribed spacer 2) et *coi* (Cytochrome Oxydase I). Une infection plasmodiale des anophèles était recherchée par PCR. Quatre espèces d'anophèles ont été capturées sur ces sites : *An. darlingi*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. triannulatus s.l.* et *An. ininii*. Deux espèces étaient infectées par *P. vivax* (*An. darlingi*, taux d'infection de 0,4% et *An. nuneztovari s.l.*, taux d'infection de 5,0%). Deux espèces étaient infectées par *P. falciparum* (*An. nuneztovari s.l.*, taux d'infection de 5,0% et *An. ininii*, taux d'infection de 12,5%). *An. ininii* était confirmé vecteur de paludisme pour la première fois en Guyane.

Discussion – conclusions

Cette étude confirme le lien entre le paludisme sur les sites d'orpaillage et le paludisme chez les militaires français. Elle illustre la diversité des vecteurs de plasmodies rencontrés en forêt avec des taux d'infection des anophèles que l'on a plutôt l'habitude d'observer en Afrique Centrale. En outre, *An. ininii* est confirmé vecteur de paludisme pour la première fois en Guyane.

4. Rebelo M, Tempera C, Bispo C, Andrade C, Gardner R, Shapiro HM, et al. Light depolarization measurements in malaria: A new job for an old friend. Cytometry A. 2015;87:437–45. http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22659
5. Rebelo M, Shapiro HM, Amaral T, Melo-Cristino J, Hänscheid T. Haemozoin detection in infected erythrocytes for *Plasmodium falciparum* malaria diagnosis-prospects and limitations. Acta Trop. 2012;123:58–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.03.005

Address for correspondence: Thomas Hänscheid, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa, Av Prof Egas Moniz, P-1649-028 Lisbon, Portugal; email: t.hanscheid@medicina.ulisboa.pt

In Response:

Ekaterina Lukianova-Hleb, Sarah Bezek, Reka Szigeti, Alexander Khodarev, Thomas Kelley, Andrew Hurrell, Michail Berba, Nirbhay Kumar, Umberto D'Alessandro, Dmitri Lapotko

Author affiliations: Rice University, Houston, Texas, USA (E. Lukianova-Hleb, D. Lapotko); Baylor College of Medicine, Houston (S. Bezek, R. Szigeti); Ben Taub General Hospital, Harris Health System, Houston (S. Bezek, R. Szigeti); X Instruments LLC, Fremont, California, USA (A. Khodarev); Precision Acoustics Ltd, Dorset, England, UK (T. Kelley, A. Hurrell); Standa UAB, Vilnius, Lithuania (M. Berba); Tulane University, New Orleans, Louisiana, USA (N. Kumar); Medical Research Council, Banjul, The Gambia (U. D'Alessandro); London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK (U. D'Alessandro)

DOI: http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.151829

In Response: The letter by Rebelo et al. (*1*) that questions our previously described noninvasive malaria diagnostics (*2*,*3*) misinterprets both articles. The main objection comes to our alleged call for "large-scale studies in humans"; no such statement appeared in our 2014 article (*2*), and in the 2015 article (*3*), we clearly stated that large-scale studies will be considered after the optimization of a new prototype and improving its sensitivity. The authors' final questioning of our eligibility for resources is a nonscientific opinion.

Concerning the quality of the standard clinical diagnosis, both thin blood film analysis and rapid diagnostic test results were obtained in a certified US clinical laboratory and returned consistent data. The lack of re-evaluation of the patient and the diagnostic timing are indeed limitations but were caused by the clinical restrictions. Our goal in the 2015 article (*3*) was to demonstrate the first noninvasive diagnosis of malaria in a human, which was achieved. The additional parameters discussed in the letter were not the subject of this study. Their letter further misinterprets our 2014 study, stating that parasitemia was virtual in that article; in fact, we studied actual infections among mice (*2*).

The criticism of Rebelo et al. might have been fueled by their own limited detection of hemozoin with flow cytometry and microscopy (*4*), in which they used parasite cultures and an unspecified number of malaria patients. That the methods they used might not have performed well does not mean that the novel technology we described, based upon a different mechanism, would have the same limitations in detecting hemozoin.

In conclusion, we agree with the need for optimization of the technology and additional testing. We are currently developing and testing our technology in a malaria-endemic country. Nevertheless, the letter by Rebelo et al. does not alter the fact that our novel noninvasive malaria diagnostic technology worked in a human.

References

1. Rebelo M, Grenho R, Orban A, Hänscheid T. Transdermal diagnosis of malaria using vapor nanobubbles [letter]. Emerg Infect Dis. 2016; 22:343. http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.151203
2. Lukianova-Hleb EY, Campbell KM, Constantinou PE, Braam J, Olson JS, Ware RE, et al. Hemozoin-generated vapor nanobubbles for transdermal reagent- and needle-free detection of malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:900–5. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1316253111
3. Lukianova-Hleb E, Bezek S, Szigeti R, Khodarev A, Kelley T, Hurrell A, et al. Transdermal diagnosis of malaria using vapor nanobubbles. Emerg Infect Dis. 2015;21:1122–7. http://dx.doi.org/10.3201/eid2107.150089
4. Rebelo M, Shapiro HM, Amaral T, Melo-Cristino J, Hänscheid T. Haemozoin detection in infected erythrocytes for *Plasmodium falciparum* malaria diagnosis-prospects and limitations. Acta Trop. 2012;123:58–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.03.005

Address for correspondence: Dmitri Lapotko, Rice University, Houston, Texas, USA, 6100 Main St, MS-140, Houston, TX 77005, USA; email: dl5@rice.edu

Malaria in French Guiana Linked to Illegal Gold Mining

Vincent Pommier de Santi, Aissata Dia, Antoine Adde, Georges Hyvert, Julien Galant, Michel Mazevet, Christophe Nguyen, Samuel B. Vezenegho, Isabelle Dusfour, Romain Girod, Sébastien Briolant

Author affiliations: Military Center for Epidemiology and Public Health, Marseille, France (V. Pommier de Santi, A. Dia); Direction Interarmées du Service de Santé en Guyane, Cayenne, French

Guiana (V. Pommier de Santi, G. Hyvert, J. Galant, M. Mazevet, C. Nguyen, S. Briolant); Institut Pasteur, Cayenne (A. Adde, C. Nguyen, S.B. Vezenegho, I. Dusfour, R. Girod, S. Briolant); Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, France (C. Nguyen, S. Briolant)

DOI: http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.151292

To the Editor: French Guiana, an overseas territory of France and part of the European Union, is located on the northeast coast of South America (Figure). During 2008–2014, the number of malaria cases reported in French Guiana drastically decreased (*1*). The littoral area (≈30 km–wide Atlantic Ocean coastal band between the cities of Awala-Yalimapo and Ouanary) and the lower part of the Maroni River bordering Suriname (between the cities of Maripasoula and Saint-Laurent du Maroni) are considered malaria free, but this status may not reflect malaria transmission in the inland rainforest (*2–4*). Since 2008, French Armed Forces have been involved in military operations to control and reduce illegal gold mining activities in forested areas. Soldiers and military policemen usually spend 1–3 weeks in illegal gold mining sites in remote rainforest areas before returning to the littoral area or to bases on rivers bordering Suriname and Brazil. Despite malaria prevention strategies (*5*), these deployments have resulted in several outbreaks and increased malaria incidence among French forces (*6*). Most malaria episodes occurred during or just after deployments, so presumed locations of exposure can be easily identified.

Information about malaria cases was collected during 2008–2014 by the French Armed Forces' epidemiologic surveillance system by using a mandatory, specific form that captured putative place of malaria exposure and biologic data for case-patients (*6*). Geographic coordinates of presumed places of contamination were uploaded into a geographic information system (ArcGIS; http://www.esri.com/software/arcgis/) to produce a malaria distribution map.

During 2008–2014, a total of 1,070 malaria cases were reported to the French Armed Forces' epidemiologic surveillance system. *Plasmodium vivax* accounted for 78.8% (843/1,070), *P. falciparum* for 18.0% (193/1,070), and mixed infection (*P. vivax* and *P. falciparum*) for 3.2% (34/1,070). Places where malaria exposure occurred were identified for 742 cases of single malaria (586 *P. vivax* and 156 *P. falciparum*) infections (Figure). Cases occurring along the Maroni and Oyapock Rivers delimiting the frontiers with Suriname and Brazil, respectively, accounted for 25.3% (188/742). The other cases (74.7%, 554/742) were associated with exposures during military operations in illegal gold mining sites.

Entomologic investigations were conducted in 2 malaria epidemic locations where French forces were deployed: Eau-Claire and Dagobert. Collected *Anopheles* spp. mosquito specimens were identified by using morphologic keys specific to the Guyana Shield, a geomorphologic formation underlying French Guiana and other areas (*7*). Nonidentifiable *Anopheles* mosquito specimens were further identified molecularly (*8*). PCR products from the internal transcribed spacer 2 gene were sequenced, and *Anopheles* species were identified by comparing sequences to those in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) by searching with BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Testing for *P. falciparum* and *P. vivax* infections was conducted for all *Anopheles* spp. specimens by using nested PCR, as described (*9*).

In May 2013, a malaria outbreak occurred 1 month after military deployment of 100 soldiers at Eau Claire (3.56075°N, –53.21268°E; Figure), where 1 Mosquito Magnet trap (Woodstream Corporation, Lititz, PA, USA) baited with octenol was used to sample *Anopheles* mosquitoes during April 22–May 12, 2013 (*10*). The attack rate among the soldiers was 5.0% (5/100): 4 *P. vivax* and 1 *P. falciparum* malaria cases. Fifty-three *Anopheles* mosquito specimens were caught during the 20 days before the outbreak and identified as comprising 4 species (online Technical

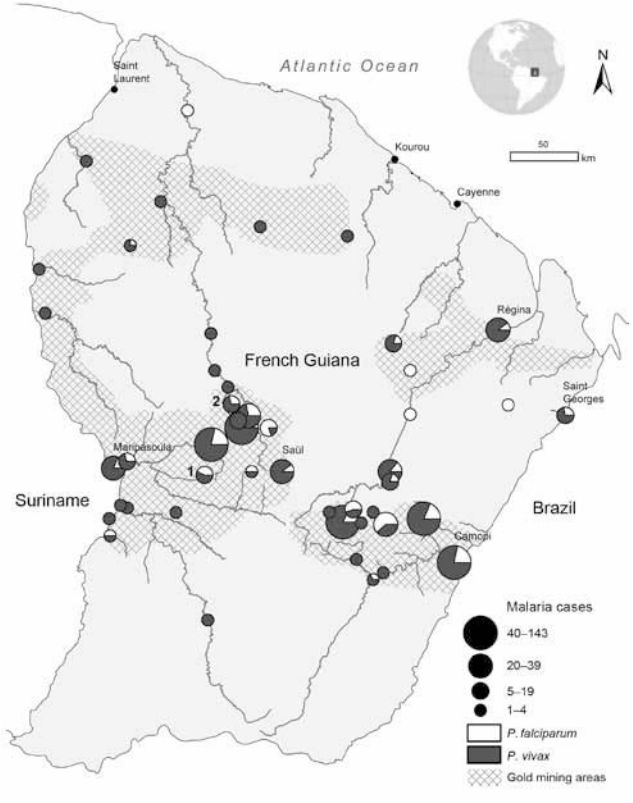


Figure. Geographic distribution of presumed places of exposure for 742 single-infection *Plasmodium vivax* (586) and *P. falciparum* (156) malaria cases reported among French Armed Forces in French Guiana, 2008–2014. Numbers on map show illegal gold mining sites where entomologic investigations were conducted; 1 indicates Eau Claire; 2 indicates Dagobert.

Appendix Table, http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/22/2/15-1292-Techapp1.pdf).). *P. falciparum* infection was detected in 2 *Anopheles* species: 1 (12.5%) of 8 *An. ininii* and 1 (5.0%) of 19 *An. nuneztovari s.l.* mosquitoes collected; *P. vivax* infection was found in 1 (5.5%) of 19 *An. nuneztovari s.l.* mosquitoes.

In September 2013, another malaria outbreak occurred 3 weeks after the deployment of 15 soldiers in Dagobert (4.06028°N, -53.70667°E; Figure). The attack rate among these soldiers was 53.3% (8/15): 7 *P. vivax* infections and 1 co-infection with *P. vivax* and *P. falciparum*. Mosquitoes were collected 3 months later by using human landing catches during 5 consecutive days. The area had been free of illegal gold mining activities since the 15 soldiers were deployed. A total of 321 *Anopheles* mosquitoes were collected in this location; 95.6% were identified as the same 4 species as in the Eau Claire mosquito collection (online Technical Appendix Table). Only 1 specimen (0.4%, 1/282), *An. darlingi* mosquito, was infected with *P. vivax*.

These results suggest a high level of malaria transmission involving *An. darlingi* and other *Anopheles* species as primary vectors of malaria in the rainforest. The findings probably highlight malaria hyperendemicity in communities of undocumented gold miners, who are often mobile and pose a challenge for controlling malaria and other infectious diseases in the region. Indeed, these gold miners could reintroduce malaria in areas where competent vectors exist in the coastal part of French Guiana and in Surinam and Brazil, which border French Guiana. This potential for transmission could seriously threaten the success of malaria elimination programs in the Guiana Shield. Further studies are needed to better evaluate malaria epidemiology in these undocumented populations to determine how best to adapt strategies to control malaria transmission in this subregion of South America.

Acknowledgments

We thank military physicians who participated in malaria epidemiologic surveillance in French Guiana and France during 2008–2014, especially E. de Parseval, N. Barthes, J.-P. Boudsocq, C. Ilcinkas, P.-A. Poutou, G. Samy, E. Martinez, F.-X. Le Flem, and C. Marchand. We also thank P. Gaborit, R. Carinci, and J. Issaly for their support in the entomologic studies.

References

1. Ardillon V, Carvalho L, Prince C, Abboud P, Djossou F. Bilans 2013 et 2014 de la situation du paludisme en Guyane. Bulletin de veille sanitaire Antilles–Guyane. 2015 [cited 2015 Jul 15]. p. 16–20. http://www.invs.sante.fr/fr/Publications-et-outils/Bulletin-de-veille-sanitaire/Tous-les-numeros/Antilles-Guyane/Bulletin-de-veille-sanitaire-Antilles-Guyane.-n-1-Janvier-2015
2. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:525–33. http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140031
3. Carme B. Substantial increase of malaria in inland areas of eastern French Guiana. Trop Med Int Health. 2005;10:154–9. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01365.x
4. Berger F, Flamand C, Musset L, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, et al. Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saul, French Guiana, January–April 2009. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:591–7. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0582
5. Migliani R, Pradines B, Michel R, Aoun O, Dia A, Deparis X, et al. Malaria control strategies in French armed forces. Travel Med Infect Dis. 2014;12:307–17. http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.05.008
6. Queyriaux B, Texier G, Ollivier L, Galoisy-Guibal L, Michel R, Meynard JB, et al. *Plasmodium vivax* malaria among military personnel, French Guiana, 1998–2008. Emerg Infect Dis. 2011;17:1280–2. http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.100009
7. Floch H, Abonnenc E. *Anophèles* de la Guyane Française. Arch Inst Pasteur Guyane. 1951;236:1–92.
8. Beebe NW, Saul A. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg. 1995;53:478–81.
9. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993;61:315–20. http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(93)90077-B
10. Vezenegho SB, Adde A, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Pommier de Santi V, et al. Mosquito magnet® liberty plus trap baited with octenol confirmed best candidate for *Anopheles* surveillance and proved promising in predicting risk of malaria transmission in French Guiana. Malar J. 2014;13:384. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-384

Address for correspondence: Vincent Pommier de Santi, Military Center for Epidemiology and Public Health, Camp Militaire de Sainte Marthe, BP 40026, 13568 Marseille CEDEX 02, France; email: v.pommierdesanti@gmail.com

Importation of Fosfomycin Resistance *fosA3* Gene to Europe

Ana C. Mendes, Carla Rodrigues, João Pires, José Amorim, Maria Helena Ramos, Ângela Novais,[1] Luísa Peixe[1]

Author affiliations: Universidade do Porto, Porto, Portugal (A.C. Mendes, C. Rodrigues, J. Pires, Â. Novais, L. Peixe); Centro Hospitalar do Porto, Porto (A.C. Mendes, M.H. Ramos); Botelho Moniz Análises Clínicas, Santo Tirso, Portugal (J. Amorim)

DOI: http://dx.doi.org/10.3202/eid2202.151301

To the Editor: The wide spread of *Enterobacteriaceae* resistant to last-resource therapeutic options, including

[1]These authors contributed equally to this article.

1.2 - Comportement vectoriel

- **Travail original 3 :** Risque de transmission diurne du paludisme en forêt Guyanaise.

Pommier de Santi V, Dusfour I, de Parseval E, Lespinet B, Nguyen C, Gaborit P, Carinci R, Hyvert G, Girod R, Briolant S. Risque de transmission diurne du paludisme en forêt Guyanaise. Med Sante Trop. 2017; 27(1): 111-112.

Résumé

Entre 2008 et 2014, 1070 cas de paludisme ont été rapportés dans les Forces Armées en Guyane. La plupart des épidémies de paludisme investiguées sont multifactorielles et consécutives à une mission sur un site d'orpaillage illégal. En septembre 2013, une épidémie de paludisme est survenue trois semaines après le déploiement de 15 militaires sur le site d'orpaillage illégal de Dagobert. Le taux d'attaque était de 53% avec sept infections à *P. vivax* et une co-infection à *P. vivax/P. falciparum*. Deux mois plus tard, une investigation entomologique avec capture sur homme des anophèles a été réalisée sur site. Au total, 321 anophèles dont 282 *An. darlingi* ont été capturés. Un spécimen d'*An. darlingi* a été retrouvé positif en PCR pour *P. vivax*, soit un taux d'infection de 0,4% (1/282). *An. darlingi* a été capturé en journée dans 15,7% des cas.

Discussion - conclusion

L'existence d'une activité de piqûre diurne d'*An. darlingi* en forêt guyanaise pourrait jouer un rôle déterminant dans la survenue d'épidémie de paludisme chez les militaires. En effet, le Service de santé des armées recommande l'application de mesures de protection individuelle contre les piqures de moustiques du crépuscule à l'aube. C'est pourquoi, une adaptation au contexte guyanais des recommandations du Service de santé des armées sur la lutte contre le paludisme est nécessaire.

Risque de transmission diurne du paludisme en forêt Guyanaise.

Risk of daytime transmission of malaria in French Guiana rainforest.

Médecine et Santé Tropicales 2017 ; 27 : 111-112

Vincent Pommier de Santi[1, 2], Isabelle Dusfour[3], Etienne de Parseval[4], Benjamin Lespinet[2], Christophe Nguyen[2, 3, 5], Pascal Gaborit[3], Romuald Carinci[3], Georges Hyvert[2], Romain Girod[3], Sébastien Briolant[2, 3, 5, 6*]

[1] Centre d'Epidémiologie et de Santé Publique des Armées, Camp Militaire de Sainte Marthe, BP 40026, 13568 Marseille Cedex 02, France

[2] Direction Interarmées du Service de Santé en Guyane, Quartier La Madeleine, BP 6019, 97306 Cayenne Cedex, Guyane

[3] Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de la Guyane, 23 Avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne Cedex, Guyane

[4] Centre Médical des Armées de Montauban, Avenue du 10e Dragon, 82000 Montauban, France

[5] Unité de Parasitologie et d'Entomologie, Département des Maladies Infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, BP 73, 91223 Brétigny sur Orge cedex, France

[6] Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Aix Marseille Université, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Faculté de Médecine, 27 bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France

*Auteur correspondant : Sébastien Briolant MD, PhD

Résumé. Entre 2008 et 2014, 1070 cas de paludisme ont été rapportés dans les Forces Armées en Guyane. La plupart des épidémies de paludisme investiguées sont multifactorielles et consécutives à une mission sur un site d'orpaillage illégal. En septembre 2013, une épidémie de paludisme est survenue trois semaines après le déploiement de 15 militaires sur le site d'orpaillage illégal de Dagobert. Le taux d'attaque était de 53% avec sept infections à *Plasmodium vivax* et une co-infection à *Plasmodium vivax/Plasmodium falciparum*. Deux mois plus tard, une investigation entomologique avec capture sur homme des anophèles a été

réalisée sur site. Au total, 321 anophèles dont 282 *Anopheles darlingi* ont été capturés. Un spécimen d'*An. darlingi* a été retrouvé positif en PCR pour *P. vivax*, soit un taux d'infection de 0,4% (1/282). *An. darlingi* a été capturé en journée dans 15,7% des cas. L'existence d'une activité de piqûre diurne d'*An. darlingi* en forêt guyanaise pourrait jouer un rôle déterminant dans la survenue d'épidémie de paludisme chez les militaires. C'est pourquoi, une adaptation au contexte guyanais des recommandations du Service de santé des armées sur la lutte contre le paludisme est nécessaire.

Abstract. Between 2008 and 2014, there were 1070 malaria cases reported in French Guiana among members of the armed forces. Most of the malaria outbreaks investigated were multifactorial and followed missions conducted at illegal gold mining sites. For example, a malaria outbreak occurred in September 2013, three weeks after the deployment of 15 soldiers at Dagobert, which is such a site. The attack rate was 53%, with seven *Plasmodium vivax* infections and one coinfection with both *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Two months later, an entomological investigation in the field caught 321 anopheles by the human landing catch method. Among them, 282 were *Anopheles darlingi*. One specimen was PCR-positive for *P. vivax*, for an infection rate of 0.4% (1/282). In 15.7% of these cases, the *An. darlingi* was caught during the day. The existence of daytime biting activity by *An. darlingi* in the Guianese forest might play a key role in malaria outbreaks among military personnel. This finding requires that the Army Health Service adapt its recommendations concerning malaria prevention in French Guiana.

Mots-clés : Paludisme, Guyane française, *Anopheles darlingi*, transmission diurne.

Keywords: Malaria, French Guiana, *Anopheles darlingi*, daytime transmission.

Article disponible sur : John Libbey EEUROTEXT http://www.jle.com/fr/revues/mst/e-docs/risque_de_transmission_diurne_du_paludisme_en_foret_guyanaise_309514/article.phtml

Depuis 2008, les Forces Armées et de la Gendarmerie Nationale sont engagées en Guyane dans l'opération Harpie dont l'objectif est la lutte contre l'orpaillage illégal. Les conditions de vie rustiques en forêt, sous un climat équatorial humide, et au contact des populations d'orpailleurs évoluant dans un contexte sanitaire particulièrement précaire, exposent militaires et gendarmes à différents agents infectieux dont les plasmodies responsables du paludisme. Entre 2008 et 2014, 1070 cas de paludisme ont été rapportés dans les forces en Guyane dont 78,8% (843/1070) étaient associés à *Plasmodium vivax*, 18,0% (193/1070) à *P. falciparum* et 3,2% (34/1070) à des coinfections (*P. vivax/P. falciparum*) (1). Dans 74,7% (554/742) des cas, la survenue d'un accès palustre était consécutive à une mission effectuée sur un site d'orpaillage illégal, au cœur de la forêt guyanaise.

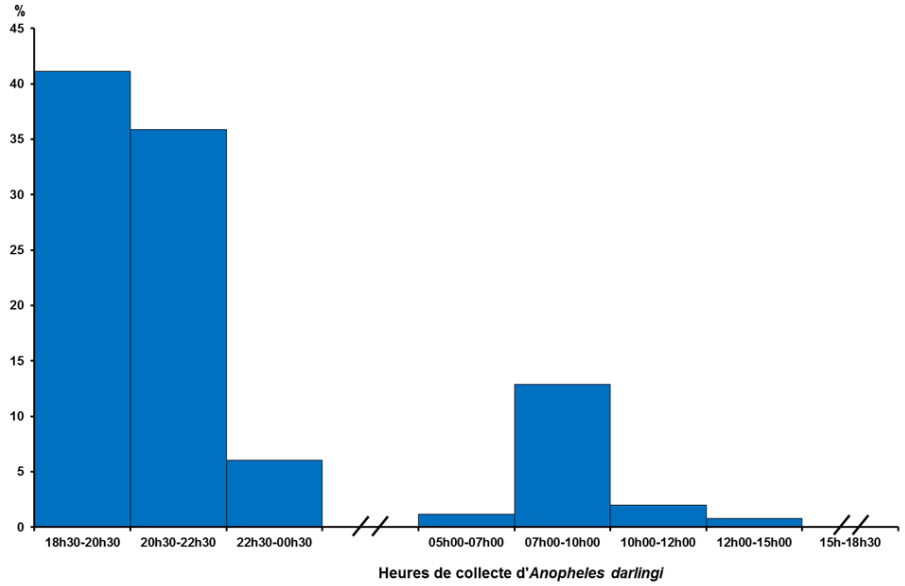
La plupart des épidémies de paludisme investiguées sont multifactorielles : (i) les taux d'infection des anophèles se sont montrés particulièrement élevés sur certains sites, variant de 0,5% à 12,5%, et aux côtés d'*Anopheles darlingi,* vecteur majeur du paludisme en Amazonie*,* d'autres espèces ont révélé leur capacité à transmettre des plasmodies sur les sites d'orpaillage : *An. marajoara, An. ininii et An. nuneztovari sensu lato* (1, 2). (ii) Le matériel de protection individuel vis-à-vis des piqûres de moustiques n'est pas adapté et est en cours de remplacement (tissu trop fin du hamac n'empêchant pas les piqûres au niveau dorsal, et durée de protection inférieure à quatre mois des treillis pré-imprégnés de perméthrine). (iii) La chimioprophylaxie par doxycycline, prescrite en première intention en milieu militaire, ne permet pas de prévenir les accès de reviviscence à *P. vivax*. (iv) Dans une étude menée en 2015, en population d'orpailleurs en situation irrégulière, la prévalence du paludisme a atteint 48,3% et 48,5% des cas diagnostiqués étaient des porteurs asymptomatiques, donc réservoirs de parasites (3).

D'autres facteurs liés au comportement des anophèles pourraient aussi expliquer ces épidémies. En septembre 2013, une épidémie de paludisme est survenue trois semaines après le déploiement de 15 militaires sur le site d'orpaillage illégal de Dagobert (4.06028°N, -53.70667°E). Le taux d'attaque était de 53% (8/15) avec sept infections à *P. vivax* et une co-infection à *P. vivax/P. falciparum*. Deux mois plus tard, une investigation entomologique avec capture sur homme des anophèles a été réalisée sur site du 27 novembre au 1er décembre 2013. Après identification morphologique à la loupe binoculaire, grâce à l'utilisation de trois clés taxonomiques de la région amazonienne, la répartition des espèces était la suivante : 87,9% (282/321) d'*An. darlingi*, 5,3% (17/321) d'*An. nuneztovari sensu lato*, 2,2% (7/21)

d'*An. triannulatus sensu lato* et 0,2% (1/321) d'*An. ininii.* Au total, 4,4% (14/321) des anophèles n'ont pas pu être identifiés. La technique PCR décrite par Snounou *et al*. (4), a permis de mettre en évidence un spécimen d'*An. darlingi* (capturé de nuit) positif pour *P. vivax*, soit un taux d'infection de 0,4% (1/282), alors que le site était inoccupé depuis deux mois. Ce résultat soulève aussi la question d'une longévité importante des vecteurs et de leur rôle potentiel comme réservoir de parasites. *An. nuneztovari sensu lato*, *An. triannulatus sensu lato* et *An. ininii* ont été capturés uniquement la nuit entre 18h30 et 20h30. En revanche, sur un effort de capture identique entre le jour (8 heures de collecte) et la nuit (8 heures de collecte), effectué par trois captureurs, uniquement du 28 novembre au 1er décembre 2013, *An. darlingi* a été capturé en journée dans 15,7% des cas (p = 39/248, IC 95% [11,4-20,9]), (Figure 1).

Figure 1. Pourcentages d'*Anopheles darlingi* (n=248) capturés en fonction des créneaux horaires de collecte sur le site de Dagobert, du 28 novembre au 1er décembre 2013 (8 heures de collecte nocturne, 8 heures de collecte diurne).

