

Surveillance de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine par le test moléculaire à São Tomé et Príncipe.

R. Tahar (1), J. Djaman (2), C. Ferreira (3) & L. Basco (1)

(1) Unité de recherche 77. Paludologie afro-tropicale, Institut de recherche pour le développement (IRD) et Organisation de coordination pour la lutte contre les endémies en Afrique centrale (OCEAC), BP 288, Yaoundé, Cameroun. Tél. : (237) 223 22 32, fax : (237) 223 00 61, e-mail : lkbasco@yahoo.fr

(2) Laboratoire de biochimie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan. Laboratoire de pharmacodynamie-biochimique, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan, Côte d'Ivoire.

(3) Centro nacional de endemias, Ministério de saúde, Caixa Postal 218, São Tomé, República Democrática de São Tomé e Príncipe.

Manuscrit n° 2941. "Thérapeutique". Reçu le 6 avril 2006. Accepté le 5 septembre 2006.

Summary: Molecular surveillance of sulfadoxine-pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* in São Tomé and Príncipe.

The prevalence of point mutations associated with resistance to sulfadoxine and pyrimethamine was determined by sequencing the fragments of genes encoding dihydropteroate synthase (dhps) and dihydrofolate reductase (dhfr), respectively, in 59 isolates collected during 2002-2003 in São Tomé and Príncipe to develop an early warning system of drug-resistant *P. falciparum*. Almost all isolates (57 of 59, 97%) were dhfr mutant. The majority of the isolates (43 of 59, 73%; 16 with mixed alleles) carried the triple dhfr mutations (Ile-51/Arg-59/Asn-108). The presence of dhps mutations were only limited to positions 436 and 437. The pure mutant codon Gly-437 was present in 39 out of 59 isolates (66%), in association with Ser-436 (n=34) or Ala-436 (n=5). Mixed isolates displayed different combinations of 436 (Ser, Ala ou Phe) and 437 (Gly, with or without Ala) alleles. None of the isolates carried mutant 540, 581 or 613 codons. A total of 39 isolates (66%) were characterized as quadruple mutants (i.e. triple dhfr mutations + Gly-437 dhps mutant allele). Monitoring the possible emergence of isolates carrying multiple dhfr and dhps mutations, in particular codon Glu-540, may be used as an early warning system which indicates a decrease in sulfadoxine-pyrimethamine efficacy.

Résumé:

La prévalence des mutations ponctuelles associées à la résistance à la sulfadoxine et à la pyriméthamine a été déterminée par séquençage des fragments de gènes codant pour la dihydroptéroate synthase (dhps) et la dihydrofolate réductase (dhfr), respectivement, chez 59 isolats recueillis en 2002-2003 à São Tomé et Príncipe dans un but d'installer un système d'alerte précoce de la chimiorésistance de *P. falciparum*. La quasi-totalité des isolats (57 sur 59, soit 97 %) étaient mutés en dhfr. La majorité des isolats (43 sur 59, soit 73 %, dont 16 avec des codons mixtes) portaient les triples mutations (Ile-51/Arg-59/Asn-108) sur le gène dhfr. L'identification des mutations sur le gène dhps n'a été limitée qu'aux codons 436 et 437. Le codon muté Gly-437 était présent chez 39 isolats sur 59 (66 %), en association avec les codons Ser-436 (n = 34) ou Ala-436 (n = 5). Les isolats mixtes présentaient des combinaisons différentes des codons en positions 436 (Ser, Ala ou Phe) et 437 (Gly, avec ou sans Ala). Aucun isolat ne portait des codons mutés en positions 540, 581 et 613. Au total, 39 isolats (66 %) ont été caractérisés comme des quadruples mutants (c'est-à-dire, triples mutations en dhfr + Gly-437 allèle mutant en dhps). La surveillance d'une éventuelle émergence des isolats portant de multiples mutations sur les gènes dhfr et dhps, en particulier le codon Glu-540, pourrait servir d'un système d'alarme précoce pour signaler une diminution de l'efficacité de la sulfadoxine-pyriméthamine.

Introduction

La République démocratique de São Tomé et Príncipe est le plus petit des pays africains. Cet archipel est composé de deux îles principales (São Tomé, 859 km², capitale São Tomé; Príncipe, 142 km², capitale Santo Antonio) et quelques îlots situés à environ 220 km au large des côtes gabonaises. La population était de 158 000 habitants en 2002, la plupart vivant sur l'île de São Tomé.