Figure 1. *Percentages of Anopheles darlingi (n=248) captured according to collection time slots at the Dagobert, from November 28 to December 1, 2013 (8 hours of nocturnal and 8 hours of daytime collection).*



La possibilité de piqûres diurnes d'*An. darlingi* en particulier, mais aussi d'autres espèces, a déjà été rapportée en Guyane dans certains villages mais dans des proportions cependant bien

moindres pour ce qui concerne *An. darlingi* (5). Nous décrivons pour la première fois la possibilité d'une transmission diurne du paludisme sur les sites d'orpaillage illégal. Les mesures de protection individuelle vis-à-vis des piqûres d'anophèles (répulsif cutané et tenue longue) sont règlementairement mises en œuvre dans les Armées françaises de la tombée de la nuit jusqu'au matin. L'existence d'une activité de piqûre diurne d'*An. darlingi* en forêt guyanaise, possiblement lié à l'humidité et la semi-obscurité régnant sous la canopée, pourrait jouer un rôle déterminant dans la survenue d'épidémie de paludisme chez les militaires. Une adaptation des recommandations du Service de santé des armées sur la lutte contre le paludisme au contexte guyanais est nécessaire. Cette étude illustre la complexité de la transmission du paludisme en Guyane mais aussi l'importance des investigations multidisciplinaires sur le terrain pour comprendre les déterminants des épidémies afin de proposer des solutions adaptées à chaque situation.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, *et al*. Malaria in French Guiana linked to illegal gold mining. *Emerg Infect Dis* 2016 ; 22 : 344-6.
2. Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, *et al*. Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. *Malaria J* 2016 ; 15 : 35.
3. Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, *et al*. Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 2016 ; 22 : 903-6.
4. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, *et al*. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993 ; 61 : 315-20.
5. Dusfour I, Carinci R, Issaly J, Gaborit P, Girod R. A survey of adult anophelines in French Guiana: enhanced descriptions of species distribution and biting responses. *J Vector Ecol* 2013 ; 38 : 203-9.

1.3 - Le réservoir des plasmodies en forêt guyanaise

- **Travail original 4 :** Paludisme hyperendémique et risque de résistance à l'artémisinine chez les orpailleurs en situation irrégulière en Guyane.

Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, Bogreau H, Hyvert G, Nguyen C, Pelleau S, Legrand E, Musset L, Nacher M, Briolant S. Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2016; 22(5): 903-906.

Résumé

La survenue de multiples épidémies liées à plusieurs agents pathogènes parmi les orpailleurs en situation irrégulière sur le site d'Eau Claire a conduit les autorités sanitaires françaises à décider d'une mission d'assistance et d'évaluation sanitaire en forêt. Cette étude présente les résultats de l'évaluation de la situation épidémiologique du paludisme dans cette population.

Pendant dix jours en mai-juin 2014, une équipe multidisciplinaire a proposé un dépistage et un traitement du paludisme sur le site d'orpaillage illégal d'Eau Claire, en plus d'une offre de soins pour tout motif de consultation. Le dépistage était basé sur l'utilisation de test de diagnostic rapide et la lecture microscopique du frottis sanguin. Une recherche d'ADN plasmodial était réalisée secondairement à partir d'un prélèvement sanguin sur papier buvard. Les antécédents des patients, leurs parcours géographiques, leur utilisation des traitements antipaludiques étaient recueillis par questionnaire anonyme.

Sur les 205 sujets participants au dépistage, la prévalence globale de l'infection était de 48,3%. Les infections simples à *P. falciparum* étaient de 44,4%, celles à *P. vivax* de 29,3%. Les infections mixtes à *P. falciparum* et *P. vivax* étaient de 26,3%. La proportion des infections asymptomatiques était de 40,4% (40/99). Une automédication par antipaludique, majoritairement des traitements combinés à base d'artémisinine (ACT, « artemisinin-based combination therapy »), était déclarée par 58,5% (120/205) des patients. Les schémas thérapeutiques suivis étaient incomplets. Une très forte mobilité des orpailleurs était observée, à l'intérieur de la Guyane mais aussi à l'échelle du plateau des Guyanes (Brésil et Suriname).

Discussion – conclusions

La prévalence élevée de paludisme associée à un fort taux de porteurs asymptomatiques de plasmodies nous permet de conclure que le paludisme est hyperendémique chez les orpailleurs en situation irrégulière en Guyane. Les proportions des espèces plasmodiales

montrent que *P. falciparum* est prédominant sur ces sites, à l'inverse de ce qui est observé chez les militaires français ou en population guyanaise. L'automédication anarchique par ACT fait craindre l'émergence de résistances de *P. falciparum*, particulièrement à l'artémisinine. Ces résistances pourraient ensuite diffuser rapidement à l'échelle du plateau des Guyanes compte tenu de la très forte mobilité des orpailleurs.

Malaria Hyperendemicity and Risk for Artemisinin Resistance among Illegal Gold Miners, French Guiana

Vincent Pommier de Santi, Félix Djossou, Nicolas Barthes, Hervé Bogreau, Georges Hyvert, Christophe Nguyen, Stéphane Pelleau, Eric Legrand, Lise Musset, Mathieu Nacher, Sébastien Briolant

To assess the prevalence of malaria among illegal gold miners in the French Guiana rainforest, we screened 205 miners during May–June 2014. Malaria prevalence was 48.3%; 48.5% of cases were asymptomatic. Patients reported self-medication with artemisinin-based combination therapy. Risk for emergence and spread of artemisinin resistance among gold miners in the rainforest is high.

Malaria control programs on the Guiana Shield, a region of South America, are challenged by migrant populations looking for gold. Since 2008, the "Harpie" operation to control and reduce illegal gold mining activities has been conducted by French Armed Forces in French Guiana. Military deployments at illegal gold mining sites have resulted in several outbreaks and increased incidence of malaria in French forces (*1–4*), which suggests high transmission levels in those areas. Illegal gold mining sites are isolated places in the rainforest, far from health posts. The miners are usually hidden in the forest to avoid police controls, and they live in unsanitary conditions.

Although formal health monitoring is not carried out in these communities, the effects of infectious diseases are of concern. In 2013, a group of 34 illegal gold miners with severe diarrheic and respiratory symptoms were evacuated by plane from a health post to the reference regional hospital in Cayenne. The outbreak was attributed to co-infection with several parasitic, bacterial, or viral agents: seasonal influenza A(H1N1)pdm09, *Shigella flexnieri*, *Necator americanus*, *Leishmania* spp., *Streptococcus pneumoniae*, and *Plasmodium vivax* (*5*). All patients came from the illegal gold mining site of Eau Claire (3°36′00″N, 53°34′60″W) (Figure 1). Given these problems, French health authorities decided to provide primary medical care in the field and also to assess the sanitary situation in Eau Claire. We describe the results of the cross-sectional study conducted to assess the epidemiologic situation of malaria.

The Study

Because of violence and insecure conditions at illegal mining sites, French military health services conducted the mission. Twelve soldiers and military policemen accompanied the medical team to ensure their protection but also that of the miners' community. A primary care clinic and laboratory were set up under tents at the Eau Claire gold mining camp from May 28, 2014, through June 6, 2014. Active malaria screening was offered to every person who sought care for any reason.

Diagnostic tests associating the malaria rapid diagnosis test (RDT) (SD Bioline Malaria Ag *Pf*/Pan; Standard Diagnostics, Inc., Giheung-gu, South Korea) and thin blood films were performed in the field. Patients who had positive results of an RDT, thin blood film, or both received treatment.

Data were collected by physicians concerning each person's recent medical history, protection measures against mosquito bites, use of medications, and recent travel inside or outside of French Guiana. Patient anonymity was stringently respected; every patient was issued a unique identification number. Only verbal consent could be obtained to avoid references that might reveal the identity of undocumented persons engaged in illegal activities.

Dried blood spots were obtained on filter paper by fingerstick and packaged in individual plastic bags with a desiccant until processing. *Plasmodium* DNA was extracted subsequently and tested with a nested PCR targeting *P. falciparum* and *P. vivax* 18S rRNA genes,

Author affiliations: Military Center for Epidemiology and Public Health, Marseille, France (V. Pommier de Santi); Direction Interarmées du Service de Santé en Guyane, Cayenne, French Guiana (V. Pommier de Santi, F. Djossou, N. Barthes, H. Bogreau, G. Hyvert, C. Nguyen, S. Briolant); Andrée Rosemon Hospital, Cayenne (F. Djossou, M. Nacher); Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, France (H. Bogreau, C. Nguyen, S. Briolant); Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne (H. Bogreau, C. Nguyen, S. Pelleau, E. Legrand, L. Musset, S. Briolant); World Health Organization Collaborative Center for Surveillance of Antimalarial Drug Resistance, National Resistance Center of Malaria, Cayenne (S. Pelleau, E. Legrand, L. Musset); Institut Pasteur, Genetic and Genomics of Insects Vectors, Paris (E. Legrand); Centre d'Investigation Clinique INSERM 1424 and EA3593 Université de Guyane, Cayenne (M. Nacher)

DOI: http://dx.doi.org/10.3201/eid2205.151957

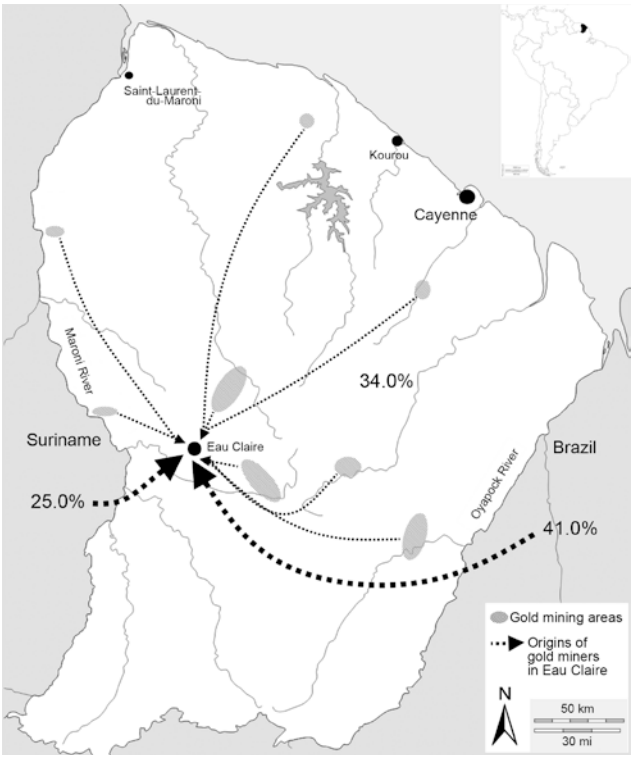


Figure 1. Origins of gold miners (N = 205) before they began to work in the illegal gold mining site of Eau Claire, French Guiana. Inset shows location of French Guiana in South America.

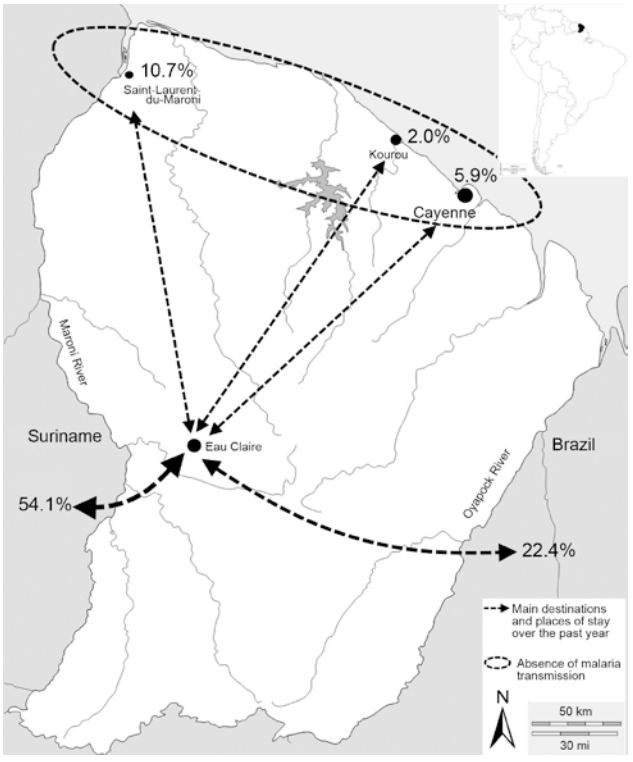


Figure 2. Travels of gold miners (N = 205) living in Eau Claire, French Guiana, 2013–2014. Inset shows location of French Guiana in South America.

according to the method of Snounou et al. (*6*). The propeller domain of *pfK13* gene was sequenced in *P. falciparum* isolates (*7*).

We defined *Plasmodium* infection as a positive RDT, thin blood film, or PCR result. Symptomatic *Plasmodium* infection was defined as a positive test result and fever (history of fever in preceding 24 hours and/or documented temperature ≥38°C during medical examination) and/or ≥2 of the following: nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain, anorexia, headache, or jaundice. Other *Plasmodium* infections were classified as asymptomatic.

Overall, 205 persons freely sought medical care and accepted malaria screening. The sex ratio was 2.0 (137 [66.8%] men; 68 [33.2%] women). Median age was 39 years (interquartile range [IQR] 32–46 years; range 20–63 years). The workers had been gold panning for a median time of 7 years (IQR 3–14 years; range 1 month–44 years) and on illegal gold mining sites in French Guiana for a median time of 4 years (IQR 1–8 years; range 1 month–25 years). Most (97.6%, 200) patients came from Brazil, 4 (2.0%) came from Suriname, and 1 (0.5%) came from Guyana. Before their arrival at Eau Claire, patients had lived in Brazil (41.0%, 84), Suriname (24.9%, 51), or at another illegal gold mining site (19/69 [33.7%] different sites throughout inland French Guiana and 1 unknown site) (Figure 1). During the previous year, 66.0% (135/205) persons had traveled to ≥1 area outside Eau Claire: 54.1% (111/205) to Suriname (among those, 60.0% had traveled there >2 times); 22.4% (46/205) to Brazil; and 18.5% (38/205) to the main cities in the malaria-free area along the French Guiana coast (Figure 2).

Table 1. Malaria and fever episodes reported by illegal gold miners, French Guiana, 2013–2014*

Episodes	No. (%) patients, N = 205
Malaria episode	
No	84 (41.0)
Yes	121 (59.0)
No. episodes	
1	27 (22.3)
2–4	48 (39.7)
>4	45 (37.2)
NA	1 (0.8)
Fever episode	
No	46 (22.4)
Yes	156 (76.1)
NA	3 (1.5)
No. episodes	
1	23 (14.8)
2–4	74 (47.4)
>4	57 (36.5)
NA	2 (1.3)

*NA, no answer.

Table 2. Number of positive parasite carriers by *Plasmodium* species according to diagnostic method, French Guiana, 2013–2014

Test	No. (%) single infections, n = 73		No. (%) mixed *P. falciparum*/*P. vivax* infections, n = 26	No. (%) total infections, n = 99	% Prevalence/ test, N = 205
	P. falciparum, n = 44	*P. vivax*, n = 29			
RDT*	23 (52.3)	8 (27.6)	8 (30.8)	40 (40.4)	19.5
Thin blood film	16 (36.4)	10 (34.5)	6 (23.1)	32 (32.3)	15.6
RDT and thin blood film	14 (31.8)	8 (27.6)	4 (15.4)	26 (26.3)	12.7
Cumulative RDT/thin blood film	25 (56.8)	10 (34.5)	10 (38.5)	46 (46.5)	22.4
PCR	42 (95.5)	28 (96.6)	26 (100.0)	96 (97.0)†	46.8†

*Malaria rapid diagnostic test: SD Bioline Ag *Pf*/pan (Standard Diagnostics, Inc., Giheung-gu, South Korea).
†In 3 cases (2 *P. falciparum* infections, 1 *P. vivax* infection) PCR results were negative, but results of thin blood films were positive.

Of the 205 patients, 156 (76.1%) reported ≥1 fever episode and 131 (63.9%) reported several (2–≥4) episodes; 121 (59.0%) reported ≥1 malaria episode and 93 (45.4%) several episodes (Table 1). Self-medication with antimalarial drugs was reported by 120 (58.5%) patients, of whom 118 (98.3%) had reported malaria episodes in the past year. Artemisinin-based combination therapies (ACTs) were mainly used: dihydroartemisinin/piperaquine/trimethoprim (Artecom; Chongqing Tonghe Pharmaceutical Co. Mingshan Town, China) by 79 (63.7%) and artemether-lumefantrine (Coartem; Novartis Pharmaceuticals Corp. Basel, Switzerland) by 32 (26.7%). Chloroquine was also used alone or with ACTs by 13 (10.8%) patients. The medication schedules used were not clearly identified, but 53 (44.2%) patients took drugs for 1 or 2 days only. Nets were used by 37 (18.0%) and mosquito repellents by 41 (20.5%) of the 205 patients.

The overall prevalence of malaria infection was 48.3% (99/205). *P. falciparum* and *P. vivax* single infections accounted for 44.4% (44/99) and 29.3% (29/99) cases, respectively, and mixed infection with *P. falciparum* and *P. vivax* for 26.3% (26/99) (Table 2). RDTs, thin blood films, and PCR were positive for 40.4% (40/99), 32.3% (32/99), and 97.0% (96/99) of patients classified as positive for malaria, respectively. Asymptomatic infections accounted for 48.5% (48/99) of cases. Low parasitemia levels were systematically observed. Only 1 person had a parsitemia level >1%, and no differences in level were found between symptomatic and asymptomatic infections. The propeller region of the *pfK13* gene was successfully sequenced in 26 *P. falciparum* isolates without any mutation detected.

Conclusions

During the 10 days of field work, almost all inhabitants of the gold mining site sought medical care. The high prevalence of malaria and asymptomatic *Plasmodium* infections observed confirms that malaria is hyperendemic there (*8*). Because of the mobility of gold miners within French Guiana, malaria also could be highly prevalent among persons at other illegal gold mining sites where competent vectors exist (*3*). This hypothesis is strengthened by the recurrent malaria outbreaks experienced by French forces involved in operations to control illegal gold mining, particularly in the center of the region (*3*).

Systematic self-medication by patients using ACTs without following a full course of treatment is a serious risk for emergence of resistance to artemisinin and associated drugs (*9*). The high price of ACTs in the field (2 g gold) was the primary reason patients gave for not completing treatments. The mobility of gold miners raises 2 issues: the reintroduction of the disease in malaria-free areas (*10*) and the spread of antimalarial drug resistance if the disease emerges (*11*). In 2013, parasite persistence on day 3 after treatment with Coartem was described in Suriname, and most participants in that study had worked in gold mines in French Guiana (*12*,*13*). In Guyana, *pfK13* C580Y mutants obtained from samples in 2010 were recently reported (*14*). These results may be viewed as ominous. Collaboration between countries of the Guiana Shield to control malaria among mobile populations is urgently needed (*15*).

Acknowledgments

We thank all military personnel from French Forces and French military health services who contributed to the study.

Dr. Pommier de Santi is a military physician and specialist in public health and epidemiology at the French Military Center for Epidemiology and Public Health, Marseille, France. In recent years, his work has focused on malaria and other tropical diseases affecting the French Armed Forces deployed in French Guiana.

References

1. Queyriaux B, Texier G, Ollivier L, Galoisy-Guibal L, Michel R, Meynard JB, et al. *Plasmodium vivax* malaria among military personnel, French Guiana, 1998–2008. Emerg Infect Dis. 2011;17:1280–2. http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.100009
2. Verret C, Cabianca B, Haus-Cheymol R, Lafille JJ, Loran-Haranqui G, Spiegel A. Malaria outbreak in troops returning from French Guiana. Emerg Infect Dis. 2006;12:1794–5. http://dx.doi.org/10.3201/eid1211.060530
3. Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, et al. Malaria in French Guiana linked to illegal gold mining. Emerg Infect Dis. 2016;22:344–6. http://dx.doi.org/10.3201/eid2202.151292
4. Michel R, Ollivier L, Meynard JB, Guette C, Migliani R, Boutin JP. Outbreak of malaria among policemen in French Guiana. Mil Med. 2007;172:977–81. http://dx.doi.org/10.7205/MILMED.172.9.977

5. Mosnier E, Carvalho L, Mahamat A, Chappert J-L, Ledrans M, Ville M, et al. Multiple outbreaks in gold washing camps in the Amazon forest (French Guiana): what are lessons learned to improve access to prevention and care? [in French]. Bull Epidemiol Hebd. 2015;11:181–9.
6. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993;61:315–20. http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(93)90077-B
7. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2013;505:50–5. http://dx.doi.org/10.1038/nature12876
8. Hay SI, Smith DL, Snow RW. Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission. Lancet Infect Dis. 2008;8:369–78. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70069-0
9. Nacher M, Guerin PJ, Demar-Pierre M, Djossou F, Nosten F, Carme B. Made in Europe: will artemisinin resistance emerge in French Guiana? Malar J. 2013;12:152. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-152
10. Cohen JM, Smith DL, Cotter C, Ward A, Yamey G, Sabot OJ, et al. Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. Malar J. 2012;11:122. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-122
11. MacPherson DW, Gushulak BD, Baine WB, Bala S, Gubbins PO, Holtom P, et al. Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. Emerg Infect Dis. 2009;15:1727–32.
12. Vreden SG, Jitan JK, Bansie RD, Adhin MR. Evidence of an increased incidence of day 3 parasitaemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemether. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:968–73. http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130167
13. Adhin MR, Labadie-Bracho M, Vreden S. Gold mining areas in Suriname: reservoirs of malaria resistance? Infect Drug Resist. 2014;7:111–6. http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S60906
14. Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, et al. Independent emergence of the *Plasmodium falciparum* Kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana. J Infect Dis. 2015 Dec 21; pii: jiv752.
15. Carrara VI, Lwin KM, Phyo AP, Ashley E, Wiladphaingern J, Sriprawat K, et al. Malaria burden and artemisinin resistance in the mobile and migrant population on the Thai–Myanmar border, 1999–2011: an observational study. PLoS Med. 2013;10:e1001398. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001398

Address for correspondence: Sébastien Briolant, Laboratoire de Parasitologie, Institut Pasteur de la Guyane, 23 Avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne CEDEX, French Guiana; email: sbriolant@wanadoo.fr

April 2015: Emerging Viruses

Including:

- Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas
- Hantavirus Pulmonary Syndrome, Southern Chile, 1995–2012
- Animal-Associated Exposure to Rabies Virus among Travelers, 1997–2012
- Evolution of Ebola Virus Disease from Exotic Infection to Global Health Priority, Liberia, Mid-2014
- Population Structure and Antimicrobial Resistance of Invasive Serotype IV Group B *Streptococcus*, Toronto, Ontario, Canada
- Norovirus Genotype Profiles Associated with Foodborne Transmission, 1999–2012
- Deaths Associated with Respiratory Syncytial and Influenza Viruses among Persons >5 Years of Age in HIV-Prevalent Area, South Africa
- Sequence Variability and Geographic Distribution of Lassa Virus, Sierra Leone
- Influenza A(H7N9) Virus Transmission between Finches and Poultry
- Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection among Workers at Live Bird Markets, Bangladesh, 2009–2010
- Increased Risk for Group B Streptococcus Sepsis in Young Infants Exposed to HIV, Soweto, South Africa, 2004–2008

http://wwwnc.cdc.gov/eid/articles/issue/21/4/table-of-contents

EMERGING INFECTIOUS DISEASES™

2. LES DETERMINANTS DE L'INFECTION PALUSTRE CHEZ LES MILITAIRES FRANÇAIS EN GUYANE

- **Travail original 5 :** Incidence et déterminants de l'infection palustre chez les militaires français en Guyane par l'utilisation de la réponse anticorps antigènes – Etude de cohorte prospective CopaFAG *(Article en cours de finalisation pour publication)*.

Résumé

L'augmentation de l'incidence du paludisme chez les militaires déployés en Guyane interroge sur la réalité de leur exposition aux infections palustres et l'efficacité des mesures de prévention préconisées. Une étude de cohorte prospective a été menée de 2013 à 2015 pour évaluer le niveau d'infection par *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. malariae* des militaires lors des missions en forêt amazonienne par la mesure des réactions immunitaires humorales aux antigènes plasmodiaux, et identifier les déterminants de ces infections.

Au total 1629 militaires impliqués dans les opérations de lutte contre l'orpaillage illégal en Guyane ont été suivis pendant une période moyenne de 4 mois. Un sérum a été prélevé au début (T0) et à la fin (T4) de leur mission. Des données ont été recueillies sur l'observance des mesures de prévention et leurs parcours pendant le suivi. La preuve sérologique d'une infection palustre « Serological Evidence of Infection » SEI) était définie par une réponse immunitaire en IgG positive entre T0 et T4 pour au moins un antigène plasmodial. Elle a été définie pour chacune des plasmodies, SEI*Pf* (pour *P. falciparum*), SEI*Pv* (pour *P. vivax*), SEI*Pm* (pour *P. malariae*) et pour l'infection palustre globale SEI*Pspp* si au moins une SEI était observée pour un parasite.

Le taux d'incidence (TI) des SEI*Pf* a été estimé à 49,6 pour 100 personnes-années (p.100 PA) (intervalle de confiance à 95% [IC95%] : 36,7-65,3), le TI des SEI*Pv* à 39,1 p.100 PA (IC95% : 27,7-53,3) et le TI des SEI*Pm* à 4,2 p.100 PA (IC95% : 1,1-10,2). Le TI des SEI*Pspp* sur la période était de 74,0 p.100 PA (IC95% : 58,1-92,9) et augmentait significativement de 2013 à 2015 (Chi2 de tendance = 9,05, p=0,003). Le taux d'incidence des accès palustres à *P. falciparum* était de 0,6 p.100 PA (IC95% : 0,0-4,7), soit 55 fois moins que le TI des SEI*Pf*. Le taux d'incidence des accès palustres à *P. vivax* était de 6,1 p.100 PA (IC95% : 1,1-10,2) soit 6,4 fois moins que le TI des SEI*Pv*. Seule une observance correcte de

la chimioprophylaxie par doxycycline, sans aucun oubli de la prise quotidienne, était un facteur protecteur des SEI (ORa=0,73 ; IC95% : 0,54-0,97, p=0,03).

Discussion - conclusions

Notre étude confirme l'exposition majoritaire à *P. falciparum* des militaires et par-delà la circulation prédominante de *P. falciparum* en forêt et sur les sites d'orpaillage illégaux. Par ailleurs, les SEI*Pm* confirment la circulation de *P. malariae* en Guyane, même si les diagnostics parasitologiques de ces infections restent peu nombreux en population. Les faibles taux d'incidence des cas de paludisme dans notre cohorte comparés aux taux d'incidence très élevés observés des SEI sont en faveur de l'efficacité de la chimioprophylaxie antipalustre par doxycycline. Comme attendu, cette efficacité est limitée pour *P. vivax* par rapport à *P. falciparum*, probablement du fait des hypnozoïtes intra-hépatiques responsables de reviviscences à distance de la prise de la chimioprophylaxie.

Introduction

Le paludisme est endémique dans 21 pays de la région des Amériques (1). Le Brésil, à lui seul, compte pour plus de 40% des cas de paludisme notifiés chaque année dans la région d'Amérique Latine et Caraïbes, 99% des cas provenant du bassin amazonien (2, 3). Le flux des populations migrantes dans cette région est un obstacle à l'efficacité des programmes de contrôle et élimination du paludisme (2, 4). Les migrants orpailleurs sur le plateau de Guyane constituent un exemple typique, se déplaçant de site en site sans se soucier des frontières (5-7). Ils constituent à la fois un réservoir mobile de parasite et génèrent par la déforestation, propice aux vecteurs, des foyers de transmission au cœur de la forêt (5, 8-11). En outre, leur utilisation anarchique des traitements combinés à base d'artémisinine fait craindre l'émergence de plasmodies résistantes aux antipaludiques les plus récents (5, 12, 13). En Guyane, le paludisme est considéré comme endémique, même si la situation épidémiologique est hétérogène sur le territoire. Le littoral est considéré comme indemne de paludisme mais quelques foyers de transmission peuvent survenir (14, 15). Depuis 2009, la mise en œuvre de programmes de lutte contre le paludisme au profit de la population guyanaise sur les fleuves a permis d'observer une diminution du nombre de cas de paludisme déclarés : de 3344 cas en 2009 à 437 en 2015 (16). Trois espèces de parasites sont présents, *Plasmodium vivax*, majoritaire à plus de 70%, *Plasmodium falciparum* pour 30% des cas et de manière plus anecdotique *Plasmodium malariae* (15, 16). La situation est contrastée en forêt guyanaise où seuls vivent des orpailleurs en situation irrégulière. Le paludisme y est hyperendémique, avec une prévalence proche de 50% selon les sites. Les infections à *P. falciparum* y sont plus fréquentes qu'à *P. vivax* (7, 9). Plusieurs espèces d'anophèles ont été capturées sur ces sites (*An. marajoara*, *An. ininii*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. darlingi*), leur taux d'infection par des plasmodies allant de 0,3% à 12,5% (5, 8). Les militaires français sont engagés depuis 2002 dans des opérations de lutte contre l'orpaillage illégal en Guyane, en forêt comme sur les fleuves. Malgré un programme de prévention du paludisme dimensionné et organisé par le Service de santé des armées, ces opérations se sont accompagnées d'une augmentation très importante de l'incidence du paludisme, à 80% due à *P. vivax* et 20% *P. falciparum* (17, 18). Plusieurs épidémies sont survenues, toutes faisant suite à des missions sur des sites d'orpaillage illégaux, avec des taux d'attaque allant de 25 à 50%, expliquées par un manque d'adhésion aux mesures de prévention contre les piqûres de moustiques et une mauvaise observance à la chimioprophylaxie (8, 19, 20). Face à cette situation, deux questions sont posées. Quelle est la réalité de l'exposition au paludisme des militaires français en Guyane ?

Le programme de prévention mis en place est-il réellement efficace ? Afin d'y répondre, une étude de cohorte prospective a été menée de 2013 à 2015. Plutôt que de se baser sur les seuls accès palustres, cette étude s'est appuyée sur les outils sérologiques afin de mesurer l'exposition réelle des militaires (21).

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le niveau d'infection par *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. malariae* chez les militaires lors des missions en forêt amazonienne par la mesure du taux de porteurs d'anticorps, et d'identifier les déterminants de ces infections.

Matériels et méthode.

Type d'étude

Il s'agissait d'une étude de cohorte prospective ouverte pendant toute la durée d'inclusion de janvier 2013 à janvier 2015. La durée d'inclusion dans la cohorte de chaque individu était de quatre mois en moyenne, soit la durée d'une mission de courte durée en Guyane pour des personnels venant de métropole. Des personnels affectés en séjour de longue durée (deux à quatre ans) en Guyane ont aussi été inclus et suivis pendant une période équivalente. L'étude était multicentrique. Les inclusions étaient réalisées sur deux Centres médicaux de consultation interarmées (CMIA) en Guyane : les CMIA de Cayenne et de Kourou. L'analyse des sérums a été réalisée à l'Institut Pasteur de Madagascar.

L'étude se déroulait en trois temps (Figure 1).

- Deux temps de suivi individuel de quatre mois pour chaque sujet inclus avec :
  - un recueil initial lors de l'inclusion des sujets ; ce temps, identifié comme T0, comprenait un auto questionnaire court de début de mission et un prélèvement sanguin avec extraction du sérum ;
  - un recueil à quatre mois, premier « End point » qui marquait la sortie effective de la cohorte, qui correspondait au moment du retour en métropole des sujets en mission de courte durée (ce délai étant gardé équivalent pour les sujets en séjour de longue durée) ; ce temps, identifié comme T4, comprenait un auto questionnaire de fin de mission et un prélèvement sanguin avec extraction du sérum.
- Un temps de suivi collectif passif par le biais de la surveillance épidémiologique dans les armées pendant le temps d'inclusion et 6 mois après la sortie de cohorte pour identifier les cas de paludisme. Un cas de paludisme déclaré chez un sujet de la cohorte constituait un second « End point ». Ce suivi sur 6 mois ne concernait que les unités en mission de courte durée et rentrées en métropole. De fait, les personnels permanents

restant en Guyane étaient toujours susceptibles d'être exposés au paludisme après le second prélèvement sanguin.

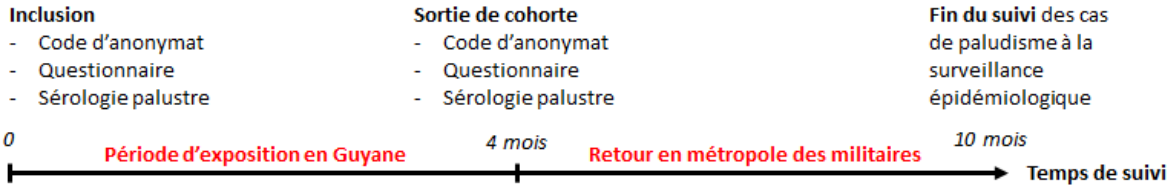


Figure 1 : Différents temps du suivi de la cohorte.

Population de l'étude

La population éligible étaient tous les sujets déployés en unités constituées (section (effectifs de 30 personnels) ou compagnie (effectifs de 100 à 150 personnels)) en Guyane et dont la mission principale était la lutte contre l'orpaillage illégal.

Les critères d'inclusion d'un sujet dans l'étude étaient les suivants :

- être un militaire ou un gendarme, homme ou femme, en mission ou en séjour de longue durée en Guyane ;
- appartenir à une unité élémentaire constituée, compagnie ou section ;
- être âgé(e) de 18 ans ou plus ;
- être apte médicalement aux missions opérationnelles en forêt profonde ;
- être volontaire pour participer à l'étude.

Au total, 1629 sujets appartenant à 26 unités constituées (dénommées groupes) ont été inclus dans la cohorte.

Tous les sujets bénéficiaient du programme de prévention du paludisme mis en œuvre par le Service de santé des armées : équipement en moustiquaire de lit, de hamac avec moustiquaire, de treillis imprégnés de manière industrielle d'insecticide (perméthrine), de répulsifs cutanés (lotion à base d'icaridine), de spray insecticide pour l'imprégnation ou la ré-imprégnation de leurs vêtements et/ou moustiquaires, d'une chimioprophylaxie antipalustre par doxycycline et enfin de séances d'éducation pour la santé ciblées sur le paludisme et sa prévention. Les mesures de protection individuelles contre les piqûres de moustiques sont classiquement appliquées en tenant compte du cycle d'agressivité des anophèles, du crépuscule jusqu'à l'aube. La chimioprophylaxie antipalustre était prescrite selon une prise unique quotidienne de 100 mg de monohydrate de doxycycline, tous les jours pendant la période d'exposition au paludisme et jusqu'à quatre semaines après la dernière exposition.

Auto-questionnaires

Les questionnaires étaient anonymes, identifiés par un code unique pour chaque sujet inclus. Une liste de correspondances noms/numéros était détenue par un médecin investigateur. Les questionnaires étaient auto-administrés mais remplis avec des explications fournies pas à pas par un médecin investigateur. La liste des correspondances nom/numéro permettait pour chaque sujet inclus de lier les couples de questionnaires, les couples de sérum et les cas de paludisme déclarés à la surveillance épidémiologique (Figure 1). Les parcours des personnels pendant la période de suivi étaient recueillis au niveau des commandants des unités constituées (compagnies, pelotons et sections).

Le questionnaire à l'inclusion comprenait des données sociodémographiques, sur les séjours antérieurs en zone impaludée et sur les antécédents personnels d'accès palustres. Le questionnaire en sortie de cohorte comprenait des données sur l'observance de la chimioprophylaxie et des mesures de lutte antivectorielle individuelles, sur la perception du risque de paludisme et sur les événements de santé survenus pendant la période de suivi. L'observance était mesurée par une échelle de type Likert, de 0 aucune prise à 10 aucun oubli de la prise quotidienne pendant le temps du suivi. Compte tenu de la faible demi-vie de la doxycycline (18 à 24 heures), une observance correcte (OC) était définie par une prise quotidienne sans aucun oubli (échelle =10). Une observance insuffisante (OI) était définie par un oubli ou plus de la prise quotidienne (échelle <10).

Antigènes testés

Les sérums à T0 et T4 ont été analysés par technique de sérologie haut débit avec multiplexage avec un appareil de type MAGPIX® (Magnetic Bead-based Assay), selon la méthode décrite précédemment dans d'autres études (22, 23). Pour *P. falciparum,* 5 peptides d'antigènes pré-érythrocytaires, *Pf*CSP (Circumsporozoite Protein), *Pf*LSA1-41 (Liver Stage Antigen), *Pf*LSA3, *Pf*GLURP (Glutamate Rich Protein), *Pf*SALSA (Sporozoite and Liver Stage Antigen) (22) et trois protéines recombinantes *Pf*MSP1 (Merozoite Surface Protein), *Pf*PF13 et *Pf*VAR2CSA (Variant Surface Antigen 2 Chondroitine Sulfate A) ont été utilisés (24-27).

Pour *P. vivax*, deux peptides pré-érythrocytaires de CSP, *Pv*CSP_VK210 et *Pv*CSP-VK247 (28-31), ainsi que deux protéines recombinantes *Pv*MSP1 (32-36) et *Pv*DBP (Duffy Binding Protein) (37, 38) ont été utilisés.

Pour *P. malariae*, un seul antigène pré-érythrocytaire pouvait être testé, le peptide *Pm*CSP (39) (Figure 2 ; Tableau 1).

Les sérums T0 et T4 ont été testés en duplicate pour tous les antigènes retenus. La réponse immunitaire (anticorps en IgG uniquement) était exprimée en intensité de fluorescence médiane (MFI) par échantillon. Les valeurs en MFI obtenues en duplicate ont été utilisées pour calculer une valeur en MFI moyenne par échantillon. Les seuils de positivités en MFI par antigène ont été calculés en prenant la moyenne en MFI + 3 écarts types (ET) à partir d'échantillons de sérum de sujets jamais exposés au paludisme (échantillons obtenus de l'établissement français de transfusion sanguine) (Tableau 1). La validité des seuils de positivités a été vérifiée à partir d'un jeu d'échantillons contrôles positifs et négatifs à l'Institut Pasteur de Madagascar.

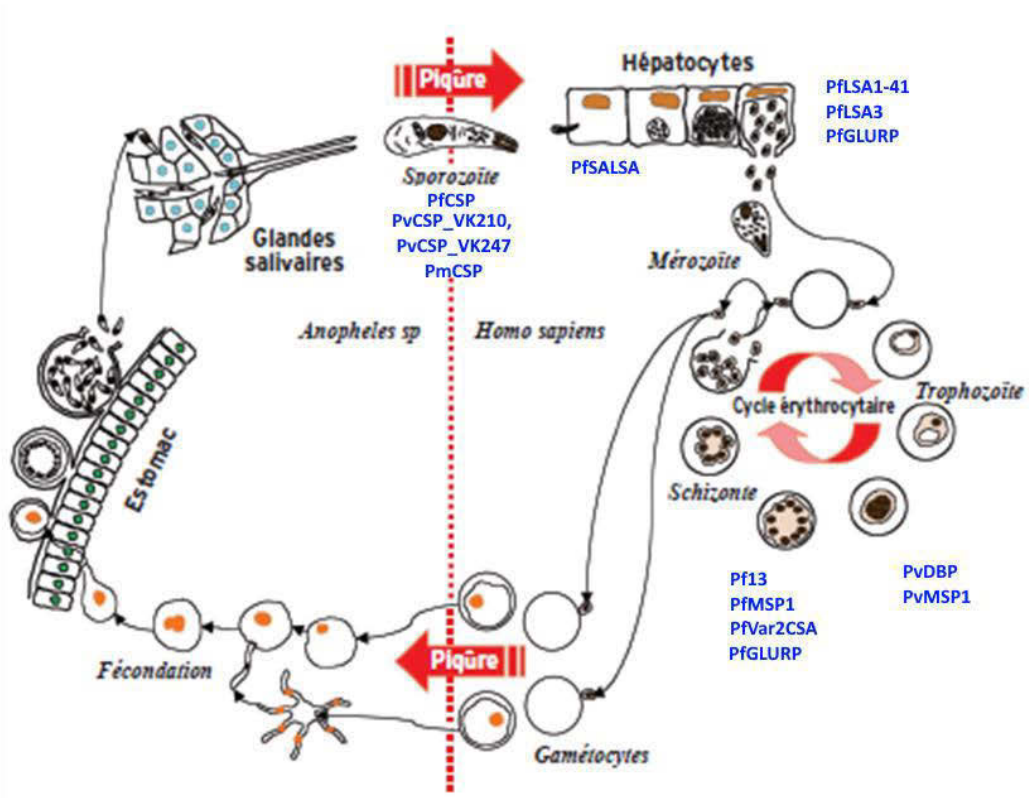


Figure 2 : Types d'antigènes testés selon le *Plasmodium* et leur stade d'expression dans le cycle des plasmodies.

Une sérologie était définie comme positive dès lors que les MFI dépassaient ces seuils pour au moins un antigène.

Tableau 1 : Types d'antigènes testés selon le *Plasmodium*, leur nature (protéine ou peptide), leur stade d'expression dans le cycle des plasmodies et le seuil de positivité en immunofluorimétrie en flux, par MAGPIX®.

Plasmodium	**Antigènes**	**Protéine ou peptide**	**Stade de l'expression**	**Seuils de positivité (MFI)**
P. falciparum	*Pf*CSP	Peptide	Pré-érythrocytaire	363,89
	*Pf*SALSA	Peptide	Pré-érythrocytaire	348,70
	*Pf*LSA1$_{41}$	Peptide	Pré-érythrocytaire	357,73
	*Pf*LSA3	Peptide	Pré-érythrocytaire	354,77
	*Pf*GLURP	Peptide	Pré-érythrocytaire et stade sanguin	363,04
	*Pf*PF13	Protéine	Stade sanguin	369,07
	*Pf*MSP1	Protéine	Stade sanguin	370,37
	*Pf*VAR2CSA	Protéine	Stade sanguin	371,93
P. vivax	*Pv*CSP_VK210	Peptide	Pré-érythrocytaire	357,01
	*Pv*CSP_VK247	Peptide	Pré-érythrocytaire	360,60
	*Pv*DBP	Protéine	Stade sanguin	355,95
	*Pv*MSP1	Protéine	Stade sanguin	354,55
P. malariae	*Pm*CSP	Peptide	Pré-érythrocytaire	297,48

Séroprévalence palustre à l'inclusion

La séroprévalence palustre à T0 a été mesurée pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae* séparément. La séroprévalence palustre initiale (Seropre) a été définie comme une séropositivité pour au moins un *Plasmodium*.

Définition d'une réponse anticorps significative

La population militaire étant régulièrement déployée en zone d'endémie palustre dans le cadre de ses missions, la prise en compte de sérums positifs en T0 pour un ou plusieurs antigènes était nécessaire. Afin de tenir compte d'une cinétique significative entre deux sérums positifs en T0 et T4 en faveur d'une nouvelle infection palustre, de nouveaux seuils ont été calculés à partir d'une population témoin de notre cohorte. Au total 32 militaires inclus dans la cohorte ont été pris comme population contrôle. Ces militaires n'avaient jamais été exposés au paludisme et étaient restés sur la ville de Cayenne pendant tout leur séjour en Guyane. Pour chacun, nous avons calculé le ratio de MFI des sérums T4/T0. La valeur de ces ratios a été normalisée par une transformation de Box-Cox en utilisant le logiciel XLSTAT® afin de limiter les effets de la variabilité individuelle, classique en immunologie. Les moyennes et écarts types de ces ratios transformés ont été calculés pour cette population contrôle et un nouveau seuil calculé, égal à la moyenne + 3 ET. La limite inférieure (définie comme ratio seuil) d'une augmentation significative du ratio des MFI T4/T0 a été obtenue en prenant

l'inverse de ce seuil transformé. Les ratios seuils pour chaque antigène sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Ratios seuils définissant une augmentation significative de la réponse anticorps en MFI, calculés par une transformation Box Cox à partir d'une population contrôle de 32 sujets.

Variable	Observations	Moyenne	Ecart-type	Lambda	Seuil transformé	Ratios seuils
*Pf*PF13	32	-0,10	0,21	-0,61	0,53	1,89
*Pf*VAR2CSA	32	-0,13	0,22	-1,02	0,53	2,13
*Pf*MSP1	32	-0,10	0,22	-0,07	0,57	1,79
*Pf*CSP	32	-0,12	0,27	-0,13	0,69	2,06
*Pf*GLURP	32	-0,02	0,22	1,44	0,65	1,58
*Pf*SALSA	32	-0,06	0,18	-0,60	0,47	1,74
*Pf*LSA1_41	32	-0,08	0,26	0,33	0,70	1,88
*Pf*LSA3	32	-0,11	0,21	-0,25	0,51	1,73
*Pv*DBP	32	-0,08	0,23	-0,31	0,62	1,98
*Pv*MSP1	32	-0,08	0,17	0,33	0,44	1,50
*Pv*CSP_VK210	32	-0,12	0,19	0,23	0,44	1,52
*Pv*CSP_VK247	32	-0,13	0,17	-0,37	0,37	1,49
*Pm*CSP	32	-0,11	0,22	0,17	0,54	1,68

Critère de jugement principal : Serological Evidence of Infection (SEI)

Le critère de jugement principal était la preuve sérologique d'une infection palustre (SEI). Elle a été définie pour chacune des plasmodies, SEI*Pf* (pour *P. falciparum*), SEI*Pv* (pour *P. vivax*), SEI*Pm* (pour *P. malariae*) et pour l'infection palustre globale SEI*Pspp* si au moins une SEI était observée pour un parasite.

La SEI était positive dès lors qu'une réponse immunitaire pour au moins un antigène devenait positive entre T0 et T4 (i.e. en dessous du seuil de positivité en T0 et au-dessus du seuil en T4 – Tableau 1), ou si au moins un antigène était positif en T0 et en T4 mais avec un ratio MFI T4/T0 supérieur au ratio seuil défini comme une augmentation significative de la réponse immunitaire entre les deux temps de l'étude (Tableau 2).

Accès palustres

Un accès palustre déclaré à la surveillance épidémiologique dans les armées était défini comme « toute manifestation pathologique avec présence de *Plasmodium* sur frottis sanguin ou goutte épaisse ou QBC® positif ou test de diagnostic rapide positif ».

Analyses statistiques

Les données ont été saisies avec le logiciel de capture d'informations par reconnaissance optique Teleform® (Cardiff Software version 10.4). Les personnes-années ont été calculées en tenant compte de la période d'inclusion (temps entre T0 et T4) dans la cohorte de chaque individu, le temps en jour a été converti en temps en année. Les logiciels SAS University® et R ont été utilisées pour les analyses descriptives, les analyses univariée et multivariée. Des analyses univariée et multivariée par modèle de régression logistique mixte avec effet aléatoire (effet groupe) ont été réalisées pour expliquer la variable Seropre et SEI*Pspp* comme décrit dans de précédentes études (40, 41). Un degré de significativité $p \leq 0,2$ a été retenu comme seuil d'entrée des variables dans les modèles. La variable observance de la doxycycline a été testée séparément en analyse bivariée en tenant compte des SEI pour les antigènes pré-érythrocytaires et des antigènes du stade sanguin de *P. vivax* et *P. falciparum*.

Ethique

Tous les participants étaient volontaires et avaient signé un consentement libre et éclairé. Les sujets inclus étaient tous des militaires professionnels et bénéficiaient donc d'une couverture de la Caisse Nationale Militaire de Sécurité Sociale. Le fichier informatique utilisé pour les analyses était anonyme et a été déclaré à la Commission nationale d'informatique et liberté sous le numéro 1578705 v 0. Cette recherche biomédicale a reçu l'autorisation de l'ANSM et l'avis favorable du Comité de protection des personnes Sud Méditerranée 1 (Enregistrement ID-RCB 2012-A00441-42, référence de l'autorisation B120679-40).

Résultats

Population de l'étude

Au total, 1629 militaires ont été inclus dans la cohorte. Le nombre de perdus de vue était de 7,5% (122/1629). Onze échantillons ont été perdus, et 32 militaires ont été pris comme témoins non exposés au paludisme pour définir les valeurs seuils des ratios en MFI entre deux prélèvements. La population retenue pour l'analyse était de 1458 sujets dont 720 en 2013, 479 en 2014 et 259 en 2015, répartis en 26 groupes correspondant aux unités militaires constituées (compagnies ou sections) (Figure 3, Tableau 2).

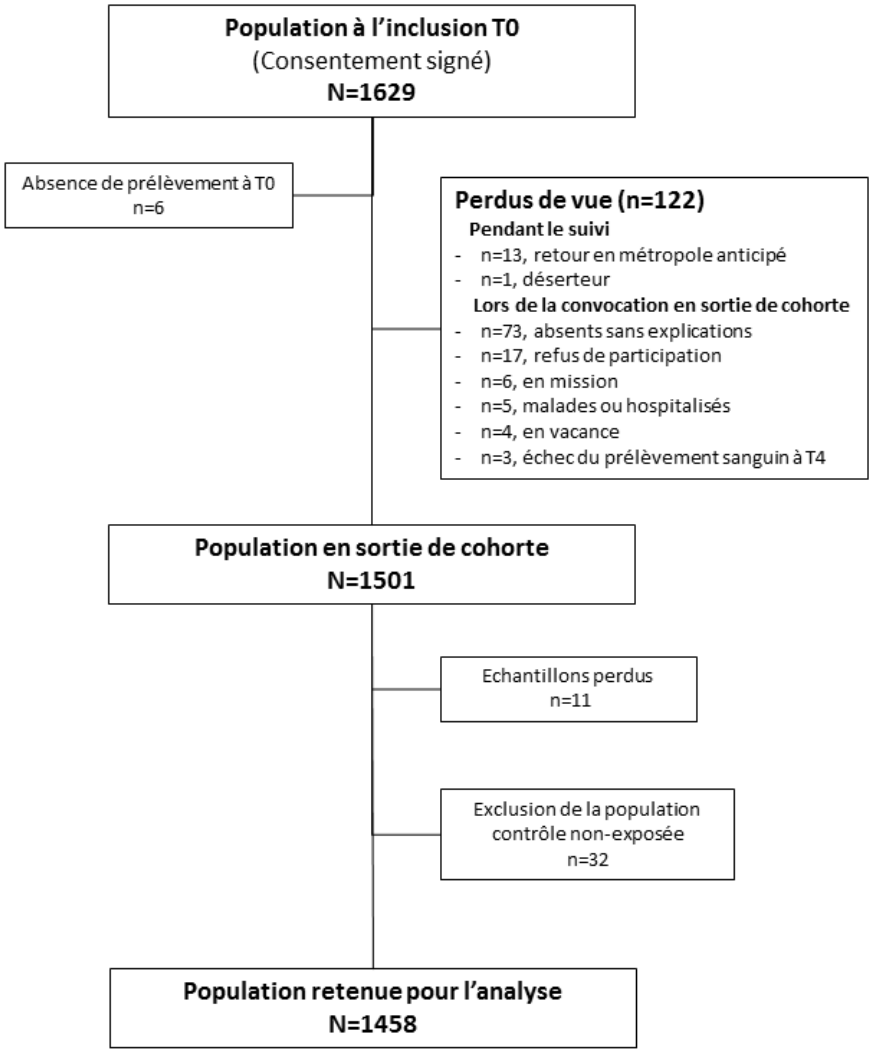


Figure 3 : Flow chart des inclusions dans la cohorte.

La population était composée majoritairement d'hommes (98,8%, 1441/1458). L'âge médian était de 26,6 ans (Intervalle interquartile (IIQ) [23,5-31,2] minimum 18 ans et 7 mois, maximum 55 ans). Les sujets en mission de courte durée en Guyane représentaient 81,1% (1183/1458) des effectifs, ceux en séjour de longue durée 18,9% (275/1458). Le temps moyen de suivi au sein de la cohorte était de 115 jours (intervalle de confiance à 95% (IC95%) [113,7-115,7] min : 46 jours, max : 181 jours).

Séroprévalence palustre à l'inclusion

La séroprévalence palustre à l'inclusion (Seropre) a été mesurée pour chaque *Plasmodium*. La Seropre pour *P. falciparum* était de 65,8% (960/1458), pour *P. vivax* de 32,3% (471/1458) et pour *P. malariae* de 6,5% (95/1458). La Seropre globale était de 72,7% (1060/1458).

Les variables explicatives de la Seropre globale étaient d'être en séjour de longue durée (2-4 ans) en Guyane (ORa=3,97, IC95% [1,83-8,61]), d'avoir déjà eu un accès palustre (ORa=4,20, IC95% [1,77-9,96]) et d'avoir été en mission ou en voyage au cours des deux années précédant l'inclusion en zone impaludée en Asie ou Océanie (ORa=1,66, IC95% [1,10-2,52]) (Tableau 3). Compte tenu des missions récentes effectuées par les Armées françaises, les séjours en Asie correspondaient à des missions en Afghanistan. L'association avec la variable accès palustre était un argument fort de validation des seuils de séropositivités définis (Tableau 1).

Preuve sérologique d'une infection palustre (SEI) au cours de la mission

Sur la période 2013-2015, la proportion des SEI*Pf* a été estimée à 15,6% (IC95% : 13,7-17,5 – n=227/1458), des SEI*Pv* à 12,3% (IC95% : 10,6-14,1 – n=179/1458) et des SEI*Pm* à 1,3% (IC95% : 0,8-2,0 – n=19/1458). La proportion des SEI*Pspp* sur la période était de 23,3% (IC95% : 21,1-25,5 – n=339/1458) (Tableau 4) et augmentait significativement de 2013 à 2015 (Chi2 de tendance= 9,05, p=0,003). Cette augmentation des SEI sur la période était observée pour toutes les plasmodies.

Tableau 3 : Analyses univariée et multivariée de la séroprévalence palustre (toutes plasmodies confondues) à l'inclusion dans la cohorte (N=1458).

				Univariée			Multivariée		
	N	**Seropre[a]**	**%**	**OR**	**IC95%**	**p**	**ORa**	**IC95%**	**p**
Sexe									
Homme	1441	1045	72,5	1					
Femme	17	15	88,2	3,12	0,69-14,18	0,14			
Age									
< 25 ans	655	457	69,8	1					
≥ 25 ans	803	603	75,1	1,15	0,88-1,49	0,3			
Ancienneté dans l'armée									
≤ 5 ans	728	499	68,5	1					
> 5 ans	730	561	76,8	1,36	1,05-1,76	0,02			
Grade									
Non gradé	975	723	74,2						
Officier/Sous-officier	483	337	69,8	0,96	0,71-1,31	0,8			
Armée d'appartenance									
Gendarmerie	217	134	61,8	1					
Terre	1241	926	74,6	2,11	1,05-4,25	0,04			
Type de séjour en Guyane									
Courte durée (3-4 mois)	1183	805	68,0	1					
Longue durée (2-4 ans)	275	255	92,7	6,87	3,38-13,97	1.10^{-7}	3,97	1,83-8,61	5.10^{-4}
Mission dans les 2 ans									
En Afrique									
Non	1017	729	71,7	1					
Oui	441	331	75,1	0,97	0,71-1,31	0,8			
En Amérique du Sud									
Non	1278	930	72,8	1					
Oui	180	130	72,2	1,12	0,77-1,62	0,6			
En Asie/Océanie									
Non	1056	712	67,4	1					
Oui	402	348	86,6	2,37	2,08-11,56	2.10^{-5}	1,66	1,10-2,52	0,017
Antécédent de paludisme									
Non	1347	955	70,9	1					
Oui	111	105	94,6	4,91	2,08-11,56	3.10^{-4}	4,20	1,77-9,96	0,001
Gravité perçue du paludisme									
Pas du tout à peu grave	304	229	75,3	1					
Moyennement à très grave	1120	812	72,5	0,87	0,64-1,18	0,4			
Effet groupe (intercept)									1.10^{-5}

[a] Séropositivité à *Plasmodium spp* (*P. falciparum* et/ou *P. vivax* et/ou *P. malariae*) à l'inclusion dans la cohorte ;
OR : Odd ratio; ORa : Odd ratio ajusté.

Tableau 4 : SEI par groupe et par plasmodies de 2013 à 2015 chez les militaires français déployés en Guyane (N=1458).