L'épidémiologie du paludisme insulaire a été décrite dans plusieurs études antérieures (11, 12, 18, 20, 21). La transmission, qui concerne les quatre espèces de *Plasmodium* spécifiques de l'homme, est pérenne, assurée par quatre espèces d'anophèles : *Anopheles gambiae*, *An. funestus*, *An. paludis* et *An. pharoensis* (17). Le paludisme dû à *Plasmodium falciparum* prédomine. Le taux d'inoculation entomologique varie entre 1,36 (sur l'île de Príncipe) et 12 (sur l'île de São Tomé) piqûres infestantes par homme et par an (7, 19). L'éradication

Plasmodium falciparum
malaria
chloroquine
antifolate drug
drug resistance
dihydrofolate reductase
dihydropteroate synthase
sulfadoxine-pyrimethamine
São Tomé and Príncipe
Sub-Saharan Africa

Plasmodium falciparum
paludisme
chloroquine
antifoliniques
chimiorésistance
dihydrofolate réductase
dihydroptéroate synthase
sulfadoxine-pyrimethamine
São Tomé et Príncipe
Afrique intertropicale

avait été presque atteinte sur les îles, essentiellement par les pulvérisations domiciliaires de dichloro-diphényl-trichloro-éthane (DDT), vers la fin des années 70, mais l'arrêt brutal du programme de lutte antivectorielle a entraîné une épidémie puis l'installation d'une transmission stable dans les années 80. En même temps, la lutte contre le paludisme est devenue plus compliquée, suite à l'émergence des souches chloroquinorésistantes de *P. falciparum*, comme dans beaucoup de pays voisins (2, 10, 11, 12).

Malgré la présence des parasites résistants, la chloroquine est restée le médicament de première intention pour le traitement du paludisme non compliqué dû à *P. falciparum* à São Tomé et Príncipe pendant longtemps (17). La sulfadoxine-pyriméthamine était administrée en deuxième intention. La quinine était réservée pour le traitement des infections polychimiorésistantes, ainsi que pour le paludisme grave et compliqué. La chloroquine était également préconisée pour la prophylaxie chez les femmes enceintes.

D'après les résultats d'une étude clinique menée en 2000, il a été rapporté que jusqu'à 20 % des malades traités à la sulfadoxine-pyriméthamine n'avaient pas été guéris (données non publiées, C. FERREIRA). Devant cette situation alarmante, il était important de suivre l'évolution de la chimiorésistance du paludisme afin de pouvoir adapter le schéma thérapeutique adéquat à l'échelle du pays. L'approche moléculaire était adaptée dans un petit pays comme São Tomé et Príncipe : chaque île pouvait être considérée comme un site sentinelle. Dans une première étape de mise en place d'un système de surveillance de la chimiorésistance, nous avons collecté des échantillons de sang dans les deux îles de São Tomé et Príncipe et analysé les séquences des gènes dihydrofolate réductase (*dhfr*) et dihydroptéroate synthase (*dhps*), dont les produits d'expression, les enzymes DHFR et DHPS, sont des cibles moléculaires de la pyriméthamine et de la sulfadoxine, respectivement. L'objectif de cette étude était de décrire l'épidémiologie de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine, suivie dans le temps, à l'aide d'une technique faisant appel à la biologie moléculaire.

Patients et méthodes

Une campagne de dépistage dans les écoles a été organisée dans les deux îles de São Tomé et Príncipe par le ministère de la santé publique, entre novembre 2002 et janvier 2003, approuvée par le Comité d'éthique national. Les écoliers âgés de 5 à 14 ans (moyenne 8,4 ans; 37 garçons et 22 filles) ont été recrutés si la goutte épaisse était positive à *P. falciparum*. La moyenne géométrique de la densité parasitaire était de 4 550 formes asexuées/ μ l de sang (extrêmes : 1 200 à 76 600 formes asexuées/ μ l de sang). Les écoliers ont été traités à la chloroquine (10 mg/kg de poids corporel à J₀ et J₁ et 5 mg/kg à J₂), selon la politique nationale d'utilisation des antipaludiques en vigueur lors de l'étude.