Années	Groupes	Effectifs	n SEI*Pf*	% [IC95%]	n SEI*Pv*	% [IC95%]	n SEI*Pm*	% [IC95%]	n SEI*Pspp*	% [IC95%]
2013	1	47	7	14,9 [6,2-28,3]	10	21,3 [10,7-35,7]	1	2,1 [0,1-11,3]	14	29,8 [17,3-44,9]
	2	29	2	6,9 [0,8-22,8]	1	3,4 [0,1-17,8]	0	-	3	10,3 [2,2-27,4]
	3	103	11	10,7 [5,5-18,3]	10	9,7 [4,8-17,1]	0	-	16	15,5 [9,1-24,0]
	4	57	8	14,0 [6,3-25,8]	7	12,3 [5,1-23,7]	0	-	12	21,1 [11,4-33,9]
	5	8	1	12,5 [0,3-52,7]	0	-	0	-	1	12,5 [0,3-52,7]
	6	26	0	-	0	-	0	-	0	-
	7	108	16	14,8 [8,7-22,9]	12	11,1 [5,9-18,6]	1	0,9 [0,5-5,1]	24	22,2 [14,8-31,2]
	8	31	3	9,7 [2,0-25,8]	4	12,9 [3,6-29,8]	0	-	6	19,4 [7,5-37,5]
	9	10	2	20,0 [2,5-55,6]	3	30 [6,7-65,2]	0	-	3	30,0 [6,7-65,2]
	10	38	4	10,5 [2,9-24,8]	5	13,2 [4,4-28,1]	0	-	6	15,8 [6,0-31,3]
	11	29	2	6,9 [0,8-22,8]	1	3,4 [0,1-17,8]	0	-	3	10,3 [2,2-27,4]
	12	122	27	22,1 [15,1-30,5]	17	13,9 [8,3-21,4]	3	2,5 [0,0-7,0]	31	25,4 [18,0-34,1]
	13	112	19	17,0 [10,5-25,2]	13	11,6 [6,3-19,0]	0	-	27	24,1 [16,5-33,1]
2014	14	108	9	8,3 [3,9-15,2]	12	11,1 [5,9-18,6]	2	1,9 [0,2-6,5]	21	19,4 [12,5-28,2]
	15	99	13	13,1 [7,2-21,4]	11	11,1 [5,7-19,0]	1	1,0 [0,0-5,5]	22	22,2 [14,5-31,7]
	16	31	3	9,7 [2,0-25,8]	0	-	0	-	3	9,7 [2,0-25,8]
	17	13	2	15,4 [1,9-45,4]	0	-	0	-	2	15,4 [1,9-45,4]
	18	28	3	10,7 [2,3-28,2]	3	10,7 [2,3-28,2]	0	-	5	17,9 [6,1-36,9]
	19	111	24	21,6 [14,4-30,4]	15	13,5 [7,8-21,3]	2	1,8 [0,2-6,4]	37	33,3 [24,7-42,9]
	20	83	15	18,1 [10,5-28,0]	14	16,9 [9,5-26,7]	2	2,4 [0,3-8,4]	25	30,1 [20,5-41,2]
	21	6	1	16,7 [0,4-64,1]	1	16,7 [0,4-64,1]	0	-	2	33,3 [4,3-77,7]
2015	22	61	7	11,5 [4,7-22,2]	4	6,6 [1,8-15,9]	1	1,6 [0,0-8,8]	11	18,0 [9,4-30,0]
	23	9	3	33,3 [7,5-70,1]	2	22,2 [2,8-60,0]	1	11,1 [0,3-48,2]	4	44,4 [13,7-78,8]
	24	89	23	25,8 [17,1-36,2]	17	19,1 [11,5-28,8]	5	5,6 [1,8-12,6]	30	33,7 [24,0-44,5]
	25	25	9	36,0 [18-57,5]	7	28,0 [12,1-49,4]	0	-	12	48,0 [27,8-68,7]
	26	75	13	17,3 [9,6-27,8]	10	13,3 [6,6-23,2]	0	-	19	25,3 [16,0-36,7]
Total 2013		720	102	14,2 [11,7-16,9]	83	11,5 [9,3-14,1]	5	0,7 [0,2-1,6]	**146**	**20,3 [17,4-23,4]**
Total 2014		479	70	14,6 [11,6-18,1]	56	11,7 [9,0-14,9]	7	1,5 [0,6-3,0]	**117**	**24,4 [20,6-28,5]**
Total 2015		259	55	21,2 [16,4-26,7]	40	15,4 [11,3-20,4]	7	2,7 [1,1-5,5]	**76**	**29,3 [23,9-35,3]**
Total		**1458**	**227**	**15,6 [13,7-17,5]**	**179**	**12,3 [10,6-14,1]**	**19**	**1,3 [0,8-2,0]**	**339**	**23,3 [21,1-25,5]**

SEI : Serological evidence of infection ; *Pv* : *Plasmodium vivax*, *Pf* : *P. falciparum* ; *Pm* : *P. malariae*, *Pspp* : tous plasmodies confondus.

Le taux d'incidence (TI) des SEI*Pf* a été estimé à 49,6 pour 100 personnes-années (p.100 PA) (IC95% : 36,7-65,3), le TI des SEI*Pv* à 39,1 p.100 PA (IC95% : 27,7-53,3) et le TI des SEI*Pm* à 4,2 p.100 PA (IC95% : 1,1-10,2). Le TI des SEI*Pspp* sur la période était de 74,0 p.100 PA (IC95% : 58,1-92,9) et augmentait de 2013 à 2015 (Tableau 5). Ces taux permettaient donc de conclure à un risque global d'exposition palustre très important et en augmentation entre 2013 et 2015. Dans l'ordre, le risque d'infection palustre était plus important pour *P. falciparum* puis pour *P. vivax* et enfin de manière plus attendue pour *P. malariae*. Les taux et les SEI les plus élevés étaient observés en 2015, période pendant laquelle seuls des sujets en séjour de longue durée étaient inclus dans la cohorte.

Accès palustres observés dans la cohorte

Au total 32 accès palustres ont été déclarés parmi les sujets suivis dans la cohorte dont 28 (88%) à *P. vivax* et 4 (12%) à *P. falciparum* (Tableau 6). Ces accès ont pu survenir au cours du suivi ou dans les six mois après la sortie de cohorte.

Le taux d'incidence des accès palustres à *P. falciparum* était de 0,6 p.100 PA (IC95% : 0,0-4,7), soit 55 fois moins que le TI des SEI*Pf*. Le taux d'incidence des accès palustres à *P. vivax* était de 6,1 p.100 PA (IC95% : 1,1-10,2) soit 6,4 fois moins que le TI des SEI*Pv*.

Tableau 5 : Taux d'incidence pour 100 personnes- années (PA) des SEI par plasmodies de 2013 à 2015 (N=1458).

			Taux d'incidence pour 100 personnes-années (PA)							
Années	**Groupes**	**PA**	**SEI*Pf***	**IC95%**	**SEI*Pv***	**IC95%**	**SEI*Pm***	**IC95%**	**SEI*Pspp***	**IC95%**
2013	1	14,7	47,7	35,0-63,1	68,2	52,8-86,2	6,8	2,5-13,7	95,4	76,9-116,1
	2	7,5	26,8	17,4-38,7	13,4	6,9-22,2	-	-	40,2	28,6-54,5
	3	27,4	40,1	28,6-54,5	36,5	25,2-49,8	-	-	58,4	44,0-75,0
	4	18,4	43,4	31,1-57,9	38,0	26,9-52,2	-	-	65,2	50,2-82,8
	5	1,8	55,7	41,9-72,2	-	-	-	-	55,7	41,9-72,2
	6	7,0	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0-3,7
	7	35,5	45,1	32,8-60,2	33,8	23,1-46,9	2,8	0,4-8,0	67,6	52,4-85,6
	8	4,5	67,1	51,9-85,1	89,4	71,5-109,5	-	-	134,1	112,3-158,7
	9	2,3	87,0	69,2-106,8	130,4	108,6-154,4	-	-	130,4	108,6-154,4
	10	9,7	41,3	29,4-55,6	51,6	38,4-67,6	-	-	61,9	47,1-78,9
	11	7,0	28,6	19,0-41,1	14,3	7,7-23,5	-	-	42,9	30,7-57,3
	12	39,1	69,1	53,7-87,3	43,5	31,5-58,5	7,7	3,1-15,1	79,3	62,5-98,5
	13	35,9	53,0	39,3-68,8	36,2	25,2-49,8	-	-	75,3	59,0-94,0
2014	14	34,6	26,0	17,0-38,1	34,7	24,0-48,1	5,8	1,9-12,4	60,7	46,2-77,8
	15	32,0	40,6	29,0-55,0	34,4	23,5-47,5	3,1	0,6-8,8	68,8	53,2-86,8
	16	8,6	35,0	24,0-48,1	-	-	-	-	35,0	24,0-48,1
	17	3,2	62,4	47,5-79,5	-	-	-	-	62,4	47,5-79,5
	18	7,3	41,1	29,4-55,6	41,1	29,4-55,6	-	-	68,5	52,8-86,2
	19	38,6	62,2	47,5-79,5	38,9	27,3-52,7	5,2	1,6-11,7	95,9	77,3-116,7
	20	28,9	52,0	38,4-67,6	48,5	35,8-64,2	6,9	2,5-13,7	86,6	69,2-106,8
	21	1,3	78,0	61,7-97,3	78,0	61,7-97,3	-	-	156,1	132,5-182,5
2015	22	24,6	28,5	19,0-41,1	16,3	9,1-26,0	4,1	1,1-10,2	44,8	32,4-59,6
	23	3,4	88,3	70,6-108,4	58,9	44,5-75,5	29,4	19,4-41,6	117,7	97,2-140,8
	24	36,3	63,4	48,4-80,6	46,9	34,1-61,9	13,8	7,3-22,9	82,7	65,7-102,3
	25	8,9	100,6	81,8-122,2	78,2	61,7-97,3	-	-	134,1	112,3-158,7
	26	19,5	66,6	51,5-84,5	51,2	38,0-67,1	-	-	97,4	78,7-118,3
Total 2013		210,7	48,4	35,4-63,6	39,4	27,7-53,3	2,4	0,2-7,2	**69,3**	**53,7-87,3**
Total 2014		154,4	45,3	32,8-60,2	36,3	25,2-49,8	4,5	1,4-11	**75,8**	**59,4-94,6**
Total 2015		92,7	59,3	44,9-76,1	43,2	31,1-57,9	7,6	3,1-15,1	**82,0**	**65,2-101,8**
Total		**457,8**	**49,6**	**36,7-65,3**	**39,1**	**27,7-53,3**	**4,2**	**1,1-10,2**	**74,0**	**58,1-92,9**

SEI : Serological evidence of infection ; *Pv* : *Plasmodium vivax*, *Pf* : *P. falciparum* ; *Pm* : *P. malariae*, *Pspp* : tous plasmodies confondus.

Tableau 6 : Taux d'incidence pour 100 personnes-années (PA) des accès palustres de 2013 à 2015 chez les militaires français déployés en Guyane (N=1458).

			Accès palustres			Taux d'incidence pour 100 personnes-années (PA)					
Années	**Groupes**	**PA***	***P. falciparum***	***P. vivax***	***P. spp***	***P. falciparum***	**IC95%**	***P. vivax***	**IC95%**	***P. spp***	**IC95%**
2013	1	14,7	0	0	0	-		-		-	
	2	7,5	0	0	0	-		-		-	
	3	27,4	0	1	1	-		3,6	0,8-9,5	3,6	0,8-9,5
	4	18,4	0	1	1	-		5,4	1,6-11,7	5,4	1,6-11,7
	5	1,8	0	0	0	-		-		-	
	6	7,0	0	0	0	-		-		-	
	7	35,5	0	6	6	-		16,9	9,5-26,6	16,9	9,5-26,6
	8	4,5	0	0	0	-		-		-	
	9	2,3	0	0	0	-		-		-	
	10	9,7	0	2	2	-		20,6	12,6-31,5	20,6	12,6-31,5
	11	7,0	0	0	0	-		-		-	
	12	39,1	0	2	2	-		5,1	1,6-11,7	5,1	1,6-11,7
	13	35,9	1	1	2	2,8	0,4-8,0	2,8	0,4-8,0	5,6	1,9-12,4
2014	14	34,6	0	0	0	-		-		-	
	15	32,0	0	0	0	-		-		-	
	16	8,6	0	0	0	-		-		-	
	17	3,2	0	0	0	-		-		-	
	18	7,3	0	0	0	-		-		-	
	19	38,6	0	0	0	-		-		-	
	20	28,9	0	2	2	-		6,9	2,5-13,7	6,9	2,5-13,7
	21	1,3	0	0	0	-		-		-	
2015	22	24,6	1	0	1	4,1	1,1-10,2	-		4,1	1,1-10,2
	23	3,4	0	2	2	-		58,9	44,5-75,5	58,9	44,5-75,5
	24	36,3	0	5	5	-		13,8	7,3-22,9	13,8	7,3-22,9
	25	8,9	0	1	1	-		11,2	5,5-19,7	11,2	5,5-19,7
	26	19,5	2	5	7	10,2	4,8-18,4	25,6	16,6-37,5	35,9	24,8-49,3
Total 2013		210,7	1	13	14	0,5	0,0-3,7	6,2	2,2-13,1	**6,6**	**2,5-13,7**
Total 2014		154,4	0	2	2	-		1,3	0,0-5,6	**1,3**	**0,0-5,6**
Total 2015		92,7	3	13	16	3,2	0,6-8,8	14,0	7,7-23,5	**17,3**	**9,9-27,2**
Total		**457,8**	**4**	**28**	**32**	**0,9**	**0,0-4,7**	**6,1**	**2,2-13,1**	**7,0**	**2,5-13,7**

* PA : nombre de personnes-années

Influence de la chimioprophylaxie par doxycycline sur les SEI

L'observance déclarée de la prise quotidienne de la doxycycline était en moyenne de 7,5/10 (IC95% : 7,3-7,7 – médiane de 9 IIQ : [6-10]), 10 correspondant à une observance correcte (OC), c'est-à-dire sans aucun oubli. L'influence de l'observance de la chimioprophylaxie par doxycycline sur les SEI selon les stades d'expressions des antigènes a été étudiée pour *P. falciparum* et *P. vivax* (Tableau 7). Une OC était protectrice (OR=0,6 IC95% : 0,41-0,88) d'une SEI érythrocytaire à *P. falciparum*. Cet effet n'était pas observé pour une SEI pré-érythocytaire, en toute logique compte tenu du mode d'action sanguin de la molécule. Cet effet protecteur était observé pour les SEI à *P. vivax* pour les antigènes des stades pré-érythocytaires et érythrocytaires. L'effet observé sur le stade pré-érythrocytaire de *P. vivax* doit cependant être discuté compte tenu des faibles effectifs (28 SEI*Pv* au total).

Tableau 7 : Effet de l'observance de la chimioprophylaxie par doxycycline sur les SEI pré-érythrocytaires et érythrocytaires à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax.*

	N	SEI[e]	%	OR	IC95%	p
Plasmodium falciparum						
SEI pré-érythrocytaire[a]						
OI[f]	967	61	6,3	1		
OC[g]	491	26	5,3	0,83	0,52-1,33	0,44
SEI érythrocytaire[b]						
OI	967	124	12,8	1		
OC	461	40	8,2	**0,60**	**0,41-0,88**	**0,008**
Plasmodium vivax						
SEI pré-érythrocytaire[c]						
OI	967	24	2,5	1		
OC	491	4	0,8	**0,32**	**0,11-0,93**	**0,03**
SEI érythrocytaire[d]						
OI	967	119	12,3			
OC	491	42	8,6	**0,67**	**0,46-0,96**	**0,03**

[a] Prise en compte des sérologies vis-à-vis des antigènes PfCSP, PfSALSA, PfLSA1$_{41}$, PfLSA3 ;
[b] Prise en compte des sérologies vis-à-vis des antigènes PfPF13, PfMSP1, PfVar2CSA ;
[c] Prise en compte des sérologies vis-à-vis des antigènes PvCSP_VK210, PvCSP_VK247 ;
[d] Prise en compte des sérologies vis-à-vis des antigènes PvMSP1, PvDBP ;
[e] SEI : « Serological Evidence of Infection » ;
[f] OI : Observance Insuffisante avec au moins un oubli de la prise quotidienne de la chimioprophylaxie par doxycycline ;
[g] OC : Observance Correcte sans aucun oubli de la prise quotidienne de la chimioprophylaxie par doxycycline.

Analyses univariées des variables en lien avec la SEI*Pspp*

Trois variables sociodémographiques étaient significativement (p<0,05) associées à la SEI*Pspp* (Tableau 8). L'âge supérieur ou égal à 25 ans était protecteur (OR=0,75 IC95% : 0,58-0,97), de même que le fait d'être gradé (officier ou sous-officier) (OR=0,72 IC95% :0,54-0,95). Etre militaire de l'armée de Terre était un facteur de risque d'infection palustre (OR=2,27 IC95% : 1,44-3,57).

Tableau 8 : Analyse univariée des variables sociodémographiques, des antécédents de mission en zone impaludée et de la perception du risque lié au paludisme.

	N	**SEI*Pspp*[a] n=339**	**%**	**Univariée**		
				OR	**IC95%**	**p**
Sexe						
Homme	1141	332	23,0	1		
Femme	17	7	41,2	2,47	0,92-6,63	0,07
Age						
< 25 ans	655	171	26,1	1		
≥ 25 ans	803	168	20,9	**0,75**	**0,58-0,97**	**0,03**
Ancienneté dans l'armée						
≤ 5 ans	728	184	25,3	1		
> 5 ans	730	155	21,2	0,80	0,62-1,03	0,08
Grade						
Non gradé	975	248	25,4	1		
Officier/Sous-officier	483	91	18,8	**0,72**	**0,54-0,95**	**0,02**
Armée d'appartenance						
Gendarmerie	217	28	12,9	1		
Terre	1241	311	25,1	**2,27**	**1,44-3,57**	**4.10^{-4}**
Antécédent de mission dans les 2 ans						
En Afrique						
Non	1017	224	22,0	1		
Oui	441	115	126,1	1,23	0,93-1,63	0,14
En Amérique du Sud						
Non	1278	303	23,7	1		
Oui	180	36	20,0	0,79	0,53-1,18	0,25
En Asie/Océanie						
Non	1056	229	21,7			
Oui	402	110	27,4	1,36	0,99-1,85	0,55
Antécédent de paludisme						
Non	1347	311				
Oui	111	28	1,02	1,02	0,64-1,62	0,95
Gravité perçue du paludisme						
Pas du tout à peu grave	304	83	27,3			
Moyennement à très grave	1120	249	22,2	0,78	0,58-1,04	0,09

[a] SEI*Pspp* : Evidence sérologique d'une infection palustre tous plasmodies confondus (à *P. falciparum* et/ou *P. vivax* et/ou *P. malariae*) ;
OR : Odd ratio.

Comme attendu, rester sur le littoral guyanais, exempt de transmission de paludisme, était un facteur de protection des SEI (Tableau 9). Les expositions multiples en forêt et/ou sur les

fleuves et/ou sur les sites d'orpaillage étaient un facteur de risque par rapport à un séjour sur le littoral seul (OR=2,17 IC95% 1,01-4,67). Les personnels en séjour de longue durée et régulièrement impliqués dans les opérations de lutte contre l'orpaillage étaient plus à risque d'infection palustre (OR=1,74 IC95% : 1,13-2,68).

Tableau 9 : Analyse univariée des variables en relation avec le type de mission effectué en Guyane.

	N	SEI*Pspp*[a]	%	Univariée		
		n=339		OR	IC95%	p
Type de séjour en Guyane						
Courte durée (3-4 mois)	1183	258	21,8	1		
Longue durée (2-4 ans)	275	81	29,5	**1,74**	**1,13-2,68**	**0,01**
Temps de suivi dans la cohorte						
≤ 117 jours	802	159	19,8	1		
> 117 jours	656	180	27,4	**1,60**	**1,16-2,19**	**0,004**
Mission sur le littoral guyanais uniquement						
Non	1394	331	23,7	1		
Oui	64	8	12,5	**0,46**	**0,21-0,99**	**0,047**
Missions sur les fleuves						
Non	246	40	16,3	1		
Oui	1212	299	24,7	**1,62**	**1,10-2,39**	**0,02**
Missions en forêt						
Non	123	23	18,7	1		
Oui	1335	316	23,7	1,31	0,81-2,11	0,3
Missions sur des sites d'orpaillage illégaux						
Non	304	67	22,0	1		
Oui	1154	272	23,6	1,00	1,73-1,37	0,99
Types de mission cumulés						
Littoral seul	64	8	12,5	1		
Fleuve ou forêt ou site d'orpaillage	120	25	20,8	2,10	0,87-5,08	0,098
Expositions multiples	1274	306	24,0	**2,17**	**1,01-4,67**	**0,047**

[a] SEI*Pspp* : « Serological Evidence of Infection », preuve sérologique d'une infection palustre tous plasmodies confondus (à *P. falciparum* et/ou *P. vivax* et/ou *P. malariae*) ;
OR : Odd ratio.

Les épisodes fébriles n'étaient pas liés à des infections palustres non diagnostiquées (Tableau 10). Le fait de faire un accès palustre à *P. vivax* et *P. falciparum* était bien lié significativement aux SEI, validant ainsi la méthode d'identification des SEI utilisée.

Tableau 10 : Analyse univariée des variables en relation avec un événement de santé pendant la mission.

	N	SEI*Spp*[a]	%	Univariée		
		n=339		OR	IC95%	p
Episode fébrile sans diagnostic						
Non	1353	314	23,2	1		
Oui	105	25	23,8	1,05	0,66-1,69	0,8
Accès palustre à *Plasmodium spp*						
Non	1426	322	22,6	1		
Oui	32	17	53,1	**3,83**	**1,87-7,85**	**2.10^{-4}**
Accès palustre à *Plasmodium falciparum*						
Non	1454	337	23,2	1		
Oui	4	2	50,0	3,47	0,48-25,13	0,22
Accès palustre à *Plasmodium vivax*						
Non	1430	324	22,7	1		
Oui	28	28	53,6	**3,83**	**1,78-8,24**	**6.10^{-4}**

[a] SEI*Spp* : « Serological Evidence of Infection », preuve sérologique d'une infection palustre tous plasmodies confondus (à *P. falciparum* et/ou *P. vivax* et/ou *P. malariae*) ;
OR : Odd ratio.

Seules deux variables mesurant l'efficacité des mesures de protection individuelles contre les piqûres de moustiques étaient associées aux SEI, mais comme facteur de risque (Tableau 11). L'utilisation d'une moustiquaire de tête lors de garde de nuit, peu appliquée en pratique car inconfortable, était surtout un indicateur de forte nuisance vectorielle. Il s'agissait donc plus d'un biais d'indication. L'imprégnation par un spray insecticide pour textile d'autres vêtements longs, utilisés le soir en lieu et place des treillis, facteur de risque, était sans doute lui aussi un biais d'indication en faveur d'une forte nuisance vectorielle.

Seule l'observance complète (sans oubli) de la prise quotidienne était un facteur protecteur d'une SEI palustre (OR=0,70 IC95% : 0,53-0,93).

Tableau 11 : Analyse univariée des variables en relation avec les mesures de protection contre les piqûres de moustiques et l'observance de la chimioprophylaxie par doxycycline.

	N	SEI*Pspp*[a]	%	Univariée		
		n=324		OR	IC95%	p
Exposition aux piqures de moustiques en forêt et sur les fleuves						
Piqures de moustique en journée						
Jamais à parfois	724	164	22,7	1		
Souvent à beaucoup	659	159	24,1	1,08	0,84-1,39	0,6
Piqures de moustique la nuit						
Jamais à parfois	596	140	23,5	1		
Souvent à beaucoup	784	183	23,3	0,96	0,74-1,23	0,7
Utilisation de répulsif cutané dès le crépuscule						
Jamais à souvent	766	174	22,7	1		
Toujours	619	150	24,2	1,11	0,86-1,43	0,4
Utilisation de répulsif cutané à l'aube au levé						
Jamais à un peu	787	174	22,2	1		
Parfois à toujours	596	148	24,8	1,16	0,90-1,50	0,3
Port de vêtements long dès le crépuscule						
Jamais à souvent	489	107	21,9	1		
Toujours	893	215	24,1	1,10	0,84-143	0,5
Port de vêtements long à l'aube au levé						
Jamais à souvent	516	115	22,3	1		
Toujours	868	208	24,0	1,10	0,84-1,43	0,5
Utilisation de moustiquaire de lit ou hamac						
Jamais à parfois	406	103	25,4	1		
Toujours	975	219	22,5	0,85	0,64-1,11	0,23
Utilisation de moustiquaire de tête pendant les gardes de nuit						
Jamais	1002	210	21,0	1		
Un peu à toujours	377	110	29,2	**1,49**	**1,13-1,97**	**5.10^{-3}**
Ré-imprégnation des treillis avec spray insecticide						
Non	769	166	21,6	1		
Oui	615	157	25,5	1,26	0,98-1,63	0,07
Imprégnation d'autres vêtements longs avec spray insecticide						
Non	810	173	21,4	1		
Oui	574	150	26,1	**1,31**	**1,01-1,69**	**0,04**
Observance de la prise quotidienne de la doxycycline						
Observance de la chimioprophylaxie						
Au moins un oubli	967	246	25,4	1		
Jamais d'oubli	491	93	18,9	**0,70**	**0,53-0,93**	**0,01**

[a] SEI*Pspp* : « Serological Evidence of Infection », preuve sérologique d'une infection palustre tous plasmodies confondus (à *P. falciparum* et/ou *P. vivax* et/ou *P. malariae*) ;
OR : Odd ratio.

Analyse multivariée des variables en lien avec la SEI*Pspp*

Le modèle multivarié retenait quatre variables. La gravité perçue du paludisme était maintenue dans le modèle final, même si non significativement associée à la SEI, afin obtenir le meilleur

modèle selon le critère d'Akaike (Tableau 12). Le modèle était adéquat selon le test d'Hosmer-Lemeshow (p=0,3). L'aire sous la courbe ROC était estimée à 0,6.

L'utilisation d'une moustiquaire de tête était retenue comme facteur de risque (biais d'indication / nuisance vectorielle). Appartenir à l'armée de Terre était un facteur de risque. Ces militaires sont plus souvent déployés dans les opération de lutte contre l'orpaillage et pour des durées plus longues. Enfin, l'observance correcte de la chimioprophylaxie par doxycycline était protectrice.

Tableau 12 : Analyse multivariée par régression logistique avec effet aléatoire (modèle mixte) sur le groupe d'appartenance des sujets.

	N	**SEI*Pspp*[a]**	**%**	**Multivariée**		
		n=313		**ORa**	**IC95%**	**p**
Armée d'appartenance						
Gendarmerie	187	25	13,4			
Terre	1159	288	24,8	1,74	1,09-2,80	0,02
Gravité perçue du paludisme						
Pas du tout à peu grave	289	78	27,0			
Moyennement à très grave	1057	235	22,2	0,82	0,60-1,10	0,19
Observance de la chimioprophylaxie						
Au moins un oubli	888	277	25,6			
Jamais d'oubli	458	86	18,8	0,73	0,54-0,97	0,03
Utilisation de moustiquaire de tête pendant les gardes de nuit						
Jamais	977	205	21,0			
Un peu à toujours	369	108	29,3	1,49	1,13-1,97	0,005
Effet Groupe (intercept)						1.10^{-8}

[a] SEI*Pspp* : « Serological Evidence of Infection », preuve sérologique d'une infection palustre tous plasmodies confondus (à *P. falciparum* et/ou *P. vivax* et/ou *P. malariae*);
ORa : Odd ratio ajusté.

Discussion – conclusions

Cette étude, la première réalisée en Guyane, permet d'avoir une vision objective sur la réalité de l'exposition des militaires français au paludisme. Sa limite principale est liée au prélèvement de sérum réalisé dans les suites immédiates de la mission, avant le retour en métropole pour les personnels en mission de courte durée. L'idéal aurait été de prélever ce sérum au moins quatre semaines après la fin de l'exposition afin d'être certain de mesurer les SEI palustres liées à des expositions en fin de mission. Nous devons donc considérer que les SEI ont pu être sous-estimées.

Cette cohorte comprenait en majorité des sujets impliqués dans la lutte contre l'orpaillage illégal en forêt comme sur les fleuves. Les sites d'orpaillage ont été identifiés comme étant des foyers hyperendémiques de paludisme à *P. falciparum* et *P. vivax* (7, 9). Cette situation contraste avec celle observée en population générale en Guyane dans laquelle les accès à *P. vivax* sont majoritaires, comme en population militaire (16, 17). Notre étude confirme l'exposition majoritaire à *P. falciparum* des militaires et par-delà la circulation prédominante de *P. falciparum* en forêt et sur les sites d'orpaillage illégaux. Par ailleurs, les SEI*Pm* confirment la circulation de *P. malariae* en Guyane, même si les diagnostics parasitaires de ces infections restent peu nombreux en population (15).

Nous observons une augmentation significative des SEI entre le début et la fin de la cohorte, les taux d'incidence passant de 69,3 p.100 PA en 2013, 75,8 p.100 PA en 2014 à 82,0 en 2015. Cette augmentation va à l'inverse de ce qui est observé pour les cas de paludisme déclarés en population civile dans laquelle une diminution continue est observée depuis 2009 (16). Cette exposition s'explique d'abord par le fait que le faciès épidémiologique du paludisme en forêt, sur les sites d'orpaillage illégaux, n'est pas comparable à celui ou ceux auxquels sont exposés la population de Guyane. En parallèle, à partir de 2014, le rythme des missions de lutte contre l'orpaillage s'est intensifié pour les militaires, multipliant ainsi les expositions. En outre, la situation observée en 2015 peut-être biaisée. En effet, seuls ont été inclus durant cette période des sujets en séjour de longue durée en Guyane. Ces personnels sont très fréquemment déployés en forêt et sont une population moins observante aux mesures de prévention, particulièrement pour la chimioprophylaxie antipalustre qui doit être prise dans la durée.

Aucune mesure de lutte collective contre les anophèles n'est envisageable en forêt amazonienne. Malgré des mesures de protection individuelles cohérentes contre les piqûres de moustiques, l'exposition des militaires aux piqûres infectantes reste très importante (taux d'incidence des SEI*Pspp* de 74,0 pour 100 personnes années). Ceci s'explique en partie par les

taux d'infections observés chez certaines espèces d'anophèles selvatiques sur les sites d'orpaillage, pouvant atteindre 10%, soit une piqûre infectante pour 10 reçues (5, 8). Ces niveaux très élevés de transmission ne laissent donc pas de marge aux défaillances dans les comportements protecteurs. Une autre raison est que les moustiquaires de hamac utilisées par les militaires ne sont pas imprégnées d'insecticide, limitant de facto leur efficacité, et que des piqûres sont possibles à travers le tissu des hamacs (8). Enfin, une étude a démontré l'existence d'un cycle d'agressivité diurne sous la canopée d'*An. darlingi*, vecteur principal du paludisme en Guyane (42). Or, l'application des mesures de protection individuelle n'est recommandée dans les armées que du crépuscule jusqu'à l'aube. Une exposition diurne a donc été possible. Ces résultats sont tous en faveur d'une nécessaire amélioration de la protection individuelle contre les piqûres de moustique. Des analyses plus spécifiques sur un sous-échantillon de sujets déployés sur des sites connus comme à haut niveau de transmission devront être réalisées afin de mesurer l'efficacité de ces mesures de prévention.

La doxycycline était au final le seul facteur protecteur des SEI palustres. Son mode d'action sur les stades érythrocytaires des parasites est retrouvé par son action protectrice spécifique sur les SEI érythrocytaires. Cependant, seule l'observance complète de la prise quotidienne de la doxycycline avait un effet protecteur mesurable. Une telle observance parfaite reste difficile à obtenir dans la durée. Les faibles taux d'incidence des cas de paludisme dans notre cohorte comparés aux taux d'incidence très élevés observés des SEI sont malgré tout très en faveur de l'efficacité de la chimioprophylaxie antipalustre par doxycycline. Comme attendu, cette efficacité est limitée pour *P. vivax* par rapport à *P. falciparum*, probablement du fait des hypnozoïtes intra-hépatiques responsables de reviviscences à distance de la prise de la chimioprophylaxie (43).

Dictionnaire des acronymes

OC : observance correcte de la chimioprophylaxie antipalustre par doxycycline, définie par une prise quotidienne sans aucun oubli pendant le temps de suivi dans la cohorte.

OI : observance insuffisante définie par un oubli ou plus de la pris quotidienne de la doxycycline.

MFI : intensité de fluorescence médiane des IgG testées en technique multiplex.

ET : écart type.

SEI : « Serological Evidence of Infection » preuve sérologique d'une infection.

SEI*Pf* : Preuve sérologique d'une infection à *P. falciparum*.

SEI*Pv* : Preuve sérologique d'une infection à *P. vivax*.

SEI*Pm* : Preuve sérologique d'une infection à *P. malariae*.

SEI*Pspp* : Preuve sérologique d'une infection palustre, incluant toutes les SEI*Pf*, *Pv* et *Pm*.

Seropre : Séroprévalence palustre initiale (Seropre) a été définie comme une séropositivité pour au moins un *Plasmodium*.

Références bibliographiques

1. Pan American Health Organization. Interactive malaria statistics. [Internet]. 2016 [cited 08 Apr 2017]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=2632&Itemid=2130.
2. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. Malar J. 2016;15(1):284.
3. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010;9:115.
4. Monte-Mór RL. Modernities in the jungle: extended urbanization in the Brazilian Amazonia: University of California, LA, USA.; 2004.
5. Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, et al. Malaria in French Guiana Linked to Illegal Gold Mining. Emerg Infect Dis. 2016;22(2):344-6.
6. Hiwat H, Hardjopawiro LS, Takken W, Villegas L. Novel strategies lead to pre-elimination of malaria in previously high-risk areas in Suriname, South America. Malar J. 2012;11:10.
7. Douine M, Musset L, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, et al. Prevalence of *Plasmodium* spp. in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. Malar J. 2016;15:315.
8. Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, et al. Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. Malar J. 2016;15:35.
9. Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, Bogreau H, Hyvert G, Nguyen C, et al. Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2016;22(5):903-6.
10. Dezécache C, Faure. E, Gond V, Salles JM, Vieilledent G, Hérault B. Gold-rush in a forested El Dorado: deforestation leakages and the need for regional cooperation. Environ Res Lett. 2017;12(3):1-11.
11. Spencer BR. Gold mining and malaria in the Brazilian Amazon [Master Thesis]. New Haven: Yale University; 1996.
12. Adhin MR, Labadie-Bracho M, Vreden S. Gold mining areas in Suriname: reservoirs of malaria resistance? Infect Drug Resist. 2014;7:111-6.
13. Nacher M, Guerin PJ, Demar-Pierre M, Djossou F, Nosten F, Carme B. Made in Europe: will artemisinin resistance emerge in French Guiana? Malar J. 2013;12:152.
14. Chocho A, Bellony S, Azor P, Chantilly S. Lieux présumés de contamination palustre répertoriés sur le littoral de la Guyane - 2009. Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2011;1:6-10.
15. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:522-33.

16. Ardillon V, Carvalho L, Prince C, Abboud P, Djossou F. Bilans 2013 et 2014 de la situation du paludisme en Guyane. Bull Veille Sanitaire Antilles-Guyane. 2015;1:16-20.

17. Queyriaux B, Texier G, Ollivier L, Galoisy-Guibal L, Michel R, Meynard JB, et al. *Plasmodium vivax* malaria among military personnel, French Guiana, 1998-2008. Emerg Infect Dis. 2011;17(7):1280-2.

18. Migliani R, Pradines B, Michel R, Aoun O, Dia A, Deparis X, et al. Malaria control strategies in French armed forces. Travel Med Infect Dis. 2014;12(4):307-17.

19. Verret C, Cabianca B, Haus-Cheymol R, Lafille JJ, Loran-Haranqui G, Spiegel A. Malaria outbreak in troops returning from French Guiana. Emerg Infect Dis. 2006;12(11):1794-5.

20. Michel R, Ollivier L, Meynard JB, Guette C, Migliani R, Boutin JP. Outbreak of malaria among policemen in French Guiana. Mil Med. 2007;172(9):977-81.

21. Orlandi-Pradines E, Penhoat K, Durand C, Pons C, Bay C, Pradines B, et al. Antibody responses to several malaria pre-erythrocytic antigens as a marker of malaria exposure among travelers. Am J Trop Med Hyg. 2006;74(6):979-85.

22. Ambrosino E, Dumoulin C, Orlandi-Pradines E, Remoue F, Toure-Balde A, Tall A, et al. A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. Malar J. 2010;9:317.

23. Koffi D, Varela ML, Loucoubar C, Beourou S, Vigan-Womas I, Toure A, et al. Longitudinal analysis of antibody responses in symptomatic malaria cases do not mirror parasite transmission in peri-urban area of Cote d'Ivoire between 2010 and 2013. PLoS One. 2017;12(2):e0172899.

24. Bousema T, Youssef RM, Cook J, Cox J, Alegana VA, Amran J, et al. Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. Emerg Infect Dis. 2010;16(3):392-9.

25. Cook J, Reid H, Iavro J, Kuwahata M, Taleo G, Clements A, et al. Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. Malar J. 2010;9:169.

26. Stewart L, Gosling R, Griffin J, Gesase S, Campo J, Hashim R, et al. Rapid assessment of malaria transmission using age-specific sero-conversion rates. PLoS One. 2009;4(6):e6083.

27. Frank M, Deitsch K. Activation, silencing and mutually exclusive expression within the var gene family of *Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol. 2006;36(9):975-85.

28. Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):367-71.

29. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Valencia AZ, Cifuentes C, Hurtado S, et al. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. Int J Parasitol. 2004;34(13-14):1535-46.

30. Herrera S, Fernandez OL, Vera O, Cardenas W, Ramirez O, Palacios R, et al. Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(2 Suppl):12-20.

31. Suh IB, Lee KH, Kim YR, Woo SK, Kang HY, Won YD, et al. Comparison of immunological responses to the various types circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* in malaria patients of Korea. Microbiol Immunol. 2004;48(2):119-23.

32. Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Pereira da Silva LH, et al. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. Infect Immun. 2006;74(5):2726-33.

33. Perera KL, Handunnetti SM, Holm I, Longacre S, Mendis K. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. Infect Immun. 1998;66(4):1500-6.

34. Storti-Melo LM, Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Taveira LC, Cordeiro AJ, Couto VS, et al. Evaluation of the naturally acquired antibody immune response to the Pv200L N-terminal fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in four areas of the Amazon Region of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(2 Suppl):58-63.

35. Wickramarachchi T, Illeperuma RJ, Perera L, Bandara S, Holm I, Longacre S, et al. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. Int J Parasitol. 2007;37(2):199-208.

36. Wipasa J, Suphavilai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. PLoS Pathog. 2010;6(2):e1000770.

37. Ceravolo IP, Souza-Silva FA, Fontes CJ, Braga EM, Madureira AP, Krettli AU, et al. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. Scand J Immunol. 2008;67(3):270-8.

38. Souza-Silva FA, da Silva-Nunes M, Sanchez BA, Ceravolo IP, Malafronte RS, Brito CF, et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(2):185-93.

39. Koffi D, Toure AO, Varela ML, Vigan-Womas I, Beourou S, Brou S, et al. Analysis of antibody profiles in symptomatic malaria in three sentinel sites of Ivory Coast by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX). Malar J. 2015;14:509.

40. Sagui E, Resseguier N, Machault V, Ollivier L, Orlandi-Pradines E, Texier G, et al. Determinants of compliance with anti-vectorial protective measures among non-immune travellers during missions to tropical Africa. Malar J. 2011;10:232.

41. Resseguier N, Machault V, Ollivier L, Orlandi-Pradines E, Texier G, Pradines B, et al. Determinants of compliance with malaria chemoprophylaxis among French soldiers during missions in inter-tropical Africa. Malar J. 2010;9:41.

42. Pommier de Santi V, Dusfour I, Girod R, Briolant S. Risque de transmission diurne du paludisme en forêt Guyanaise. Med Sante Trop. 2017;27(1):111-2.

43. Tan KR, Magill AJ, Parise ME, Arguin PM. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(4):517-31.

3. AMELIORATION DE LA PROTECTION INDIVIDUELLE CONTRE LES PIQURES DE MOUSTIQUES

Ces travaux ont été menés en parallèle des travaux de recherche.

Evaluation des vêtements imprégnés d'insecticides

Une des stratégies mise en œuvre dans les armées pour limiter le contact homme-vecteur est l'utilisation de tenues de combats imprégnées d'insecticide à longue durée d'action. Ces tenues sont imprégnées de perméthrine en usine pour une efficacité limitée à 30 lavages en machine du textile. Ces treillis en coton imprégné étaient fournis par les armées, mais se sont avérés d'une utilisation peu pratique en climat équatorial du fait d'un temps de séchage trop long du textile une fois mouillé. Ils ont été changés dans un premier temps en 2008 par des tenues non-imprégnées d'insecticide mais mieux adaptées au climat équatorial.

Un premier travail a donc été de tester l'efficacité de tenues dites « jungle » imprégnées de perméthrine à longue durée d'action en forêt guyanaise (Annexe 1). Ces travaux ont été menés en collaboration avec l'unité d'entomologie de l'armée Allemande. Entre août 2011 et juin 2012, 25 militaires français ont utilisé des treillis « jungle » imprégnés de perméthrine à longue durée d'action. Ils ont été déployés sur des foyers de paludisme en forêt guyanaise et exposés au paludisme pendant une période cumulée personnes-temps de 9,5 personnes-mois. En comparaison, 125 autres militaires utilisaient des treillis non imprégnés et exposés dans les mêmes conditions pour une période cumulée personne-temps de 30,5 mois. Aucun cas de paludisme n'est survenu dans le groupe avec treillis imprégnés versus 11 cas dans le groupe sans treillis imprégné. Toute chose étant égale par ailleurs, les résultats étaient en faveur d'une protection significative de l'imprégnation d'insecticide de longue durée ($p=0,0139$). L'efficacité résiduelle de la perméthrine a été mesurée via l'effet choc (knockdown (KD)) en insectarium sur des moustiques *Aedes aegypti*. L'effet KD99% était en moyenne de 47,7 ± 22,1 min pour les vestes de treillis et en moyenne de 60,2 ± 66,1 min pour les pantalons. Cette première étude validait le principe de l'utilisation de treillis spécial jungle imprégnés par perméthrine et avec une longue durée d'action.

Ce type de treillis « jungle » a été mis en place en Guyane à partir de l'été 2012, pour tous les militaires déployés en forêt. Le fournisseur et le cahier des charges étant différents de ceux des treillis allemands, nous avons fait réaliser une nouvelle étude par l'Institut de Recherche pour le

Développement (IRD) de Montpellier (données non publiées). L'efficacité prévue de ces treillis était limitée pour ne pas dépasser 30 lavages en machine. L'objet de cette étude était de tester l'efficacité insecticide sur *Anopheles gambiae* par mesure de l'effet choc (knockdown ou KD) et la mortalité à 24 heures. L'effet répulsif de ces treillis imprégnés était testé sur *Aedes aegypti.* Des échantillons de textile ont été testés pour déterminer l'efficacité insecticide et répulsive à l'état neuf (non utilisé) et après 4 mois d'utilisation par les militaires. Cet essai, pragmatique, prenait en compte l'utilisation réelle des treillis en forêt équatoriale. Les treillis étaient donc exposés aux pluies, aux franchissements de cours d'eau, aux lavages en et au retour de forêt. Les conclusions de cette étude étaient que les treillis neufs avaient une bonne efficacité KD95% et d'excellentes propriétés excito-répulsives. Après quatre mois d'utilisation, ces propriétés avaient baissé significativement l'efficacité des treillis étant jugée insuffisante (baisse de 70% d'effet KD au niveau des cuisses et jusqu'à 60% au niveau des manches ; baisse du pourcentage d'inhibition du repas sanguin après 30 mn d'exposition de 50% sur plusieurs parties des treillis et allant jusqu'à 90% au niveau des cuisses). La recommandation de fournir des treillis neufs tous les quatre mois aux militaires déployés en forêt a donc été donnée. L'application pleine et entière d'une telle stratégie reste cependant limitée par son coût et par les nécessaires capacités d'approvisionnement et de stockage des forces armées.

Amélioration de la protection par moustiquaire et par hamac

L'amélioration de la protection par moustiquaire a été initiée en 2014. Les anciennes moustiquaires en coton des lits de campagne (lits picots), imprégnées manuellement d'insecticide par trempage, ont été progressivement remplacées par des moustiquaires imprégnées de perméthrine à longue durée d'action. Toutes les emprises fixes en forêt et sur les fleuves bénéficient ainsi en 2016 de moyens de protection théoriquement en adéquation avec les recommandations internationales (OMS).

Le problème des hamacs moustiquaires, utilisés lors des bivouacs sur les sites d'orpaillage en forêt, était plus complexe. Ces matériels devant être portés à dos d'homme, avaient été sélectionnés dans un objectif de poids minimum au détriment de la protection (piqûres de moustiques observées à travers le tissu). Par ailleurs leurs moustiquaires, en polyester, n'étaient ni imprégnées ni imprégnables par insecticide. Il nous a donc fallu mettre en place un groupe de travail pour définir le cahier des charges d'un nouveau type de hamac moustiquaire, alliant à la fois un poids limité, des caractéristiques de résistance pour un usage dans des conditions « militaires » et une efficacité pour la protection contre les piqûres de moustiques (barrière

physique et chimique). Ce cahier des charges a ensuite été porté au niveau central pour mise en place d'un appel d'offre vers les industriels, conformément aux règles des marchés publics. Les premiers modèles produits et concurrents sont encore à ce jour en phase de test sur le terrain. Pour pallier à la longueur de ces procédures administratives, un système simple a été mis en place pour éviter les piqûres de moustique à travers le tissu du hamac : un poncho liner servant à la fois de double épaisseur et de couverture pour les nuits en forêt.

DISCUSSION - CONCLUSIONS

L'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse visait à répondre aux problématiques posées par le paludisme pour les militaires français déployés en Guyane dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal. La première était d'identifier les déterminants du paludisme chez les militaires français et par-delà, décrire ce faciès épidémiologique inconnu du paludisme en forêt guyanaise. La seconde était d'évaluer la stratégie de prévention du paludisme mise en œuvre par le Service de santé des armées.

Les travaux menés ont permis de caractériser clairement le lien entre paludisme et orpaillage illégal pour les militaires. Tout d'abord en reprenant l'historique de tous les cas recensés à la surveillance épidémiologique dans les armées et en établissant le lieu présumé de contamination. La superposition quasi-parfaite des zones d'exploitations aurifères (illégales majoritairement) avec les cas incidents est un argument fort en faveur de ce lien. Ensuite l'investigation d'une épidémie majeure de paludisme dans les forces a permis d'établir un lien statistique entre un séjour sur des sites d'orpaillage et la survenue des cas de paludisme. Etablir ce lien et cette cartographie étaient essentiels pour amener un premier message fort : il existe un problème de paludisme en forêt guyanaise. Ce message allait à l'encontre de ceux très rassurants implicitement apportés par la surveillance épidémiologique du paludisme conduite à l'échelle de la Guyane qui montrait une diminution des cas incidents d'année en année. Il s'agissait aussi de mettre en lumière le fait que des citoyens français, certes agents de l'état et militaires, étaient exposés dans un département français à un risque sanitaire majeur non maitrisé. Caractériser ce problème impliquait de mener une investigation directement en milieu orpailleur. Le choix du site d'Eau Claire pour mener une telle évaluation s'est justifié par le fait que ce site générait des problèmes de santé majeurs et répétés, débordants sur l'activité du centre délocalisé de prévention et de soins de la commune de Maripasoula. Ce site était par ailleurs pour nous représentatif des grands regroupements d'orpailleurs en situation irrégulière, comme l'ont été les sites de Repentir et Dorlin en 2009-2010. Cette étude a permis de démontrer plusieurs aspects essentiels de l'épidémiologie du paludisme en forêt guyanaise : d'abord et contre toute attente en Guyane comme en Amérique du Sud, que le parasite prédominant était *Plasmodium falciparum* ; ensuite que des foyers hyperendémiques de paludisme sont présents en forêt guyanaise ; enfin que la grande mobilité de ces orpailleurs à l'intérieur de la Guyane et par-delà ses frontières démontrait un risque réel de réimportation du

paludisme dans des territoires déclarés indemnes de transmission autochtone, comme le littoral guyanais où le potentiel vectoriel existe. Cette donnée implique que tout programme de contrôle et d'élimination du paludisme dans la région est vain en l'absence d'une prise en compte de cette population sur le plan sanitaire. En effet, avec 40% de porteurs asymptomatiques, nous pouvons considérer que la population des orpailleurs en situation irrégulière constitue le principal réservoir de plasmodies (tout du moins pour *P. falciparum* et *P. vivax*) en Guyane. Enfin, l'utilisation anarchique des traitements combinés à base d'artémisinine par cette population orpailleur depuis de nombreuses années fait craindre l'émergence de résistance des plasmodies aux traitements. De telles résistances et leur diffusion remettrait en cause le contrôle du paludisme au niveau de la région du plateau des Guyanes.

Les investigations entomologiques ont tout d'abord permis de confirmer le rôle *d'Anopheles darlingi* comme vecteur majeur du paludisme en forêt guyanaise. La plupart des études avaient jusqu'alors été menée sur les fleuves Maroni et Oyapock, plus facile d'accès et comportant des risques maitrisables pour les équipes de recherche. Ces investigations entomologiques à la fois au cœur de la forêt et sur des sites d'orpaillage étaient donc les premières jamais menées. Elles ont permis en outre de mieux identifier les autres vecteurs secondaires en forêt : *An. nuneztovari et An. triannulatus*, mais surtout *An. ininii* et *An. marajoara*, identifiés pour la première fois comme vecteurs en Guyane respectivement de *P. falciparum* et *P. vivax*. Mais au-delà de cette diversité des vecteurs, c'est plus leurs taux d'infection par des plasmodies, pouvant dépasser 10%, qui mérite d'être souligné. De tels niveaux de transmission n'avaient jamais été décrits jusqu'alors et expliquent en grande partie la surexposition des militaires français, une piqure sur dix étant suffisante pour être infecté. Dans de telles conditions, nous atteignons de facto les limites de la prévention du paludisme par les seules mesures de protection individuelle contre les piqures de moustiques.

Enfin, une dernière étude, à laquelle nous avons contribué et qui est en annexe de ce document, montre qu'il persiste des foyers résiduels de hauts niveaux de transmission de paludisme dans des villages amérindiens, sur les fleuves (Annexe 2). Les militaires sont fréquemment en contact avec ces populations et donc aussi exposés au paludisme dans ces villages. Ces populations qui sont accessibles à des programmes de prévention devraient être une cible prioritaire des programmes de prévention du paludisme en Guyane.

Notre cohorte de militaires a permis d'estimer la réalité de l'exposition au paludisme. La distribution des preuves sérologiques d'une infection palustre était en faveur d'une exposition plus fréquente à *P. falciparum*, cohérente avec la distribution des espèces parasitaires retrouvée

chez les orpailleurs. Les taux d'incidence de ces infections étaient très élevés, que ce soit pour *P. falciparum* et *P. vivax*. Le seul facteur protecteur des preuves sérologiques d'une infection au stade érythrocytaire, et donc par extension d'un accès palustre, était l'observance parfaite de la prise quotidienne de la doxycycline. Compte tenu des niveaux d'expositions sur les sites d'orpaillage, prévenir les piqures infectantes parait difficile. L'observance de la chimioprophylaxie antipalustre devient donc primordiale. Ceci explique que, dans ce contexte, la moindre défaillance dans l'observance de cette chimioprophylaxie au niveau d'un groupe de militaire conduit inévitablement à une épidémie.

L'incidence du paludisme a baissé de manière continue dans les forces armées en Guyane depuis 2009 et ce malgré une augmentation du nombre et de la durée des missions sur les sites d'orpaillage (figure 3).

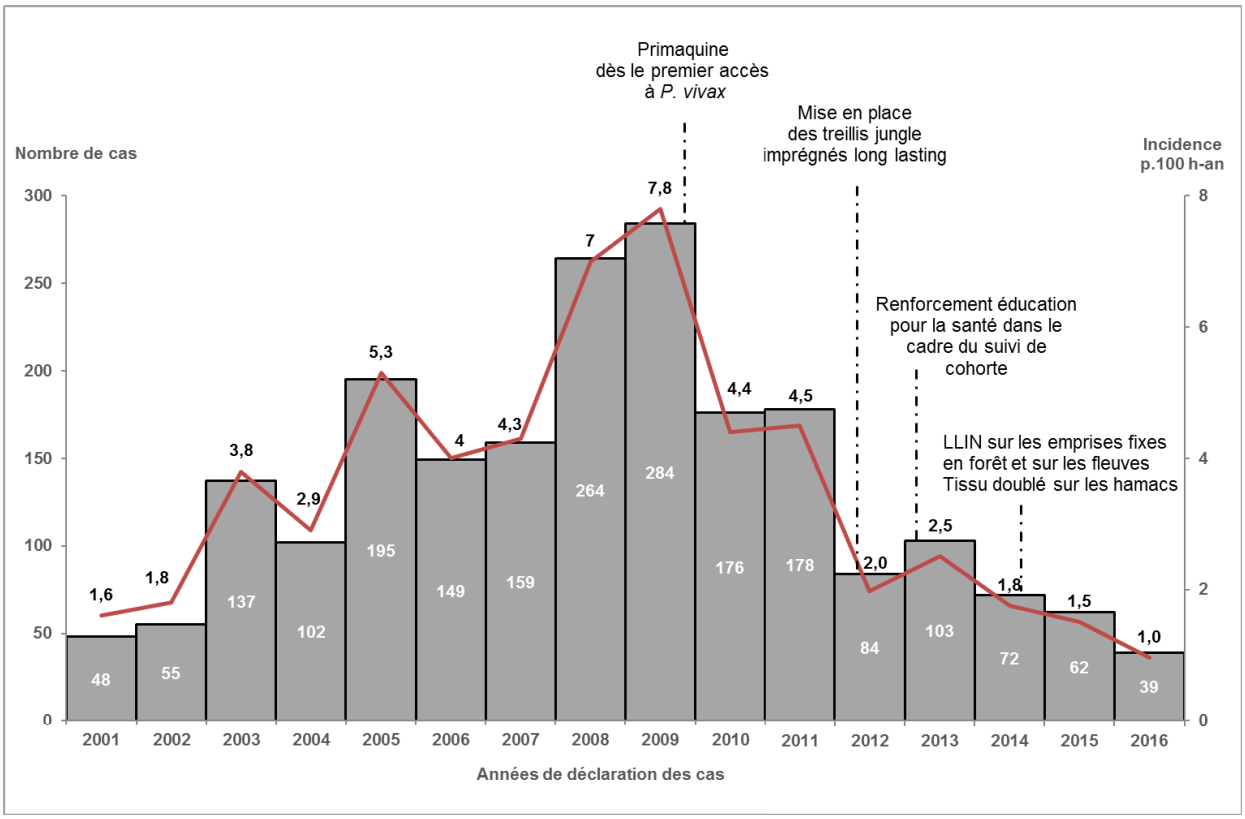


Figure 3 : Nombre de cas et incidence pour 100 personnes-années du paludisme déclarés dans les Armées françaises en relation avec un séjour en Guyane et modifications apportées au programme de prévention du paludisme 2001-2016. (LLIN : Long lasting impregnated net).

La diminution de l'incidence du paludisme en population guyanaise, principalement sur les fleuves qui sont des bases de repli pour les militaires y a certainement contribué. Mais des actions comme la mise en place des cures radicales par primaquine dès le premier accès à *P.*

vivax en 2009 pour éviter les reviviscences, ou encore l'utilisation des treillis jungle imprégnés d'insecticide à longue durée d'action en 2012 semblent avoir aussi été contributives (figure 3). Chacune de ces actions s'est accompagnée dans les suites d'une diminution par deux du taux d'incidence du paludisme. Nos travaux ont permis d'identifier d'autres failles du programme de prévention du paludisme mis en place dans les forces armées en Guyane. Tout d'abord le manque d'efficacité des hamacs moustiquaires, problème pour lequel une solution temporaire a été mise en place et une solution pérenne sera prochainement mise en œuvre. Ensuite, les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action qui remplacent maintenant les moustiquaires en coton. Enfin, les messages d'éducation pour la santé ont évolué et maintenant tiennent compte par exemple de la possibilité d'une transmission diurne du paludisme en forêt.

Les études que nous avons menées ont permis de mieux décrire et comprendre le faciès épidémiologique auquel sont confrontés les militaires en Guyane sur les sites d'orpaillage illégal en forêt. La conclusion étant que la maitrise complète du risque palustre ne pourra être obtenue que si le niveau d'exposition diminue et donc que si un véritable programme de santé dédié au contrôle du paludisme chez les orpailleurs est mis en place. Œuvrer pour la santé des orpailleurs est donc aussi œuvrer pour la santé des militaires et par extension, pour la santé en Guyane. En effet, si l'absence de contrôle du paludisme en forêt aboutissait à une émergence de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques les plus récents (ACT), le risque serait d'observer une augmentation de l'incidence du paludisme en Guyane, touchant en premier les populations les plus isolées sur les fleuves. La prise en compte de ce problème est nécessaire tant au niveau national qu'international et tout particulièrement avec les pays frontaliers de la Guyane. Cette démarche a été initiée tout d'abord par la rédaction du premier plan de lutte contre le paludisme en Guyane 2015-2018 par l'Agence régionale de santé de la Guyane et auquel nous avons largement contribué. Elle est poursuivie par des initiatives soutenues par l'OMS et la PAHO, principalement aux frontières et impliquant le Brésil, le Suriname et la France.

Médecin militaire, nous avons obtenu notre doctorat en médecine, qualification médecine générale à l'Université Claude Bernard Lyon I en 2004. Nous avons secondairement obtenu notre diplôme d'étude spécialisé en santé publique et médecine sociale en 2010 à l'Université d'Aix-Marseille. Au cours de notre cursus de spécialisation en santé publique, nous avons obtenu un Master 2 en Science de la santé – Mention Ingénierie des systèmes de santé – Spécialité Prévention et éducation pour la santé à la Faculté de médecine Aix Marseille II, puis un Master 2 en Santé Publique et environnement – spécialité Epidémiologie, Recherche Clinique, Evaluation à l'Ecole de Santé publique de Nancy. Affecté en 2006 à l'unité de surveillance épidémiologique dans les armées de l'Institut de médecine tropicale du Service de santé des armées à Marseille, nous avons contribué à l'identification de la problématique du paludisme chez les militaires déployés en Guyane dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal.