Une goutte de sang capillaire a été prélevée au bout du doigt des enfants impaludés. Le sang a été immédiatement recueilli sur le papier-filtre Isocode Stix® (Schleicher & Schuell, Ecquevilly, France), séché et conservé à température ambiante. L'ADN du parasite, contaminé par l'ADN humain provenant des leucocytes, a été extrait du papier-filtre par la méthode décrite par HENNING *et al.* (8). Un morceau de papier-filtre prédécoupé a été placé dans un microtube de 0,5 ml, auquel de l'eau distillée (500 μ l) a été ajoutée pour rinçage. L'eau usée a été enlevée et 75 μ l d'eau distillée ont été ajoutés au microtube. Le papier-filtre a été chauffé à 100 °C durant 20 minutes puis agité vigoureusement.

Le surnageant (10 μ l par réaction) contenant l'ADN a servi de matrice pour amplifier les gènes *dhfr* et *dhps* par PCR, selon les protocoles mis au point dans nos études antérieures (3, 4). Les produits de PCR ont été séquencés par le séquenceur automatisé (ABI System, Perkin Elmers, Les Ulis, France). Les amorces utilisées pour amplifier les fragments de gènes permettent de déterminer les codons 51, 59, 108 et 164 du gène *dhfr* et les codons 436, 437, 540, 581 et 613 du gène *dhps*. Comme la mutation sur le codon 16 du gène *dhfr* (Ala \rightarrow Val) n'apparaît qu'en association avec la mutation Thr-108, la séquence du codon 16 n'a pas été recherchée en l'absence du codon muté Thr-108. Les haplotypes sauvages de *dhfr* et de *dhps* sont définis, respectivement, par Asn-51/Cys-59/Ser-108/Ile-164 et Ser-436/Ala-437/Lys-540/Ala-581/Ala-613. Les codons mutés correspondant sont Ile-51, Arg-59, Asn- ou Thr-108 et Leu-164 pour le gène *dhfr* et Ala- ou Phe-436, Gly-437, Glu-540, Gly-581 et Ser- ou Thr-613 pour le gène *dhps*. Un « codon pur » ou un « mutant pur » est défini par la présence d'une seule base nucléotidique des deux (ou trois) bases alternatives possibles sur un codon donné, indiquant l'homogénéité des populations de parasites constituant un isolat donné. Un « codon mixte » ou un « isolat mixte » signifie la présence de deux bases alternatives, sauvage et mutante, en même temps et indique l'hétérogénéité génétique des populations parasitaires dans un isolat donné. À São Tomé et Príncipe, le génotypage des isolats provenant directement des habitants majoritairement asymptomatiques a démontré la présence, en moyenne, de 2,4 populations distinctes de parasites par isolat (14).

Résultats

Les gènes *dhfr* et *dhps* ont été amplifiés par PCR avec succès à partir de tous les échantillons. Une ou plusieurs mutations sur le gène *dhfr* ont été observées dans 57/59 des isolats testés (97 %) (tableaux I et II).

Parmi ces mutants, 13 (22 %) étaient des « doubles mutants purs » portant Ile-51 et Asn-108 sur le gène *dhfr* et 27 (46 %) étaient des « triples mutants purs » portant les codons mutés Ile-51, Arg-59 et Asn-108. Parmi les isolats mixtes, la majorité

Tableau I.

Séquences des codons clés des gènes <i>dhfr</i> et <i>dhps</i> chez les isolats de <i>Plasmodium falciparum</i> à São Tomé et Príncipe.					
Sequences of the key codons of <i>dhfr</i> and <i>dhps</i> genes of <i>Plasmodium falciparum</i> isolates in São Tomé and Príncipe.					
nombre d'isolats	<i>dhfr</i>			<i>dhps</i>	
	51	59	108	436	437
	51	59	108	436	437
1	Asn	Cys	Ser	Ala	Ala
1	Asn	Cys	Ser	Ser	Gly
3	Ile	Cys	Asn	Ala	Ala
7	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly
2	Ile	Cys	Asn	Ala	Gly
1	Ile	Cys	Asn	Ser/Ala	Gly
4	Ile	Arg	Asn	Ala	Ala
17	Ile	Arg	Asn	Ser	Gly
2	Ile	Arg	Asn	Ala	Gly
1	Ile	Arg	Asn	Ser/Ala	Gly
3	Ile	Arg	Asn	Ser/Ala	Ala/Gly
1	Asn	Cys	Ser/Asn	Ser	Gly
8	Ile	Cys/Arg	Asn	Ser	Gly
1	Ile	Cys/Arg	Asn	Ala	Gly
1	Ile	Cys/Arg	Asn	Ser/Ala	Gly
1	Ile	Cys/Arg	Asn	Ala	Ala/Gly
3	Ile	Cys/Arg	Asn	Ser/Ala	Ala/Gly
1	Ile	Cys/Arg	Asn	Ser/Phe	Ala/Gly
1	Asn/Ile	Cys/Arg	Ser/Asn	Ser/Ala	Ala/Gly