Dès 2011, à la demande de la Direction centrale du Service de santé des armées, nous avons, en collaboration avec le Dr Sébastien Briolant, participé à la rédaction d'un programme de recherche sur le paludisme dans les forces armées en Guyane. Ce programme de recherche, mené dans le cadre d'une convention de recherche entre le Service de santé des armées et l'Institut Pasteur de Guyane, visait à explorer l'ensemble de l'épidémiologie du paludisme : l'homme, le vecteur et le parasite. Dans ce programme, nous avons porté la dimension épidémiologie humaine, avec la rédaction (dès 2012) et la mise en œuvre de l'étude de cohorte prospective CopaFag (cohorte sur le paludisme dans les Forces armées en Guyane 2013-2015). Pour cette étude, nous avons rédigé le protocole, obtenu les autorisations réglementaires nécessaires dans le cadre de la recherche biomédicale, inclus et suivi l'ensemble des sujets de la cohorte, recueilli et saisi les données, organisé les prélèvements sanguins, analysé et rédigé les résultats. En parallèle, nous avons dirigé et conduit l'investigation de l'ensemble des épidémies de paludisme survenant dans les armées en et au retour de Guyane, en incluant pour la première fois une dimension entomologique en plus de la dimension épidémiologique. Les investigations entomologiques étaient conduites par des entomologistes médicaux et notre participation se limitait à l'organisation logistique et aux captures. De même, nous n'avons pas participé aux travaux de laboratoire, hors champ de nos compétences. Nous avons pris la direction de la mission d'évaluation du paludisme en population orpailleur au cœur de la forêt guyanaise. Nous avons au préalable obtenu la validation de cette mission par les représentants de l'Etat.

Nous avons coordonné l'équipe multidisciplinaire et dirigé la mise en place et l'organisation de l'étude (mise en place du camp : dispensaire, laboratoire, organisation de la protection des populations en situation irrégulière et des équipes médicales avec les forces armées et de Gendarmerie). Nous avons ensuite saisi et analysé les résultats puis rédigé le rapport d'évaluation tout en s'assurant de sa diffusion vers le Ministère de la santé puis l'Organisation mondiale de la santé.

A travers cette thèse, nous avons pu, en tant que médecin spécialiste de santé publique, évaluer une problématique de santé complexe, le paludisme, sous tous ses aspects et apporter des réponses concrètes. Cette thèse a été l'occasion d'utiliser l'ensemble des outils techniques à notre disposition pour répondre aux questions posées : des outils sérologiques aux outils de biologie moléculaire. Nous avons conçu ou participé à la conception des études, à leur mise en œuvre sur le terrain et à l'analyse et au portage des résultats vers les décideurs civils et militaires. Cette thèse nous a permis de développer une expertise solide vis-à-vis du paludisme.

Annexe 1 : Most B, Pommier de Santi V, Pagès F, Uedelhoven W and·Faulde M. Long-lasting permethrin-impregnated clothing: Protective efficacy against malaria in hyperendemic foci as well as laundering and environmental effects on residual bioactivity after worst-case use in the rain forests of French Guiana. Parasitol Res. 2017; 116(2): 677-684.

Long-lasting permethrin-impregnated clothing: Protective efficacy against malaria in hyperendemic foci, and laundering, wearing and weathering effects on residual bioactivity after worst-case use in the rain forests of French Guiana.

Bruno Most[1], Vincent Pommier de Santi[2], Frederic Pagès[2,3], Marie Mura[4], Waltraud M. Uedelhoven[5] And Michael K. Faulde[6,7]

1 Director Department A, Bundeswehr Medical Office, Koblenz, Germany

2 French Armed Forces Center for Epidemiology and Public Health (CESPA), Camp Militaire de Sainte Marthe, Marseille, France

3 Regional Office of the French Institute for Public Health Surveillance (Cire OI, Institut de Veille Sanitaire), Saint-Denis, Réunion, France

4 Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Cedex, Brétigny sur Orge, France

5 Bundeswehr Research Institute for Materials, Fuels, and Lubricants, Erding, Germany

6 Department of Medical Entomology/Zoology, Central Institute of the Bundeswehr Medical Service, PO Box 7340, 56065 Koblenz, Germany

7 Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology, University Clinics Bonn, 53105 Bonn, Germany

The final publication is available at link.springer.com

Abstract

Personal protective measures against hematophagous vectors constitute the first line of defense against arthropod-borne diseases. However, guidelines for the standardized testing and licensing of insecticide-treated clothing are still lacking. The aim of this study was to analyze the preventive effect of long-lasting polymer-coated permethrin-impregnated clothing (PTBDU) against malaria after exposure to high-level disease transmission sites as well as the corresponding loss of permethrin and bioactivity during worst-case field use. Between August 2011 and June 2012, 25 personnel wearing PTBDUs and exposed for 9.5 person-months in hyperendemic malaria foci in the rain forest of French Guiana contracted no cases of malaria, whereas 125 persons wearing untreated uniforms only, exposed for 30.5 person-months, contracted 11 cases of malaria, indicating that PTBDU use significantly (p=0.0139) protected against malaria infection. In the field, PTBDUs were laundered between 1 and 218 times (mean 25.2±44.8). After field use, the mean remaining permethrin concentration in PTBDU fabric was 732.1±321.1 min. varying between 130 mg/m^2 and 1270 mg/m^2 (mean 743.9±304.2 mg/m^2) in blouses, and between 95 mg/m^2 and 1290 mg/m^2 (mean 720.2±336.9 mg/m^2) in trousers. Corresponding bioactivity, measured according to internal licensing conditions as KD_{99} times against *Aedes aegypti* mosquitoes, varied between 27.5 and 142.5 min. (mean 47.7±22.1 min.) for blouses, and between 25.0 and 360 min (mean 60.2±66.1 min.) for trousers. We strongly recommend the use of long-lasting permethrin-impregnated clothing for the prevention of mosquito-borne diseases, including chikungunya, dengue and zika fevers, which are currently resurging globally.

Keywords: Permethrin-impregnated clothing · Malaria prevention · Long-lasting activity · Personal protection · Laundering resistance · Weathering effects

Introduction

Among the increasing number of vector-borne diseases that are currently emerging or resurging worldwide, few are vaccine-preventable. Prophylactic drugs are available only for malaria, one of the most frequent and important vector-borne diseases, but drug resistance is on the increase and spreading. For this reason, personal protective measures against hematophagous vectors constitute the first line of defense against arthropod-borne diseases in endemic areas (Faulde et al. 2006). To date, the synergistic use of skin repellent formulations combined with long-lasting insecticide-treated fabrics, including clothing, tents, and netting, is highly recommended for the

protection of at-risk personnel (WHO 2001a, b; Faulde et al. 2008; Pennetier et al. 2010; Banks et al. 2014). Because of its highly advantageous properties which include excito-repellency, hot-feet, knockdown, kill and residual activity, the synthetic residual pyrethroid permethrin has been widely used since decades as an effective arthropod contact repellent for fabric impregnation (US Armed Forces Pest Management Board 2009; Vaughn et al. 2014; Faulde et al. 2016).

Because soldiers deployed to active vector-borne disease foci are at an increased risk of contracting vector-borne diseases, permethrin-impregnated battle dresses have chiefly been developed for and used by armed forces since the 1940's (Pagès et al. 2010). Initially, battle dresses were impregnated with insecticides by dipping or spraying, but the residual activity was short. In recent years, many armies have developed they own long-lasting impregnated battle dress uniforms using different types of impregnation on various fabrics. At this time, no World Health Organization Pesticides Evaluation Scheme (WHOPES) or other national or public health guidelines exist for the standardized testing and licensing of insecticide-treated clothing, which is also commercially available in the civilian market (Faulde et al. 2016). In order to guarantee that wearing the impregnated fabric will be protective and safe, both the initial concentration and release rate of permethrin should be monitored through an appropriate quality assurance procedure during the production process (Appel et al. 2008). This is why different internal testing and licensing specifications have been developed among national forces and agencies.

In order to ensure that manufacturers fully comply with minimum quality requirements, especially those concerning protective efficacy and user safety, the German Armed Forces (Bundeswehr) implemented the standardized testing and licensing algorithm TL 8305-0331 (WIWeB 2016), launched in 2002 and revised to accord with increased technical and scientific knowledge or specific force health protection needs during military deployments. The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, has been identified as the most suitable biosensor for testing the toxicological effects of pyrethroids on fabrics against vector mosquitoes, especially when monitoring for low doses or cut-off values of less residual impregnation methods (Faulde et al. 2016, Osborne et al. 2016). In a comparison of the residual bioactivities and laundering resistances of five commercially available, factory-treated permethrin-impregnated fabrics designed for the prevention of mosquito-borne diseases, extremely high variability in initial permethrin concentration, residual bioactivity and permethrin-loss during laundering was

observed (Faulde et al. 2016). The resulting data indicated that only one of the examined products completely met all the necessary efficacy and safety requirements required by TL 8305-0331 (Faulde et al. 2016).

To date, most studies on impregnated fabrics efficacy have been conducted under laboratory conditions prior to and after laundering, or under experimental conditions. The protective effect of impregnated clothes against mosquito bites has, however, been demonstrated in field or near-field conditions in two recent studies (Londono-Renteria et al. 2015, Osborne et al. 2016). To our knowledge, only one study has attempted to investigate the protective effect of permethrin-impregnated clothing against vector-borne diseases under field conditions in disease-endemic areas (Soto et al. 1995). In a double-blind, randomized study on Colombian soldiers wearing permethrin-impregnated battle dress uniforms under non-combat conditions during a 4 to 6 weeks period, an incidence reduction of 80% against malaria and 78% against cutaneous leishmaniasis was shown (Soto et al. 1995). Unfortunately, permethrin concentrations, residual activity, bioactivity, laundering and environmental effects were not monitored during this relatively short field study.

Further, it is well known that soldiers and relief agency personnel operating in vector-borne disease-endemic regions where they are exposed to active disease foci are at an increased risk of contracting vector-borne diseases (Pagès et al. 2010). Malaria in particular has been of special military and civil health importance during recent missions worldwide (Faulde 2006; Pagès et al. 2010). In December 2010, a notable *Plasmodium vivax* malaria outbreak occurred among French forces involved in the "Harpie" mission (Pommier de Santi et al. 2016a). This mission was launched in 2008, with the goal of stemming the increase in illegal gold mining in the rain forests of French Guiana (Pommier de Santi et al. 2016b). Overall, 72 *P. vivax* malaria cases, including 3 mixed *P. vivax/P. falciparum* infections, were reported between December 2010 and April 2011, resulting in an overall attack rate of 26.5% (72/272) among French military personnel. Two illegal gold mining sites located in remote areas within the rain forest were identified as primary infection sites (Pommier de Santi et al. 2016a). Retrospective analyses showed that the main drivers of this outbreak were the lack of adherence by military personnel to malaria prevention combined with a high level of malaria transmission at illegal gold mining sites within the rain forest (Pommier de Santi et al. 2016a). Also, since the former French cotton PTBDUs were heavy and not able to dry in the humid Guiana forest, French

forces had been equipped with fast-drying but non-impregnated synthetic fabrics prior to their deployment.

The purposes of this study were to (a) analyze the preventive effect of long-lasting factory-treated permethrin-impregnated Bundeswehr battle dress uniforms (PTBDUs) during exposure to high-level malaria transmission sites in the French Guiana rain forest following the malaria outbreak described (Pommier de Santi et al. 2016a, b), (b) investigate laundering, wearing and weathering effects on residual permethrin content and bioactivity after military worst-case use in rain forests, and (c) determine whether the permethrin impregnation method used for fabric treatment remains in accord with previous efficacy results stemming from the standardized licensing requirements of German Armed Forces algorithm TL 8305-0331.

Materials and methods

Procurement of fabrics

PTBDUs, specifically designed for tropical wet climatic conditions, were supplied by UTEXBEL S.A. (Ronse, Belgium). Blouses and trousers were polymer-coated with permethrin (cis:trans = 25%:75%) at a batch-specific initial concentration of 1300 mg a.i./m^2, as previously described (Faulde and Uedelhoven 2006). The military uniform fabric used for permethrin treatment consisted of 65% cotton and 35% polyester fibers, with a medium specific weight of 220 g/m^2.

Personnel, field use and laundering of fabrics

Thirty newly produced PTBDUs were used between August 2011 and June 2012 by 25 personnel of two combat units primarily involved in the French operation Harpie (Pommier de Santi et al. 2016b). Personnel were selected for their increased exposure times during duty in malarious areas, especially the hyperendemic malaria foci of the gold mining sites Dorlin and Repentir (Pommier de Santi et al. 2016a, b). While serving in malaria foci, only PTBDUs were worn. During jungle duty, laundering of PTBDUs was carried out individually as frequently as required or desired, either by machine laundering or hand washing with detergent, and the number of machine or hand washings was recorded. Blouses and trousers were always washed simultaneously. Soldiers may also have been “drenched” during tropical rain showers or when crossing tropical rivers, swamps, or ponds, which may have affected overall laundering frequency. The number and type of launderings, mechanical characteristics and user friendliness were recorded for each soldier, using a self-administered form. Soldiers were told

that the German PTBDUs were permethrin impregnated. The concurrent negative control consisted of 125 personnel wearing untreated French battle dress uniforms (NTBDUs), but all such personnel experienced field conditions identical to those wearing PTBDUs. NTBDU-wearing personnel were selected on the basis of their estimated lower exposure times in hyperendemic malaria foci. Throughout the study, all military personnel used malaria chemoprophylaxis at 100 mg of doxycycline per person per day during their entire stay in the rain forest, a regimen that was extended for an additional four weeks after leaving the malaria transmission area. The number of person-months of exposure in malaria transmission areas was analyzed for both groups. Environmental conditions and activity patterns during duty were described and site maps were provided by Pommier de Santi et al. (2016a).

Malaria case definitions

Laboratory-confirmed *P. falciparum* malaria cases (Pommier de Santi et al. 2016a) were considered new by excluding suspected cases of *P. falciparum* recrudescence (i.e. a new malaria attack after a first attack in the preceding 3 weeks but without a new mission into malarious areas). Cases of recrudescence can occur when treatment with ACT (Riamet®) is not completed by the patient, or the drug is not taken as prescribed.

Laboratory-confirmed *P. vivax* malaria cases (Pommier de Santi et al. 2016a) were considered new, excluding relapses. For both the temperate long latency and the tropical frequent relapse phenotype (White 2011), all malaria attacks occurring up to 90 days after the first attack were systematically excluded.

Permethrin quantification

Quantification of permethrin in washed and unwashed fabrics was carried out using the validated method of the Bundeswehr Research Institute for Materials, Fuels, and Lubricants published elsewhere (Faulde et al. 2003).

Test mosquitoes

Aedes aegypti mosquitoes from a continuously (≥40 years) reared colony were raised from eggs (Berlin strain) obtained from the German Federal Environmental Agency in Berlin. Eggs were deposited and hatched larvae were fed according to a standardized protocol described elsewhere (Faulde et al. 2016).

Insecticidal testing procedures

Insecticidal activity was determined by the "cone test" as described by Faulde et al. (2016). When testing residual 99% knockdown (KD_{99}) activity of insecticide-impregnated fabric according to the TL 8305-0331 licensing protocol, a mean KD_{99}-time <71.5 min. has to be reached for *Ae. aegypti* after 100 defined machine launderings, according to EN ISO 6330:2012 (International Organization for Standardization 2012), in order to ensure sufficient protective efficacy during field use. All tests were replicated tenfold.

Statistical analyses

Values were reported as mean ± standard deviation (SD). The malaria protection rate of the PTBDU group was tested against the negative control group (NTBDU) using the one-sided Z-Score-test at the 5% level (statistical significance). Wearing, weathering and environmental effects as measured by residual permethrin concentration versus number of launderings and residual permethrin amount versus KD_{99} values after field use against laboratory results were analyzed at the 5% level (statistical significance) by two-way analysis of variance (ANOVA) or Levene test ANOVA and error degrees of freedom using the SPSS 8.0 program (SPSS Software GmbH, Munich, Germany).

Results

The PTBDU group, consisting of 25 personnel, was exposed for 9.5 person-months (0.38 months per person) within hyperendemic malaria foci without experiencing any cases of malaria, whereas the 125 persons of the NTBDU control group were exposed for 30.5 person-months (0.24 months per individual) and experienced 11 cases of malaria (Table 1). Of these, 8 cases were due to *P. vivax*, 3 cases were caused by *P. falciparum*, and none were mixed infections. Malaria incidence rates were zero per 100 exposed person-months for the PTBDU group, and 36.1 per 100 exposed person-months for the NTBDU group (Table 1). When considering overall exposure time to hyperendemic malaria foci summarized as person-months within the NTBDU group, an estimated mean of 3.4 malaria cases should have occurred within the PTBDU group, indicating that permethrin-impregnated clothing significantly (Z-score = -2.202; p=0.0139) prevented malaria infection.

Of the 30 permethrin-impregnated battle dress uniforms worn during field duty, 23 (76.7%) complete uniforms were sent back for further investigation. The number of total (machine plus manual) launderings with detergent varied from 1 to 218 (mean 25.2±44.8). Machine

laundering was performed between one and 112 times (mean 14.1±23.4), whereas uniforms were hand-washed between zero and 106 times (mean 10.4±22.1).

Table 1: Malaria incidence rates among wearers of permethrin-impregnated (PTBDU) versus untreated (NTBDU) clothing during duty in French Guiana from August 2011 to June 2012.

BDU type	N	person-months exposed	malaria cases contracted	malaria incidence rate (p 100 person-months)	Z score	p
PTBDU	25	9.5	0	0	2.202	0.0139
NTBDU	125	30.5	11	36.1		

Mean KD_{99} times varied between 27.5 and 142.5 min. (mean 47.7±22.1 min.) for blouses, and between 25.0 and 360 min (mean 60.2±66.1 min.) for trousers, yielding an overall mean KD_{99} rate of 54.0±49.7 min. Data indicate that, during worst-case field use, loss of residual bioactivity was higher in PTBDU trousers when compared to PTBDU blouses (Fig. 1). Among the 23 PTBDU blouses tested for KD_{99}, only one (4.3%) exceeded the required cut-off value (71.5 min) at 142.5 min. (sample 11), whereas three (13.0%) PTBDU trousers failed to meet the necessary knockdown efficacy requirement, with KD_{99} times of 88.5 min. (sample 7), 91.7 min. (sample 13), and 360 min. (sample 11) (Fig. 1). Exceeding the KD_{99} cut-off value was directly linked to laundering frequencies of 218 times for blouses and >54 times for trousers, indicating that higher laundering frequencies led to lower remaining bioactivity (Fig. 1).

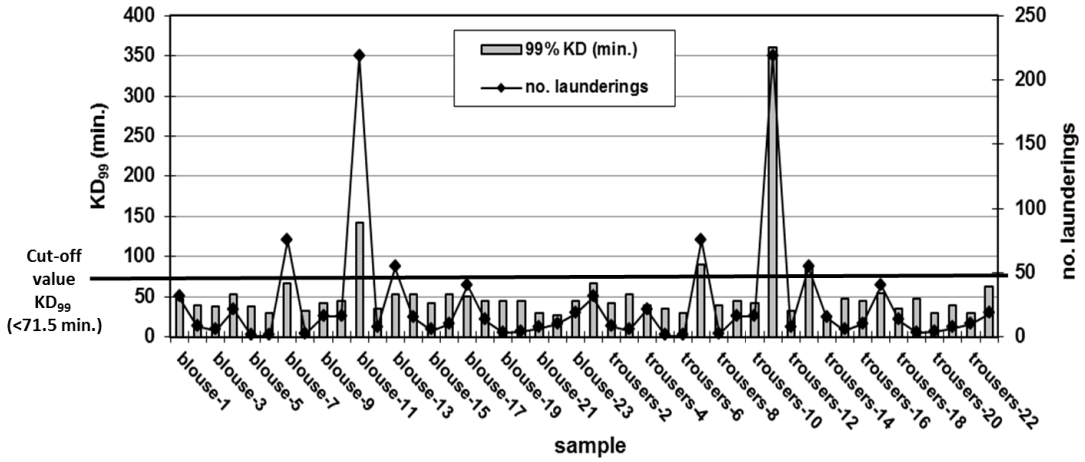


Fig. 1: Mean residual bioactivity as measured by KD_{99}-values and corresponding laundering frequency of permethrin-impregnated clothing after use in the primary rain forest of French Guiana.

Overall, the mean remaining permethrin concentration in PTBDU fabric was 732.1±321.1 mg/m2 and varied between 130 mg/m^2 and 1270 mg/m^2 (mean 743.9±304.2 mg/m^2) for blouses, and between 95 mg/m^2 and 1290 mg/m^2 (mean 720.2±336.9 mg/m^2) for trousers, showing that the mean loss of permethrin was slightly higher in trousers than in blouses (Fig. 2). KD_{99} times exceeded the required efficacy of the complete PTBDU subsequent to 218 field launderings, leading to a remaining permethrin concentration of 130 mg/m^2 in the blouse, and 95 mg/m^2 in the trouser fabric (Fig.2). Unlike in blouses, two more PTBDU trousers did not reach the 100 launderings-KD_{99} cut-off value, showing remaining permethrin amounts of 160 mg/m^2 after 75 launderings (sample 7) and 190 mg/m^2 after 54 launderings (sample 13). While all blouses met the TL 8305-0331 licensing requirements after worst-case field use in the rain forest of French Guiana, two trousers (8.7%) did not. In contrast to the KD_{99} values and corresponding residual permethrin concentrations obtained after 100 defined launderings during the licensing process (Faulde et al. 2016), data gathered during this study indicate that either the laundering procedures carried out individually under field conditions negatively influenced the stability of the permethrin impregnation and/or abrasive or substantial environmental effects took place during field use.

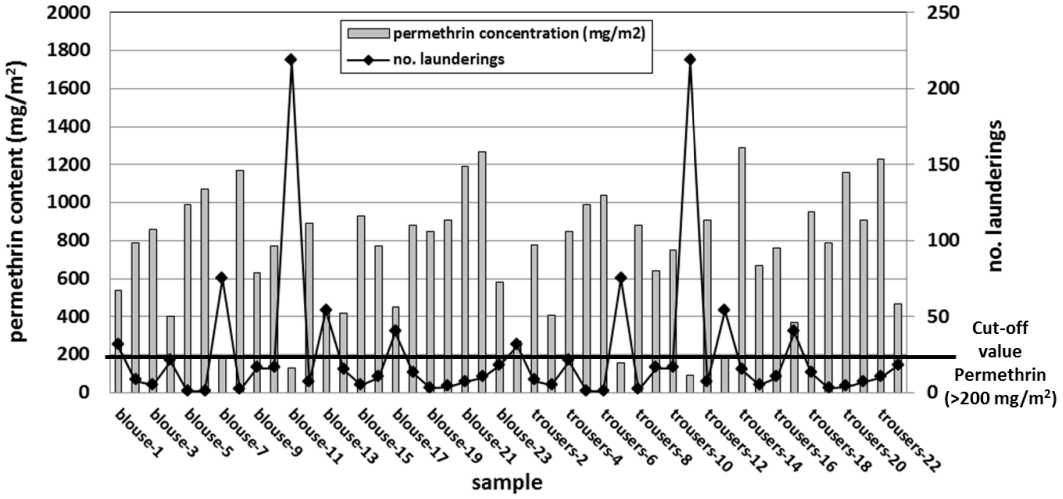


Fig. 2: Residual permethrin concentrations and corresponding laundering frequency of permethrin-impregnated clothing after use in the primary rain forest of French Guiana.

No significant differences in bioavailability ($p>0.05$, df=109) were found when comparing the 99% knockdown rates of residual permethrin concentrations in PTBDUs obtained after field use with those obtained after laboratory testing (Fig. 3a). Accordingly, PTBDU trousers after field use showed no significant difference ($p>0.05$; df=109) when compared with

corresponding laboratory-tested PTBDU trousers (Fig. 4a), indicating that remaining permethrin contents embedded in the polymer layer onto the fibers were fully bioavailable after both laboratory testing and worst-case field use and were, therefore, effective against test mosquitoes.

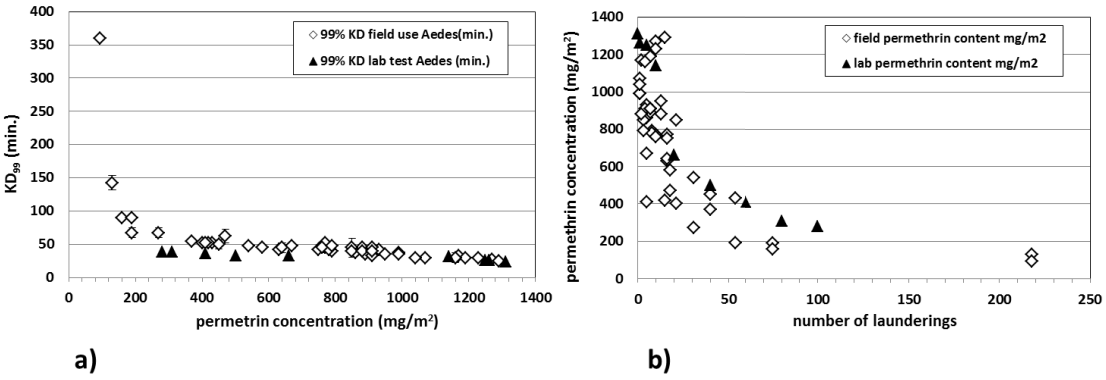


Fig. 3: a) Residual permethrin concentrations and corresponding mean bioactivity as measured by KD_{99}-values of permethrin-impregnated clothing after use in the primary rain forest of French Guiana vs. laboratory results; b) Residual amount of permethrin after laundering in the field vs. standardized laboratory machine launderings according to EN ISO 6330.

When comparing the residual amounts of permethrin after field launderings with permethrin contents after defined, standardized machine laundering according to EN ISO 6330 ($p>0.05$; df=109), residual permethrin amounts after field use were highly variable with respect to number of launderings (Fig. 3b). As an example, a residual permethrin amount of approximately 400 mg/m^2 resulted from between 5 and 21 field washings, representing a difference of 16 washing-equivalents. But, 5 standardized laboratory launderings resulted in a remaining permethrin concentration of 1,250 mg/m^2 in blouses and trousers, while, after 5 field washings, PTBDU sample 3 had a residual permethrin concentration of 860 mg/m^2 in the blouse and 410 mg/m^2 in the trouser, and sample 15 had 930 mg permethrin/m^2 in the blouse and 670 mg/m^2 in the trouser. Thus, a 3-fold higher permethrin loss was observed in trouser sample 3. Consequently, the mean additional permethrin loss was 1.4-fold in blouses and 2.3-fold in trousers, including a 1.7-fold higher loss in field-worn trousers when compared to corresponding blouses. Our data indicate that, besides the well-documented permethrin loss due to detergents used during the washing processes, an additional permethrin loss due to abrasive and/or weathering effects took place. At a given permethrin concentration, the high variability in numbers of field launderings did not differ significantly ($p>0.05$; df=109) among blouses and trousers (Fig. 4b). Generally, TL 8305-0331 requirements were fulfilled after worst-case

field use except for two trousers (PTBDU samples 7 and 13) that exceeded the required minimum KD_{99} bioactivity below 100 launderings due to excess permethrin loss.

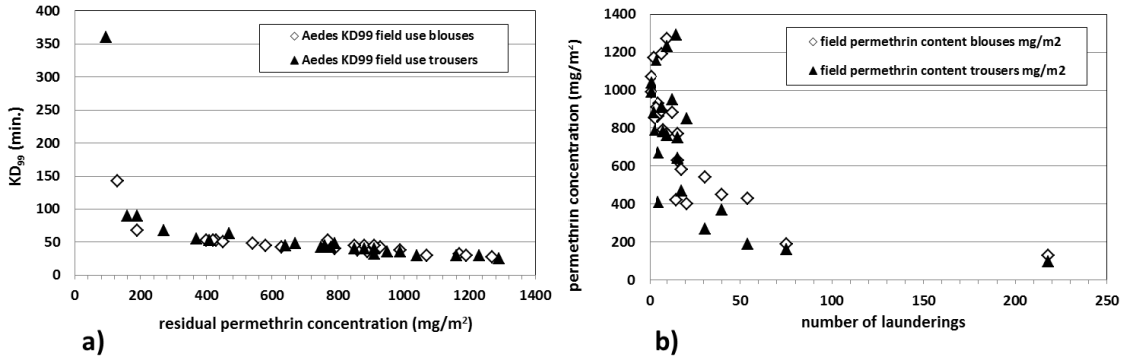


Fig. 4: a) Residual permethrin concentrations and corresponding mean bioactivity as measured by KD_{99}-values of permethrin-impregnated battle dress uniform trousers vs. blouses after use in the primary rain forest of French Guiana; b) Residual amount of permethrin in impregnated battle dress uniform trousers vs. blouses after field laundering.