Les codons mutés sont en gras. Les codons suivants étaient sauvages et invariables chez tous les 59 isolats : Ile-164 sur le gène *dhfr* et Lys-540, Ala-581 et Ala-613 sur le gène *dhps*.

Tableau II.

Comparaison des prévalences de mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps* chez les isolats de São Tomé et Príncipe.

Comparison of prevalences of *dhfr* and *dhps* mutations in isolates from São Tomé and Príncipe.

codons	2000		2002-2003	
	n = 78 pour <i>dhfr</i>	n = 73 pour <i>dhps</i>	(n = 59)	
DHFR				
Asn-51	6 (8 %)		3 (5 %)	
Ile-51	72 (92 %)		56 (95 %)	
Cys-59	35 (45 %)		16 (27 %)	
Arg-59	43 (55 %)		43 (73 %)	
Ser-108	4 (5 %)		2 (3 %)	
Asn-108	74 (95 %)		57 (97 %)	
Thr-108	0 (0 %)		0 (0 %)	
DHPS				
Ser-436	44 (60 %)		34 (58 %)	
Ala-436	18 (25 %)		24 (41 %)	
Phe-436	7 (10 %)		0 (0 %)	
Ala/Phe-436	4 (5 %)		1 (2 %)	
Ala-437	18 (25 %)		8 (14 %)	
Gly-437	55 (75 %)		51 (86 %)	
Lys-540	68 (93 %)		59 (100 %)	
Glu-540	5 (7 %)		0 (0 %)	
Ala-581	73 (100 %)		59 (100 %)	
Gly-581	0		0	
Ala-613	72 (99 %)		59 (100 %)	
Ser-613	1 (1 %)		0 (0 %)	
Thr-613	0		0 (0 %)	

Le nombre (pourcentage) d'isolats portant les allèles différents de *dhfr* et de *dhps*. Les codons mutés sont en gras. Les données antérieures sur les isolats collectés en 2000 à São Tomé et Príncipe ont été publiées par Cravo et al.(5).

(15 sur 17) était de doubles mutants avec des codons mutés purs Ile-51 et Asn-108 et codon mixte Cys-59 et Arg-59. Il est fort probable que ces isolats mixtes comportent au moins une population parasitaire caractérisée par les triples mutations Ile-51, Arg-59 et Asn-108 (il est aussi possible, mais moins probable d'avoir un mélange de doubles mutants portants Ile-51/Cys-59/Asn-108 et Ile-51/Arg-59/Ser-108, ou d'autres combinaisons de 2 codons mutés, le codon Ser-108 étant minoritaire et non détectable par le séquençage). Un isolat présentait des codons mixtes 51, 59 et 108. Un autre isolat portait les codons sauvages Asn-51 et Cys-59 et un codon mixte Ser-108 et Asn-108. Si l'on classe les isolats portants des allèles mixtes Ile-51/Cys- ou Arg-59/Asn-108 (n = 15) ou Asn- ou Ile-51/Cys- ou Arg-59/Ser- ou Asn-108 (n = 1) avec les isolats triple mutants, au total 43/59 (73 %) étaient des triple mutants en *dhfr*. Seuls 2/59 (3 %) étaient caractérisés comme porteurs des codons sauvages de *dhfr*. Tous les isolats portaient le codon sauvage Ile-164. Aucun isolat étudié ne portait le codon mutant alternatif Thr-108.

En ce qui concerne le gène *dhps*, 39/59 (66 %) avaient le codon muté pur Gly-437, associé, soit à un codon sauvage Ser-436 chez 34/59 (57,6 %), soit à un codon muté Ala-436 chez 5/59 (8,5 %). Les codons Ala-436 et Ala-437 étaient présents chez 8 isolats (14 %). Les autres 11 isolats étaient porteurs d'allèles mixtes au niveau des codons 436 et/ou 437, c'est-à-dire les codons mixtes Ser-436 + Ala-436 et/ou les codons mixtes Ala-437 + Gly-437. Un isolat mixte était caractérisé par la présence des codons Ser-436 et Phe-436 et des codons Ala-437 et Gly-437. Chez tous les isolats, les codons 540, 581 et 613 étaient sauvages (Lys-540, Ala-581 et Ala-613).

Les quadruples mutations, définies par la combinaison des codons mutés Ile-51/Arg-59/Asn-108 (souvent appelés les triples mutations) du gène *dhfr* et du codon muté Gly-437 du gène *dhps*, ont été retrouvées chez 39/59 (66 %), dont 19 avec des allèles mixtes en *dhfr* ou en *dhps*. Les quintuples mutations, définies par la présence du codon muté Glu-540 sur le gène *dhps* plus les quadruples mutations, n'ont pas été observées.

Discussion

Le travail présenté ici est fondé sur l'analyse des séquences de gènes *dhfr* et *dhps* chez les isolats de São Tomé et Príncipe. L'idéal aurait été de réaliser ces études moléculaires en parallèle avec l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la sulfadoxine-pyriméthamine pour laquelle nous ne disposons d'aucune donnée. À l'heure actuelle, une telle étude devient difficile à envisager, puisque les autorités sanitaires de São Tomé et Príncipe recommandent la combinaison artésunate-amodiaquine pour traiter tout accès palustre non compliqué à *P. falciparum*. Néanmoins, compte tenu du fait que la mise en oeuvre du changement de politique nationale d'utilisation des antipaludiques devrait être fondée sur des données scientifiques du niveau d'efficacité clinique de l'amodiaquine et de la sulfadoxine-pyriméthamine en monothérapie, il serait urgent de recommander la réalisation de ces recherches cliniques selon le protocole de l'OMS, avant de mettre en place un système de surveillance moléculaire. La sulfadoxine-pyriméthamine reste réservée pour le traitement présomptif intermittent chez les femmes enceintes. La surveillance de l'activité de la pyriméthamine et de la sulfadoxine par le test de chimiosensibilité *in vitro* nécessiterait la mobilisation de beaucoup de ressources en matériels et en formation de personnels et une standardisation du protocole. En outre, les résultats du test *in vitro* seraient peu utiles, vu la haute corrélation entre la présence des mutations sur le gène *dhfr* et la réponse *in vitro* à la pyriméthamine. Quant au test *in vitro* de sensibilité à la sulfadoxine, le protocole actuel n'est pas au point (15, 22). Une étude antérieure sur la prévalence du génotype de *dhfr* et de *dhps* a été réalisée à São Tomé et Príncipe en février 2000 (5). Cette étude était fondée sur l'analyse des produits de PCR par digestion enzymatique. Les deux études moléculaires effectuées à São Tomé et Príncipe en 2000 et 2003 montrent une augmentation de la proportion d'isolats mutants, notamment de ceux portant les triples mutations sur le gène *dhfr* et de ceux portant l'allèle muté Gly-437 sur le gène *dhps* (les « quadruples » mutations). Par rapport aux résultats de l'étude de Cravo (5), nous avons observé des proportions semblables d'allèles mutés de *dhfr* au niveau du codon 51 (92 % selon Cravo versus 95 % dans notre étude) et au niveau du codon 108 (95 % selon Cravo versus 97 % dans notre étude). Ces résultats suggèrent que les proportions presque maximales des allèles mutés en position 51 et 108 du gène *dhfr* sont atteintes à São Tomé et Príncipe. Dans notre étude, une proportion du codon muté Arg-59 (73 %) était plus élevée que celle de l'étude antérieure (55 %). Cette différence se reflète dans la proportion des isolats portant les triples mutations en *dhfr*, c'est-à-dire, 53 % selon Cravo et 73 % selon notre étude. Quant au codon clé du gène *dhps* Gly-437, 86 % des isolats analysés dans notre étude étaient mutés et 75 % selon Cravo (5). La différence dans la proportion du codon muté Ala-436 des deux études (25 % selon Cravo vs 41 % selon notre étude) serait expliquée, en partie, par la détection d'une fréquence plus importante de l'allèle Phe-436 (15 % des isolats) par l'analyse des produits de PCR à l'aide de la digestion enzymatique dans l'étude antérieure, par rapport à une faible proportion d'isolats avec cet allèle (1,7 %) dans notre étude basée sur le séquençage des produits de PCR. Étant donné la différence des techniques entre les deux études, il est difficile d'identifier la source de discordance dans la prévalence de l'allèle 436 du gène *dhps*. Cependant, les autres études sur les séquences du gène *dhps* chez les isolats de *P. falciparum* dans les pays voisins en Afrique centrale n'ont pas mis en évidence une fréquence importante de l'allèle Phe-436 (1, 4,