Discussion

The long-lasting permethrin-impregnated Bundeswehr battle dress uniform is significantly effective against malaria infection during exposure in hyperendemic malaria foci under worst-case environmental and duty conditions. Nevertheless, the percentage protective efficacy remains unclear because – unlike those in the NTBDU group – no one in the PTBDU cohort contracted malaria. On the basis of exposure time and the 11 malaria cases experienced by the NTBDU group, 3.43 malaria cases would theoretically be expected to occur within the PTBDU group, when wearing NTBDUs, i.e. wearing PTBDUs should reduce malaria incidence rates ≥ 3.4-fold. Within the hyperendemic malaria study sites, which were characterized by high-level co-occurrence of *P. vivax* and *P. falciparum* transmission, *P. vivax* cases were prevalent (Pommier de Santi et al. 2016b). According to recent studies, various anopheline mosquito species may be involved in the focal transmission of malaria in French Guiana. Although *Anopheles darlingi* has long been considered the principal malaria vector in the French Guiana rain forest, other sylvatic species may transmit *P. falciparum* and *P. vivax* in artificially altered and/or deforested areas. For example, in recent years, *An. marajoara*, *An. nuneztovari* s.l. and *An. inini* have been identified as main vectors chiefly responsible for malaria outbreaks reported in French forces (Dusfour et al. 2012; Pommier de Santi et al. 2016a; Pimenta et al. 2015). And, in the Amazonian forest, additional sylvatic vectors that are also present in French

Guiana have been found infected with *Plasmodium* spp., some of these may be involved in malaria transmission at sites that are ecologically favourable to them (Dusfour et al. 2012; Pommier de Santi et al. 2016a; Pimenta et al. 2015). *Anopheles darlingi* and *An. marajoara* are considered primary neotropical malaria vectors that share similar lowland jungle habitats but differ in certain behavioural traits (Sinka et al. 2010). Unlike *An. darlingi*, *An. marajoana* is reported to favour wetland habitats that have undergone anthropogenic environmental change as at gold mining sites (Sinka et al. 2010). Under such conditions, *An. marajoara*, formerly considered a secondary vector of minor importance, assumes a dominant role relative to *An. darlingi* (Moreno et al. 2007). However, in our study, permethrin-induced bite protection was directed against both primary *Anopheles* vectors.

In South America, cases of malaria associated with gold mining are a public health concern, especially in rain forest sites where mining is illegal (Pommier de Santi et al. 2016a, b). Such sites may serve to further the geographical spread of malaria (Douine et al. 2016). It is therefore hardly surprising that the movements of illegal gold miners have recently been identified as a major reason for the nationwide re-emergence of malaria in Venezuela, where sylvatic and rural transmission cycles may spill over into urban areas, with epidemic effects (ProMED 2016). Besides chemoprophylactic regimens, personal protective measures against mosquito bites, especially the use of long-lasting factory-treated permethrin-impregnated clothing, may prevent both infection and the spread of disease.

The minimum effective permethrin concentration on treated clothing may differ markedly among vector arthropod species and families (Faulde et al. 2016). Although effective doses on impregnated fabrics could be as low as between 25 and 200 mg permethrin/m^2 against sand flies (Burgess et al. 1988), between 80 and 100 mg permethrin/m^2 against anopheline mosquitoes (Darriet et al. 1984), and between 62 and 250 mg permethrin/m^2 against *Amblyomma americanum* ticks (Schreck et al. 1982), low and/or sublethal permethrin concentrations may increase insecticide resistance and result in undesired behavioural changes especially in tick vectors (Faulde et al. 2006; Faulde et al. 2012). For example, low doses of permethrin may stimulate or accelerate attachment to impregnated clothing in the camel tick, *Hyalomma dromedarii* as well as in female *Dermacentor reticulatus* ticks (Fryauff et al. 1996; Buczek et al. 2015). Also, reports on some commercially available permethrin-impregnated fabrics designed for gardeners and foresters have described increased findings of dead but engorged ticks on the human body (Faulde et al. 2016). It is, therefore, highly recommended to

employ long-lasting impregnation methods while aiming at remaining minimum residual permethrin concentrations ≥200 mg permethrin/m^2 during field use in order to ensure sufficient protective efficacy while simultaneously avoiding undesired behavioural side effects and/or pyrethroid resistance.

Our results clearly indicate a laundering-independent excess loss of permethrin that was not linked to changes in bioavailability because the permethrin concentration vs. KD_{99} value-ratio was unchanged. Suggested reasons for this excess permethrin loss are weathering effects due to frequent contact with water (rain, swimming though ponds and rivers), heat, sunlight, and other environmental factors influencing the chemical stability of the permethrin molecule, and/or abrasive factors that result in damage to the fabric surface on which permethrin is embedded in a plastic layer (Faulde et al. 2006). Such effects may be due to crawling over soil, sand or rocks, vigorous hand cleaning with brushes with soap, or contact with caustic chemicals.

In concordance with the EU Biocides Regulation 528/2012, it is strongly recommended that manufacturers of impregnated clothing provide data on concentrations, migration rates, homogeneity on impregnated fabrics, protective efficacy, and laundering resistance of the insecticide used for their products (Appel et al. 2008). This information is critical to designing safe and effective personal protection products. Although the polymer-coating method has been shown to provide excellent laundering resistance, residual stability, and long-term efficacy, our results point to the need for further improvements in residual permethrin contents and bioavailability, especially when garments are intended for long-term worst-case field use.

Despite documented permethrin loss from laundering, weathering effects and mechanical abrasion during military worst-case use in the tropical rain forest, long-lasting factory-based polymer-coated permethrin-impregnated clothing provided excellent protection against bites of infectious anopheline mosquitoes, thereby reducing malaria incidence rates significantly when military personnel were operating in high-transmission foci. In the light of this, our method is highly recommended for personal protection against mosquito-borne diseases of public health importance, including chikungunya, dengue and zika fevers, all of which are currently resurging globally.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Ms. Anke Crecelius and Mr. Bernd Bocklet for laboratory support. Thanks also to the military personnel involved who assisted in data collection. Dr. Richard G. Robbins, Walter Reed Biosystematics Unit, Department of Entomology, Smithsonian Institution, Washington, DC, helpfully reviewed and commented on an earlier version of our manuscript. This publication represents the thesis of Mr. Bruno Most.

References

Appel KE, Gundert-Remy U, Fischer H, Faulde M, Mross KG, Letzel S, Rossbach B (2008) Risk Assessment of Bundeswehr (German Federal Armed Forces) Permethrin-impregnated battle dress uniforms (BDU). Int J Hyg Environ Health 211: 88-104

Banks SD, Murray N, Wilder-Smith A, Logan JG (2014) Insecticide-treated clothes for the control of vector-borne diseases: a review on effectiveness and safety. Med Vet Entomol 28(S1): 14-25

Buczek A, Lachowska-Kotowska P, Bartosik K (2015) The effect of synthetic pyrethroids on the attachment and host-feeding behavior in Dermacentor reticulatus females (Ixodida: Amblyommidae). Parasit Vectors 8: 366

Burgess NR, Carter SW, Dodd GD, Shirley CD (1988) Permethrin fabric treatments for the protection of personnel from biting insect and other arthropod attack. Intern Pest Control 30: 142-144

Darriet F, Robert V, ThoVien N, Carnevale P (1984) Evaluation of the efficacy of permethrin-impregnated intact and perforated mosquito nets against vectors of malaria. World Health Organization, Geneva, Switzerland, WHO/VBC/84.899: 19

Douine M, Musset L, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, Adenis A, Djossou F, Brousse P, Perotti F, Hiwat H1, Vreden S, Demar M, Nacher M. (2016) Prevalence of Plasmodium spp. in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. Malar J 15: 315

Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R. (2012) Incrimination of Anopheles (Anopheles) intermedius Peryassú, An. (Nyssorhynchus) nuneztovari Gabaldón, An. (Nys.) oswaldoi Peryassú as natural vectors of Plasmodium falciparum in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz 107(3): 429-32

Faulde MK, Uedelhoven WM, Robbins RG (2003) Contact toxicity and residual activity of different permethrin-based fabric impregnation methods for Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), and Lepisma saccharina (Thysanura: Lepismatidae). J Med Entomol 40: 935-941

Faulde M, Uedelhoven W (2006) A new clothing impregnation method for personal protection against ticks and biting insects. Int J Med Microbiol 296 (Suppl. 1): 225-229

Faulde MK, Uedelhoven WM, Malerius M, Robbins RG (2006) Factory-based permethrin impregnation of uniforms: Residual activity against Aedes aegypti and Ixodes ricinus in battle dress uniforms worn under field conditions, and cross contamination during the laundering and storage process. Mil Med 171(6): 472-477

Faulde M (2006) Emergence of vector-borne diseases during war and conflict. Medical Corps International 26(1): 4-14

Faulde M, Scharninghausen J, Tisch M (2008) Preventive effect of permethrin impregnated clothing for humans exposed to Ixodes ricinus ticks and associated Borrelia burgdorferi s.l. in Germany. Int J Med Microbiol 298(S1): 321-324

Faulde M, Albiez G, Nehring O (2012) Novel long-lasting impregnation technique transferred from clothing to bednets: extended efficacy and residual activity of different pyrethroids against Aedes aegypti as shown by EN ISO 6330-standardized machine laundering. Parasitol Res 110(6): 2341-2350

Faulde MK, Pagès F, Uedelhoven, W (2016) Bioactivity and laundering resistance of five commercially available, factory-treated permethrin-impregnated fabrics for the prevention of mosquito-borne diseases: the need for a standardized testing and licensing procedure. Parasitol Res 115(4): 1573-1582

Fryauff DJ, Shoukry MA, Hanafi HA, Choi YM, Kamel KE, Schreck CE (1996) Contact toxicity of permethrin-impregnated military uniforms to Culex pipiens (Diptera: Culicidae) and Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae): effects of laundering and time of exposure. J Am Mosq Control Assoc 12: 84-90

International Organization for Standardization (ISO) (2012) Domestic washing and drying procedures for textile testing. EN ISO 6330:2012. Available from www.iso.org

Londono-Renteria B, Patel JC, Vaughn M, Funkhauser S, Ponnusamy L, Grippin C, Jameson SB, Apperson C, Mores CN, Wesson DM, Colpitts TM, Meshnick SR (2015) Long-lasting permethrin-impregnated clothing protects against mosquito bites in outdoor workers. Am J Trop Med Hyg 93: 869-874

Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V (2007) Abundance, biting behavior and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. Med Vet Entomol 21: 339-349

Osborne J, DeRaedt-Banks S, Hendy A, Gezan SA, Kaur H, Wilder-Smith A, Lindsay SW, Logan JG (2016) Personal protection of permethrin-treated clothing against Aedes aegypti, the vector of dengue and zika virus, in the laboratory. PLoS ONE 11(5): e0152805

Pagès F, Faulde M, Orlandi-Pradines E, Parola P. (2010) The past and present threat of vector-borne diseases in deployed troops. Clin Microbiol Infect 16: 209-224

Pennetier C, Chabi J, Martin T, Chandre F, Rogier C, Hougard JM, Pagès F (2010) New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. Parasit Vectors 3: 81

Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, Pessoa FA, Oliveira GA, Campos KM, Villegas LM, Rodrigues NB, Nacif-Pimenta R, Simões RC, Monteiro WM, Amino R, Traub-Cseko YM, Lima JB, Barbosa MG, Lacerda MV (2015) An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 110(1): 23-47

Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, Dusfour I, Mendibil A, Simon F, Deparis X, Pagès F (2016a) Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. Malar J 15: 35

Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, Bogreau H, Hyvert G, Nguyen C, Pelleau S, Legrand E, Musset L, Nacher M, Briolant S (2016b) Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. Emerg Infect Dis 22(5): 903-906

ProMED (2016): Malaria-Venezuela: increase countrywide. Vol 50, Issue 48, Archive Number: 20160817.4421525, dated 17 Aug 2016. Available at http://www.promedmail.org/

Schreck CE, Mount GA, Carlson DA (1982) Pressurized sprays of permethrin on clothing for personal protection against the lone star tick (Acari: Ixodidae). J Econ Entomol 75: 1059-1061

Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI (2010) The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors 3:72

Soto J, Medina F, Dember N, Berman J (1995) Efficacy of permethrin-impregnated uniforms in the prevention of malaria and leishmaniasis in Colombian soldiers. Clin Infect Dis 21(3): 599-602

US Armed Forces Pest Management Board (2009) Technical Guide No. 36: Personal protective measures against insects and other arthropods of military significance. Available from http://www.afpmb.org/sites/default/files/pubs/techguides/tg36.pdf

Vaughn MF, Funkhouser SW, Lin F-C, Fine J, Juliano JJ, Apperson CS, Meshnick SR (2014) Long-lasting permethrin impregnated uniforms: a randomized-controlled trial for tick bite prevention. Am J Prev Med 46: 573-480

White NJ (2011) Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. Malar J 10: 297

WIWeB (2016) Bedingungen für die Zulassung der Vektorenschutzausrüstung gemäß TL 8305-0331. Available from http://www.lhbw.de/fileadmin/user_upload/Ze_2016-01-26___8305-0331___Vektorenschutzausruestung_fuer_textile_Flaechengebilde___Herstellerzulassun_P000294636_.PDF

World Health Organization (2001a) Vectors of diseases: hazards and risks for travellers – Part I. WER 25, 189-194

World Health Organization (2001b) Vectors of diseases: hazards and risks for travellers – Part II. WER 26, 201-203

Annexe 2 : Vezenegho SB, Adde A, Pommier de Santi V, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Dusfour I, Girod R, Briolant S. High malaria transmission in a forested malaria focus in French Guiana: how can *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention measures? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016; 111(9): 561-9.

High malaria transmission in a forested malaria focus in French Guiana: How can exophagic *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention measures?

Samuel B Vezenegho[1], Antoine Adde[1], Vincent Pommier de Santi[2,3], Jean Issaly[1], Romuald Carinci[1], Pascal Gaborit[1], Isabelle Dusfour[1], Romain Girod[1], Sébastien Briolant[1,3,4,5]/+

[1]Institut Pasteur de la Guyane, Unité d'Entomologie Médicale, Cayenne, Guyane, France
[2]Centre d'Epidémiologie et de Santé Publique des Armées, Marseille, France [3]Direction Interarmées du Service de Santé en Guyane, Cayenne, Guyane, France [4]Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département des Maladies Infectieuses, Unité de Parasitologie et d'Entomologie, Brétigny sur Orge, France [5]Aix Marseille Université, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Marseille, France

In French Guiana, malaria vector control and prevention relies on indoor residual spraying and distribution of long lasting insecticidal nets. These measures are based on solid epidemiological evidence but reveal a poor understanding of the vector. The current study investigated the behaviour of both vectors and humans in relation to the ongoing prevention strategies. In 2012 and 2013, Anopheles *mosquitoes were sampled outdoors at different seasons and in various time slots. The collected mosquitoes were identified and screened for* Plasmodium *infection. Data on human behaviour and malaria episodes were obtained from an interview. A total of 3,135* Anopheles *mosquitoes were collected, of which* Anopheles darlingi *was the predominant species (96.2%). For the December 2012-February 2013 period, the* Plasmodium vivax *infection rate for* An. darlingi *was 7.8%, and the entomological inoculation rate was 35.7 infective bites per person per three-month span. In spite of high bednet usage (95.7%) in 2012 and 2013, 52.2% and 37.0% of the participants, respectively, had at least one malaria episode.* An. darlingi *displayed heterogeneous biting behaviour that peaked between 20:30 and 22:30; however, 27.6% of the inhabitants were not yet protected by bednets by 21:30. The use of additional individual and collective protective measures is required to limit exposure to infective mosquito bites and reduce vector densities.*

Key words: *Anopheles darling* - *Plasmodium vivax* - biting behaviour - entomological inoculation rate - malaria - French Guiana

Malaria in French Guiana, an overseas territory of France located on the northeast coast of South America, remains of public health importance even though the number of reported clinical cases has dropped from 4,479 cases in 2005 to 445 cases in 2014 (Ardillon et al. 2015). Since 2005, *Plasmodium vivax* has been predominant; this species was responsible for 67% of the reported malaria cases in the territory in 2014, the other cases were mainly due to *P. falciparum* (Carme et al. 2009, Musset et al. 2014, Ardillon et al. 2015). Most of the officially reported cases occur in villages located along the main rivers that flow through the territory. Moreover, it is clear that illegal gold mining areas are obviously relevant uncontrolled locations for malaria transmission (Pommier de Santi et al. 2016a, b, c). The coastal region of the territory is home to 75% of the population and is essentially characterised by imported malaria cases from the inland areas, although autochthonous transmission is occasionally observed (Carme et al. 2009, Musset et al. 2014, Ardillon et al. 2015).

A total of 24 anopheline species have been reported in French Guiana (Talaga et al. 2015). One of these is *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, known as the most common malaria vector in the Americas and, consequently, also in the Amazon Region (Sinka et al. 2010, Hiwat & Bretas 2011, Laporta et al. 2015). This species has been incriminated as the principal malaria vector in French Guiana at different periods and places (Floch & Abonnenc 1951, Floch 1955, Girod et al. 2008, Hiwat et al. 2009, Fouque et al. 2010, Girod et al. 2011). Furthermore, other species (*An. nuneztovari sl*, *An. oswaldoi sl*, *An. intermedius*, *An. marajoara* and *An. ininii*) that have been found naturally infected with *Plasmodium* sporozoites in the wild are considered as secondary vectors, although their role in human transmission is still to be unravelled (Dusfour et al. 2012, Pommier de Santi et al. 2016a, b).

Malaria vector control in French Guiana is achieved through the distribution of long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS). Deltamethrin is the insecticide used for both approaches (CIRE 2006, Mansotte et al. 2010). Whereas IRS targets malaria vectors that rest inside houses, LLINs prevent contact between humans and mosquitoes, which often bite indoors

doi: 10.1590/0074-02760160150
Financial support: ARS (Conventions Nº 12-49/ARS du 11 juillet 2012 and Nº 13-83/ARS du 28 juin 2013), and by the French Army (grant LR607e). This work benefited from an Investissement d'Avenir grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01). This study received a European commission REGPOT-CT-2011-285837-STRonGer grant within the FP7.
+ Corresponding author: sbriolant@wanadoo.fr
Received 17 April 2016
Accepted 12 July 2016

when people are sleeping. The deltamethrin used in both strategies is supposed to protect the community by killing the vectors and interrupting local malaria transmission.

The effectiveness of LLINs is reduced when mosquitoes change their biting behaviour from times when LLINs users are under their nets to when they are not using them. In the same way, the effectiveness of IRS is reduced when mosquitoes adopt exophagic and exophilic behaviours.

Indeed, *An. darlingi* exhibits heterogeneous biting behaviour across its range. Indoor biting by this species has been reported in Belize (Roberts et al. 2002), while a tendency to bite outdoors has been noted elsewhere, including Brazil (Gil et al. 2003), Suriname (Rozendaal 1989, Hiwat et al. 2011) and Peru (Moreno et al. 2015). In French Guiana, this species has been collected while biting humans outside houses in both the coastal region and in forested areas (Pajot et al. 1977, Girod et al. 2008, Dusfour et al. 2010, 2013, Vezenegho et al. 2014, 2015). These entomological observations should be considered in the light of human behaviour to define an efficient and sustainable malaria vector control strategy. In particular, special attention should be given to the outdoor activities of residents from soon after sunset until the later part of the evening when they retire into their houses. The same issues may arise at dawn.

Beyond *Anopheles* human biting rates, the longevity of the female population is a key parameter in estimating the risk of malaria transmission. This risk can be assessed by measuring the parity of females (Detinova 1962). Indeed, older females are more likely to transmit the parasite given the length of its sporogonic cycle. However, data on the longevity of *An. darlingi* populations are very scarce in French Guiana where parity is generally low (Girod et al. 2008, Hiwat et al. 2009, Fouque et al. 2010).

The success of malaria vector control strategies is reflected by a decrease in malaria transmission. Several indices such as parasite rate, annual parasite index, spleen rate and entomological inoculation rate can be used to measure malaria transmission (Hay et al. 2000, Smith & McKenzie 2004, Smith et al. 2007, 2009). The entomological inoculation rate (EIR) is considered the most direct of these indices and provides an insight into the impact of malaria control measures. Moreover, it helps to identify areas of increased risk. The strength of EIR lies in the fact that it quantifies the parasite-infected mosquitoes and their probability of transmitting parasites to humans.

With the goal of maintaining the recent gains that have reduced the number of malaria cases in the territory, an entomological study was conducted in Blondin, a village located along the Oyapock River separating French Guiana from Brazil. The objectives were (i) to assess the biting behaviour of *Anopheles* mosquitoes and their role in malaria transmission, and (ii) to characterise human behaviour and investigate malarial episodes in relation to the ongoing malaria vector control and prevention strategies.

MATERIALS AND METHODS

Study site - The study was conducted in Blondin, French Guiana, a forested village located along the Oyapock River, which forms a natural boundary with Brazil, upstream of the town of Saint-Georges de l'Oyapock. A health centre is available to the municipality, which is occupied by 3,855 inhabitants (Fig. 1). Blondin village

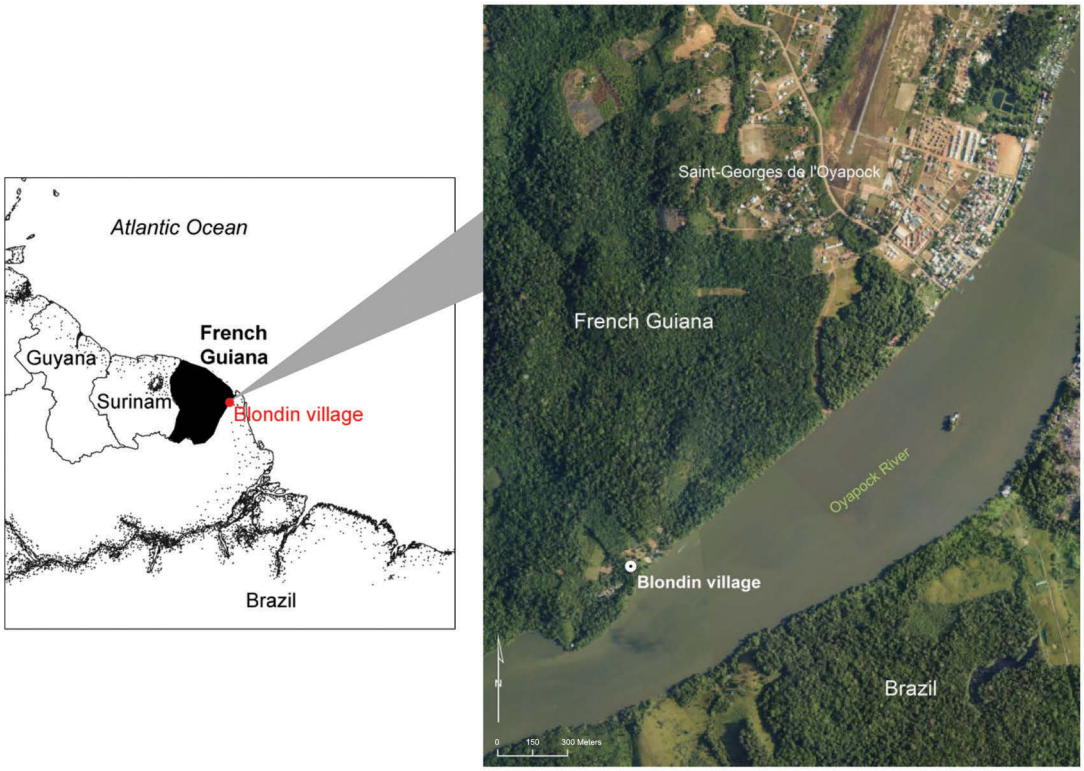


Fig. 1: localisation of the study site of Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana. Orthophotograph acquired in 2006 by the French National Geographic Institute (BD-ORTHO® product).

itself is home to approximately 60 inhabitants, primarily Amerindians and people of Brazilian origin. The village comprises 13 houses, which have wooden walls and corrugated aluminium roofs without ceilings. Inhabitants of the village engage in subsistent farming and fishing.

The climate of the study area is equatorial, and four seasons of unequal length can be distinguished: a long rainy season from April to June, a long dry season from July to December, a short rainy season from January to February and a short dry season in March. The short dry and wet seasons are yearly periods of low and high rainfall, respectively. The transition periods are the yearly intervals between these low and high rainfall periods. In French Guiana, the seasons are influenced by the migration of the inter-tropical convergence zone. In 2012 and 2013, the average annual rainfall was 3126.5 mm and 3131.1 mm, respectively. During the study period, from December 2012 to February 2013 (session 1) and from September to November 2013 (session 2), average rainfall was 891.8 mm and 304.9 mm, respectively. The average temperature is approximately 27ºC with an average relative humidity of 80%. In French Guiana, the average annual rainfall is approximately 3,000 millimetres.

Malaria in the village is mainly due to *P. vivax*. An increased incidence of cases is usually observed between October and December. Distribution of LLINs in Blondin village started in July 2012 with a coverage level of 100%. Each year, IRS is implemented in September - before the major peak in malaria cases.

In the municipality of Saint-Georges de l'Oyapock, 257 and 152 malaria cases were diagnosed in 2012 and 2013, respectively. *P. vivax* and *P. falciparum* were, respectively, responsible for 88.7% and 11.3% of malaria cases in 2012, and for 90.8% and 9.2% of malaria cases in 2013.

Study design and mosquito collection - Mosquito collections were conducted in Blondin village from December 2012 to February 2013 (session 1) and from September 2013 to November 2013 (session 2). Mosquitoes were collected for four and three consecutive nights in the first week of each month for sessions 1 and 2, respectively. The collections were performed from 18:30 to 20:30, 20:30 to 22:30 and 05:00 to 07:00 by human landing catches (HLC). The collection sites were the same throughout the study. Mosquitoes were collected exclusively outdoors and close to houses. HLC were performed by two individuals, each acting as bait and collector following World Health Organization recommendations, whereby the lower legs are exposed and landing mosquitoes collected with a mouth aspirator (WHO 1975).

Field and laboratory processing - *Anopheline* species were identified morphologically using taxonomic keys specific to the region (Floch & Abonnenc 1951, Forattini 1962, Faran & Linthicum 1981). A subset of at most ten *An. darlingi* per day was dissected for determination of parity status by examining the conformation of tracheoles (Detinova 1962).

Genomic DNA extraction and Plasmodium species identification - DNA was extracted from the head and thorax of all female anopheline mosquitoes according to the protocol provided by the MagMAX™-96 DNA Multi-Sample kit (Applied Biosystems, USA). The resultant DNA in pools of ten was subjected to nested polymerase chain reaction (PCR) to detect *Plasmodium* DNA according to Snounou et al. (1993). Individually stocked DNA used to compose the pooled DNA was screened when a pool tested positive.

Survey interview - The interviews were conducted during the dry season in 2014 to avoid seasonal bias in the answers. The interview first explored socio-demographic characteristics such as age and gender, duration of residence in Blondin village and level of education. Participants were then asked whether they knew the role of mosquitoes in malaria transmission, the signs of malaria in adults and children and were questioned about the use of preventive measures (nets and repellents), their behaviour (the time they retire under bednets to sleep and the time they emerge from the bednets), and malaria history (episodes in 2012 and 2013, whether they had consulted a doctor and whether they took antimalarial drugs without instructions from a doctor). Interviews were performed in the presence of a translator for assistance in situations involving language barriers.

Data and statistical analysis - Human biting rates (HBR) were calculated as the total number of anopheline mosquitoes caught landing on humans, divided by the number of collectors, divided by the number of hours spent sampling. *Plasmodium* species infection rates were calculated as the number of specimens infected with the *Plasmodium* parasite divided by the total number of specimens tested. The entomological inoculation rate estimates the number of infective mosquito bites per person per unit of time. It is calculated as the product of the HBR and the infection rate (Birley & Charlewood 1987).

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 5.01). Quantitative variables were compared using Mann-Whitney tests. Percentages were compared by using Fisher's exact test. The comparison of *Anopheles* distributions between session 1 and 2 was performed by using Chi-square tests. The comparison of *Anopheles* distributions according to the collection time within a session was performed by using Chi-square tests for trend. Statistical results were considered significant when the p-value was below 0.05.

Ethics - The collectors were local volunteer residents who were given training on HLC and informed of the associated risks of the collection method. They were supervised during the captures by the authors. Malaria prophylaxis was proposed and information on the medication was provided. Collectors who benefited from prophylaxis gave their free, express and informed consent. The interviews were anonymous and completed with the consent of all participants.

RESULTS

Anopheles species composition and human biting rates - A total of 3,135 *Anopheles* mosquitoes were collected (Table I). During session 1,274 specimens were collected and 95.6% [CI95% (92.5-97.7)] of the *Anoph-*

TABLE I

Distribution and human biting rates (HBR) of *Anopheles* species collected in Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana, using human landing catches from December 2012 to February 2013 (session 1) and September to November 2013 (session 2)

Collection session	Species	Number (%)	Total hours of collection	HBR (number of bites/human/hour)
1	*An. sp*	12 (4.4%)	144	0.042
	An. braziliensis	1 (0.4%)	144	0.003
	An. darlingi	244 (89.0%)	144	0.847
	An. nuneztovari s.l.	12 (4.4%)	144	0.042
	An. triannulatus s.l.	5 (1.8%)	144	0.017
	Total	274 (100%)	144	0.951
2	*An. sp*	79 (2.8%)	108	0.366
	An. braziliensis	2 (0.1%)	108	0.009
	An. darlingi	2,773 (96.9%)	108	12.838
	An. nuneztovari s.l.	7 (0.2%)	108	0.032
	Total	2,861 (100%)	108	13.245

TABLE II

Anopheles darlingi distribution and human biting rates (HBR) by collection time slots in Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana, using human landing catches from December 2012 to February 2013 (session 1) and September to November 2013 (session 2)

Collection session	Collection period	Number (%)	Total hours of collection	HBR (number of bites/human/hour)
1	18:30-20:30	76 (31.2%)	46	0.264
	20:30-22:30	124 (50.8%)	46	0.430
	05:00-07:00	44 (18.0%)	46	0.153
	Total	244 (100%)	144	0.847
2	18:30-20:30	934 (33.7%)	36	4.324
	20:30-22:30	892 (32.2%)	36	4.130
	05:00-07:00	947 (34.1%)	36	4.384
	Total	2,773 (100%)	108	12.838

eles mosquitoes were identified as belonging to four species. *An. darlingi* was the predominant species [89.0%, CI95% (84.7-92.5)] followed by *An. nuneztovari sl* [4.4%, CI95% (2.3-7.5)], *An. triannulatus sl* [1.8%, CI95% (0.6-4.2)] and *An. braziliensis* [0.4%, CI95% (0.0-2.0)]. During session 2, 2,861 *Anopheles* mosquitoes were collected and 97.2% [CI95% (96.6-97.8)] were identified as belonging to three species. *An. darlingi* was again the predominant species [96.9%, CI95% (96.2-97.5)], followed by *An. nuneztovari sl* [0.2%, CI95% (0.1-0.5)] and *An. braziliensis* [0.1%, CI95% (0.0-0.2)]. The difference in the distribution of *Anopheles* species between sessions 1 and 2 was statistically significant ($p < 0.0001$, Chi-square test). Regarding HBR, *An. darlingi* HBR was significantly higher than for other *Anopheles* species in both sessions ($p < 0.0001$, Fisher's exact test). The HBR for *An. darlingi* was significantly higher during session 2 than during session 1 ($p < 0.0001$, Fisher's exact test).

An. darlingi distribution and HBR by collection time - The distribution of *An. darlingi* by number and HBR according to the collection time and session are detailed in Table II. The distribution of *An. darlingi* density per collection time (Fig. 2) was significantly different between session 1 and 2 ($p < 0.001$, Chi-square test). There was no difference between the percentages of *An. darlingi* collected regarding the time slots ($p = 0.71$, Chi-square test for trend) for session 1; however, there was a significant difference between the percentages of *An. darlingi* regarding the collection time in session 2 (p

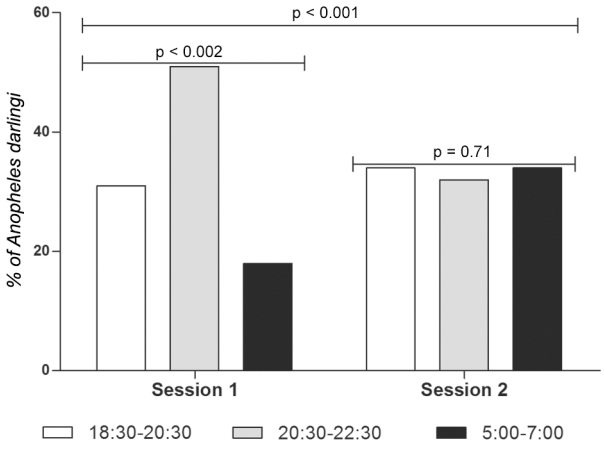


Fig. 2: percentage of *Anopheles darlingi* by collection time slot in Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana, December 2012 to February 2013 (session 1) and September to November 2013 (session 2).

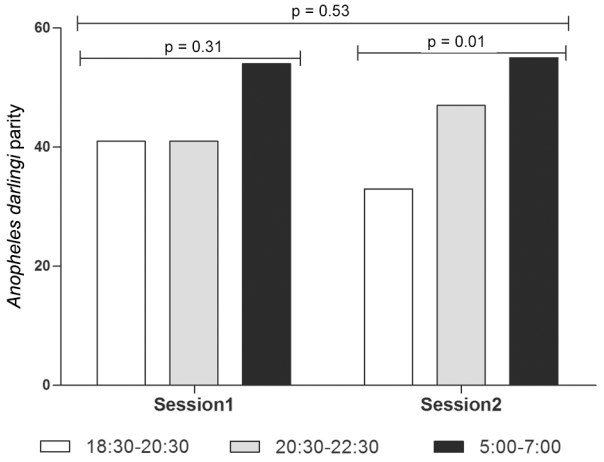


Fig. 3: dynamics in *Anopheles darlingi* parity in Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana, December 2012 to February 2013 (session 1) and September to November 2013 (session 2).

= 0.002, Chi-square test for trend). The percentage of *An. darlingi* [50.8%, CI95% (44.4-57.3)] caught between 20:30 and 22:30 was significantly higher than those caught between 18:30 and 20:30 [31.2%, CI95% (25.4-37.4)] and between 05:00 and 7:00 [18.0%, CI95% (13.4-23.4)] respectively; $p < 0.0001$, Fisher's exact test.

An. darlingi infection rate, entomological inoculation rate and parity - None of the *Anopheles* mosquitoes collected during either session was infected with *P. falciparum*, and *An. darlingi* was the only species found infected with *P. vivax* during session 1, with an infection rate (IR) of 7.8% [n = 19/244, CI95% (4.8-11.9)]. There was no difference IR of *An. darlingi* with regard to the collection time ($p = 0.81$, Chi-square test for trend). From 18:30 to 20:30, *An. darlingi* IR was 6.6%, CI95% (2.2-14.7); from 20:30 to 22:30, it was 8.9%, CI95% (4.5-15.3); and from 05:00 to 07:00, it was 6.8%, CI95% (1.4-18.7). A global EIR of 0.07 infective bites per person per hour was obtained for *An. darlingi* during session 1. Considering that people were bitten during six hours per night (being under bednets the rest of the night), to estimate the level of malaria transmission during the high transmission risk period, a global three-months EIR was calculated, resulting in 35.7 infective bites per person per three months [CI95% (25.0-49.4)]. However, none of the mosquitoes collected in session 2 was infected with *P. vivax*.

The parity per collection time obtained for a total of 315 *An. darlingi* females (106 and 209, respectively, for sessions 1 and 2) are presented in Fig. 3 and Table III.

There was no difference between the distributions of *An. darlingi* parity with regard to the collection time in session 1 and 2 ($p = 0.53$, Chi-square test), and during session 1, there was no difference in *An. darlingi* parity according to the time slot of collection ($p = 0.31$, Chi-square test for trend). However, during session 2, there was a significant difference in *An. darlingi* parity between the time slot of collection ($p = 0.01$, Chi-square test for trend). The

TABLE III

Anopheles darlingi parity by collection time slot in Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana, using human landing catches from December 2012 to February 2013 (session 1) and September to November 2013 (session 2)

Session	Collection period	Number	Parous	Non parous	Undetermined	Parity (CI95%)
1	18:30-20:30	76	20	29	0	40.8 (27.0-55.8)
	20:30-22:30	124	12	17	0	41.4 (23.5-61.1)
	05:00-07:00	44	15	13	0	53.6 (33.9-72.5)
	Total	244	47	59	0	44.3 (34.9-53.8)
2	18:30-20:30	934	21	43	2	32.8 (21.6-45.7)
	20:30-22:30	892	33	37	2	47.1 (35.1-59.4)
	05:00-07:00	947	41	34	1	54.7 (42.8-66.2)
	Total	2,773	95	114	5	45.5 (38.6-52.5)

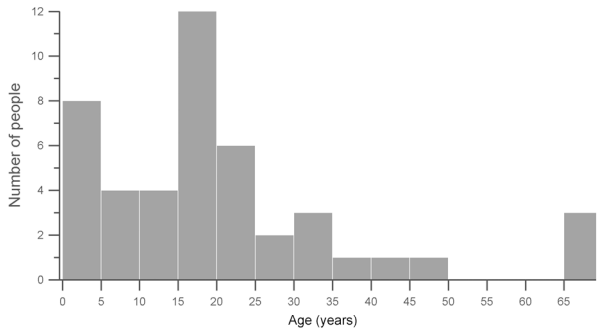


Fig. 4: age distribution of inhabitants in Blondin village.

An. darlingi parity assessed from 05:00 to 07:00 [54.7%, CI95% (42.7-66.2)] was significantly higher (p = 0.01, Fisher's exact test) than the *An. darlingi* parity assessed from 18:30 to 20:30 [32.8%, CI95% (21.6-45.7)].

Survey interview - Among 60 inhabitants in Blondin village, 46 were questioned - 26 males (56.5%) and 20 females (43.5%) whose median age was 19 years (min = six months, max = 71 years). The distribution of Blondin village residents by age class (period of five years) is represented in Fig. 4. The majority of the participants (93.5%, n = 43) have lived in the village since its creation or from birth. The rest of the participants (6.5%, n = 3) arrived in the village the year preceding the study.

In total, 95.7% (n = 44) of the respondents acknowledged using LLINs each night when they went to bed. The mean hour at which participants went to bed was 21:14 [CI95% (20:53-21:35)] and the mean hour at which they arose was 6:44 [CI95% (6:26-7:02)]. Only three participants (6.5%) used repellents for personal protection against mosquito bites.

Distributions of awake and sleeping people by time slot and the cumulative percentage of people exposed to *An. darlingi* bites are shown in Fig. 5.

At the time of survey, 52.2% (n = 24) and 37.0% (n = 17) of the participants acknowledged having contracted malaria at least once during 2012-2013 study period. As shown in Fig. 6, the median bedtime hour (22:00, 25% percentile of 21:00 and 75% percentile of 23:00) for people who suffered more than two malaria episodes during 2012 and 2013 was significantly higher than the median (21:00, 25% percentile at 20:00 and 75% percentile at 22:00) in people who had no or only one malaria episode (p = 0.03, Mann Whitney test).

Among the people who suffered from malaria episodes in 2012 (n = 24), 12.5% (n = 3) were below five years old and 87.5% (n = 21) were above five years old. Participants who had malaria in 2013 represented 37.0% (n = 17). Of these, 5.9% (n = 1) were below five years old and 94.1% (n = 16) were above five years old. Fig. 7 shows the variation in malaria episodes for the years 2012 and 2013 according to participants. During 2012, malaria episodes were more numerous from January to March and then from October to December. In 2013, malaria episodes essentially occurred from January to April and in December.

DISCUSSION

The current study was designed to unravel malaria transmission mechanisms and to determine whether the currently implemented malaria vector control strategies are tailored to the behaviour of the main vectors

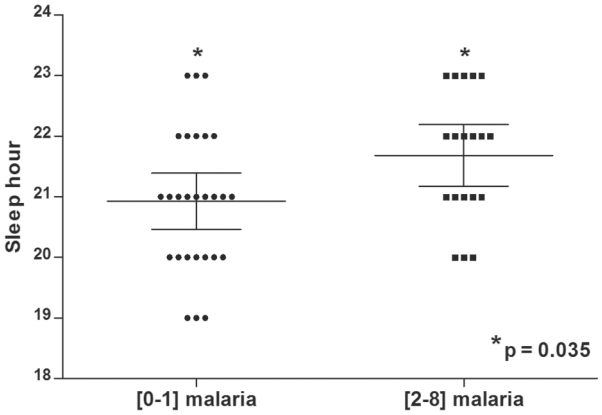


Fig. 6: comparison of hours at which people retire between those who suffered (0-1) and (2-8) malaria episodes during 2012 and 2013, respectively, in Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana.

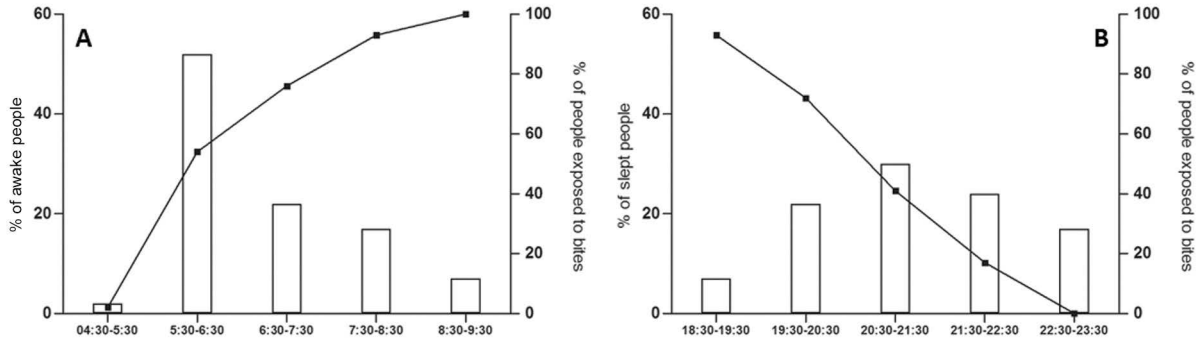


Fig. 5: (A) percentages of people awake (bars) and exposed to *Anopheles darlingi* bites (curves) by time slot; (B) percentages of people sleeping (bars) and exposed to *An. darlingi* bites (curves) by time slot.

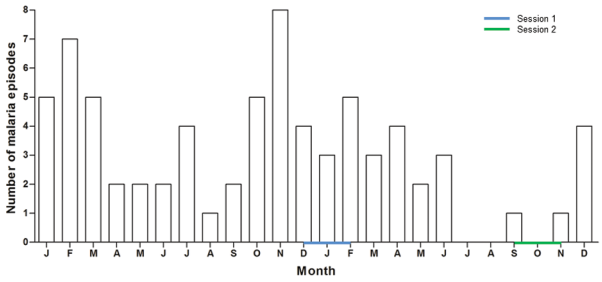


Fig. 7: evolution of malaria episodes by participants during the years 2012 and 2013 in Blondin village, Saint-Georges de l'Oyapock municipality, French Guiana.

and human inhabitants. The study was carried out in Blondin Village, in the municipality of Saint-Georges de l'Oyapock, one of several areas in French Guiana where residual malaria transmission still challenges the control programme instituted by health authorities. The data collected in this study indicate that *An. darlingi* is predominant of the four anopheline species present. This observation is in accord with the findings of other studies carried out in the territory (Girod et al. 2008, 2011, Hiwat et al. 2009, Fouque et al. 2010, Dusfour et al. 2012). *An. darlingi* was significantly more abundant during session 2, which corresponded to the long dry season in French Guiana. Similar situations have already been observed in other areas in Amazonia (Gil et al. 2003). However, the peak abundance of this species has been more frequently reported in the rainy season in French Guiana (Magris et al. 2007, Girod et al. 2008, 2011, Hiwat et al. 2009, Fouque et al. 2010) as well as in other areas (da Silva-Vasconcelos et al. 2002, de Barros & Honorio 2007, Moreno et al. 2007). Because sampling during session 2 started in the middle of the long dry season, the observed abundance can be attributed to the availability of large residual water collections left behind from precipitation during the preceding long rainy season and/or floods as the river progressively retreated to its lowest level. These breeding sites result in mass production of adult mosquitoes at the beginning of the long dry season, generating high densities of adult mosquitoes during the second part of the long dry season. Sampling performed during session 1 coincided with the short rainy season just after the long dry season. The end of the long dry season is characterised by a decrease in flooding of the Oyapock River which, together with the limited rainfall, resulted in few breeding sites and, consequently, the low number of *An. darlingi* collected.

To investigate the role of anopheline species in malaria transmission in the village, collected mosquitoes were screened for both *P. vivax* and *P. falciparum* infection. *An. darlingi* collected during session 1 was the only species infected with *P. vivax*. The involvement of *An. darlingi* in malaria transmission is well documented in South America, especially in French Guiana (Girod et al. 2008, 2011, Hiwat et al. 2009, Fouque et al. 2010). Unexpectedly, no specimens from session 2 were infected with *Plasmodium* species. One possible explanation is that interview responses indicated that malaria cases reached zero prior to mosquito collection during the second session. In contrast, session 1 followed a period during which the number of reported malaria cases was much more significant, which may explain the observed infection rates. In the current study, the global three-month EIR estimating the level of malaria transmission during the high-risk period was calculated during session 1 and based on six hours of mosquito bites exposures per night. This three-month EIR corresponds to 35.7 infective bites/person/three months [CI95% (25.0-49.4)], which is high compared to annual EIR for other parts of French Guiana such as the Upper-Maroni area with a range of 14.4 to 27.4 infective bites/person/year (Girod et al. 2008), Apatou with 5.7 infective bites/person/year, Regina with 8.7 infective bites/person/year (Girod et al. 2011), Loca with 10.0 infective bites/person/year and Twenke with 5.0 infective bites/person/year (Fouque et al. 2010). Although the time units used to calculate the EIR in these studies differs, the present data clearly suggest that Blondin village is a high-risk area for contracting malaria.

The behaviour of both *An. darlingi* and humans in Blondin village were studied to gather baseline data to assist in realigning current malaria control strategies. The biting behaviour of *An. darlingi* reached a peak from 20:30-22:30 in session 1; however, during session 2, there was no statistically significant difference between the percentages of *An. darlingi* collected during the three time slots. First, this can be attributed to the high number of *An. darlingi* landing simultaneously on humans' legs, generating a saturation effect during the collections. Second, it has already been reported that the biting behaviour of *An. darlingi* can differ based on the season (Charlwood 1996, Voorham 2002, Leon et al. 2003, Zimmerman et al. 2013). The evening peak biting time in session 1 corresponded to the village residents' mean bedtime; however, prior to this time, biting activity (which began as soon as 18:30) progressively increased while the majority of the people were still awake and exposed to mosquito bites. Similarly, early in the morning, although the biting rate is low, most of the village inhabitants are out of bed and exposed to *An. darlingi* bites. Moreover, parity being more important in the morning, inhabitants are exposed to the bites of older females, increasing the likelihood of malaria transmission. Finally, considering the number of malaria cases reported by residents and their sleeping hours, it is clear that people not protected by bednets at the beginning of the night and early in the morning are at high risk of contracting malaria.

Inhabitants exposed to infective mosquito bites during these periods should adopt additional personal protection measures such as cutaneous repellents and mosquito coils and should wear clothing - if possible, impregnated with insecticide - that covers the body. Interestingly, most of the inhabitants did not use any of these personal protective measures.

The structure of houses in this area might also bear some responsibility in malaria transmission. The village's wooden-walled houses had gaps that may allow mosquitoes to move in and out. Coupled with the lack

of ceilings these structures provide favourable mosquito environments and contribute to the occupants' risk of contracting malaria. In this situation, the use of LLINs and IRS are essential to protect inhabitants - but not sufficient. French Guiana is truly in urgent need of study regarding the effectiveness of IRS and the indoor resting behaviour of *An. darlingi*. In this work, IRS was carried out in September, before the peak of transmission. Nevertheless the data showed a peak in the number of cases in October. Due to location of the houses relative to potential breeding sites and the evident exophilic and exophagic behaviour of *An. darlingi*, it would be interesting to develop complementary strategies to protect people. For example, using "pull and push" or "lure and kill" approaches employing attractant-baited traps and repellents or toxic compounds or screens impregnated with insecticides placed between the resting and breeding sites and the houses could constitute a realistic option considering the size and configuration of the village (Burkot et al. 2013, Matowo et al. 2013, Menger et al. 2015).

Malaria vector control strategies should be aligned with the behaviours of both the malaria vectors and the human population to be protected. *An. darlingi*, the dominant of four *Anopheles* species identified in an area of residual malaria transmission in French Guiana, has been incriminated as the main vector of *P. vivax*. In the studied village, inhabitants' outdoor activities just after dusk and at dawn favour exposure to *An. darlingi* infective bites. Consequently, even though LLINs coverage in the village exceeds the Roll Back Malaria target of 80% and IRS are applied just before the peak transmission period, these control strategies do not provide complete protection. This study recommends the use of individual protective measures and also highlights the need to test innovative collective measures to protect people against outdoor bites from *Anopheles*.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the inhabitants of Blondin village, for their hospitality.

REFERENCES

Ardillon V, Carvalho L, Prince C, Abboud P, Djossou F. Bilans 2013 et 2014 de la situation du paludisme en Guyane. BVS. 2015; 1: 16-20.

Birley MH, Charlewood JD. Sporozoite rate and malaria prevalence. Parasitol Today. 1987; 3(8): 231-2.

Burkot TR, Russell TL, Reimer LJ, Bugoro H, Beebe NW, Cooper RD, et al. Barrier screens: a method to sample blood-fed and host-seeking exophilic mosquitoes. Malar J. 2013; 12: 49.

Carme B, Ardillon V, Girod R, Grenier C, Joubert M, Djossou F, et al. Update on the epidemiology of malaria in French Guiana. Med Trop. 2009; 69(1): 19-25.

Charlwood JD. Biological variation in *Anopheles darlingi* root. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(4): 391-8.

CIRE AG. Surveillance épidémiologique: du paludisme en Guyane. Institut de Veille Sanitaire. 2006. Available from: http://www.invs.sante.fr/publications/2006/paludisme_guyane/paludisme_guyane.pdf.

da Silva-Vasconcelos A, Kató MYN, Mourão EN, de Souza RTL, Lacerda RNL, Sibajev A, et al. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil, from 1996 to 1998. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(2): 151-61.

de Barros FSM, Honorio NA. Man biting rate seasonal variation of malaria vectors in Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(3): 299-302.

Detinova TS. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. Monogr Ser World Health Organ. 1962; 47: 13-191.

Dusfour I, Carinci R, Gaborit P, Issaly J, Girod R. Evaluation of four methods for collecting malaria vectors in French Guiana. J Econ Entomol. 2010; 103(3): 973-6.

Dusfour I, Carinci R, Issaly J, Gaborit P, Girod R. A survey of adult anophelines in French Guiana: enhanced descriptions of species distribution and biting responses. J Vector Ecol. 2013; 38(2): 203-9.

Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R. Incrimination of *Anopheles* (*Anopheles*) *intermedius* Peryassú, *An*. (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón, *An*. (*Nys*.) *oswaldoi* Peryassú as natural vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(3): 429-32.

Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1981; 13: 1-81.

Floch H, Abonnenc E. Anophèles de la Guyane française. Archs Inst Past Guy. 1951; 236: 1-92.

Floch H. Antimalarial campaign in French Guiana. I. Anophelism. Riv Malariol. 1955; 34(1-3): 57-65.

Forattini OP. Entomologia médica: Parte geral, Diptera, Anophelini. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1962.

Fouque F, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Girod R. Annual variations in the number of malaria cases related to two different patterns of *Anopheles darlingi* transmission potential in the Maroni area of French Guiana. Malar J. 2010; 9: 80.

Gil LH, Alves FP, Zieler H, Salcedo JM, Durlacher RR, Cunha RP, et al. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. J Med Entomol. 2003; 40(5): 636-41.

Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Fouque F. *Anopheles darlingi* bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(7): 702-10.

Girod R, Roux E, Berger F, Stefani A, Gaborit P, Carinci R, et al. Unravelling the relationships between *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) densities, environmental factors and malaria incidence: understanding the variable patterns of malarial transmission in French Guiana (South America). Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105(2): 107-22.

Hay SI, Rogers DJ, Toomer JF, Snow RW. Annual *Plasmodium falciparum* entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, Internet access and review. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94(2): 113-27.

Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* root with respect to vector importance: a review. Parasite Vectors. 2011; 4: 177.

Hiwat H, de Rijk M, Andriessen R, Koenraadt CJ, Takken W. Evaluation of methods for sampling the malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae) in Suriname and the relation with its biting behavior. J Med Entomol. 2011; 48(5): 1039-46.

Hiwat H, Issaly J, Gaborit P, Somai A, Samjhawan A, Sardjoe P, et al. Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; 104(3): 207-13.

Laporta GZ, Linton YM, Wilkerson RC, Bergo ES, Nagaki SS, Sant'Ana DC, et al. Malaria vectors in South America: current and future scenarios. Parasite Vectors. 2015; 8: 426.

Leon C, Valle J, Naupay R, Tineo E, Rosas A, Palomino R. Comportamiento estacional del *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* root 1926 en localides de Loreto y Madre de Dios, Peru, 1999-2000. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2003; 36: 75-80.

Magris M, Rubio-Palis Y, Menares C, Villegas L. Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(3): 303-11.

Mansotte F, Ravachol F, Carlisi R, Caudal J, Pinchon S, Maison D. Operation to promote use of long-lasting insecticidal nets (LLIN) in French Guiana in 2006: design, implementation and results. Med Trop. 2010; 70(3): 249-54.

Matowo NS, Moore J, Mapua S, Madumla EP, Moshi IR, Kaindoa EW, et al. Using a new odour-baited device to explore options for luring and killing outdoor-biting malaria vectors: a report on design and field evaluation of the Mosquito Landing Box. Parasite Vectors. 2013; 6: 137.

Menger DJ, Omusula P, Holdinga M, Homan T, Carreira AS, Vandendaele P, et al. Field evaluation of a push-pull system to reduce malaria transmission. PLoS ONE. 2015; 10(4): e0123415.

Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. Med Vet Entomol. 2007; 21(4): 339-49.

Moreno M, Saavedra MP, Bickersmith SA, Lainhart W, Tong C, Alava F, et al. Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri-Iquitos region of Amazonian Peru. Malar J. 2015; 14: 290.

Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109(5): 525-533.

Pajot FX, Le Pont F, Molez JF, Degallier N. Agressivité d'*Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root 1926 (Diptera: Culicidae) en Guyane Française. Cah ORSTOM, Sér Entomol Méd Parasitol. 1977; 15: 15-22.

Pommier de Santi V, Dia A, Adde A, Hyvert G, Galant J, Mazevet M, et al. Malaria in French Guiana linked to illegal gold mining. Emerg Infect Dis. 2016a; 22(2): 344-6.

Pommier de Santi V, Djossou F, Barthes N, Bogreau H, Hyvert G, Nguyen C, et al. Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2016b; 22(5): 903-6.

Pommier de Santi V, Girod R, Mura M, Dia A, Briolant S, Djossou F, et al. Epidemiological and entomological studies of a malaria outbreak among French armed forces deployed at illegal gold mining sites reveal new aspects of the disease's transmission in French Guiana. Malar J. 2016c; 15: 35.

Roberts DR, Manguin S, Rejmankova E, Andre R, Harbach RE, Vanzie E, et al. Spatial distribution of adult *Anopheles darlingi* and *Anopheles albimanus* in relation to riparian habitats in Belize, Central America. J Vector Ecol. 2002; 27(1): 21-30.

Rozendaal JA. Biting and resting behavior of *Anopheles darlingi* in the Suriname rainforest. J Am Mosq Control Assoc. 1989; 5(3): 351-8.

Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. Parasite Vectors. 2010; 3: 72.

Smith DL, Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Standardizing estimates of the *Plasmodium falciparum* parasite rate. Malar J. 2007; 6: 131.

Smith DL, McKenzie FE. Statics and dynamics of malaria infection in *Anopheles* mosquitoes. Malar J. 2004; 3: 13.

Smith DL, Smith TA, Hay SI. Measuring malaria for elimination. In: Feachem RGA, Phillips AA, Targett GA, editors. Shrinking the malaria map. A prospectus on malaria elimination. San Francisco: The Global Health Group; 2009. p. 108-26.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993; 61(2): 315-20.

Talaga S, Dejean A, Carinci R, Gaborit P, Dusfour I, Girod R. Updated checklist of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of French Guiana. J Med Entomol. 2015; 52(5): 770-82.

Vezenegho SB, Adde A, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Pommier de Santi V, et al. Mosquito magnet(R) liberty plus trap baited with octenol confirmed best candidate for *Anopheles* surveillance and proved promising in predicting risk of malaria transmission in French Guiana. Malar J. 2014; 13: 384.

Vezenegho SB, Carinci R, Gaborit P, Issaly J, Dusfour I, Briolant S, et al. *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) dynamics in relation to meteorological data in a cattle farm located in the coastal region of French Guiana: advantage of mosquito magnet trap. Environ Entomol. 2015; 44(3): 454-62.

Voorham J. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. Rev Saude Publica. 2002; 36(1): 75-80.

WHO - World Health Organization. Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and techniques. Geneva: Division of Malaria and Other Parasitic Diseases; 1975.

Zimmerman RH, Lounibos LP, Nishimura N, Galardo AK, Galardo CD, Arruda ME. Nightly biting cycles of malaria vectors in a heterogeneous transmission area of eastern Amazonian Brazil. Malar J. 2013; 12: 262.