13, 16). Une analyse sur d'autres isolats de São Tomé et Príncipe, éventuellement réalisée en parallèle par le séquençage et par la digestion enzymatique, devrait confirmer la fréquence actuelle de l'allèle Phe-436 et son évolution dans le temps. Outre cette différence dans les résultats entre les deux études, CRAVO (5) a également rapporté la présence de l'allèle muté Glu-540 chez 7 % des isolats alors que nous n'en avons observé aucun. À l'heure actuelle, l'allèle muté Glu-540 semble être relativement rare en Afrique centrale. Parmi les isolats analysés au Cameroun, au Gabon et au Congo-Brazzaville, aucun ne portait cette mutation sur le gène *dhps* (1, 4, 13, 16). Toutefois, d'après les études menées en Afrique de l'Est, où les prévalences des codons mutés Glu-540 et Gly-437 sur le gène *dhps* et des triples mutations sur le gène *dhfr* (c'est-à-dire, les « quintuples » mutations) sont élevées, le codon Glu-540 serait un marqueur moléculaire majeur associé avec l'échec thérapeutique chez les malades traités à la sulfadoxine-pyriméthamine (6, 9). En Afrique centrale, où la sulfadoxine-pyriméthamine en monothérapie demeure plus efficace qu'en Afrique de l'Est, la présence du codon muté Glu-540 a été rarement rapportée. Il conviendrait donc de poursuivre la surveillance de la résistance de *P. falciparum* aux antifoliques et aux antifoliniques par le test moléculaire afin de déceler l'apparition éventuelle de cette mutation sur les côtes atlantiques de l'Afrique centrale et à São Tomé et Príncipe. L'émergence et l'extension des isolats portant le codon muté Glu-540 sur le gène *dhps* pourraient servir de « système d'alarme précoce » pour alerter les autorités sanitaires en Afrique centrale et les îles dans le Golfe de Guinée.

Conclusion

D'autres études de surveillance moléculaire associées aux études d'efficacité thérapeutique seraient nécessaires afin de mieux définir l'évolution de la résistance aux antifoliques et aux antifoliniques à São Tomé et Príncipe. Dans une zone de transmission stable du paludisme au Cameroun, il a été démontré qu'une augmentation considérable de la proportion des isolats de *P. falciparum* mutants en *dhfr* pourrait se produire dans une période de seulement 2 ans (3). Étant donné une évolution potentiellement rapide de l'extension de la résistance aux antifoliques et aux antifoliniques, une surveillance étroite de l'efficacité thérapeutique de la sulfadoxine-pyriméthamine et des marqueurs moléculaires *dhfr* et *dhps* s'impose à São Tomé et Príncipe.

Remerciements

Cette étude a été soutenue financièrement par le Programme PAL+ du Ministère français de la recherche.

Références bibliographiques

- AUBOUY A, JAFARI S, HUART V, MIGOT-NABIAS F, MAYO-MBO J *et al.* – *DHFR* and *DHPS* genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with *in vitro* activity of pyrimethamine and cycloquanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy. *J Antimicrob Chemother*, 2003, **52**, 43-49.
- BAPTISTA JL, DAS NEVES I, D'ALESSANDRO U, HENDRIX L & WÉRY M – *Plasmodium falciparum* chloroquine and quinine sensitivity in asymptomatic and symptomatic children in São Tomé Island. *Trop Med Int Health*, 1997, **2**, 582-588.
- BASCO LK – Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVI. Longitudinal surveillance of *in vitro* pyrimethamine resistance. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, **69**, 174-178.
- BASCO LK, TAHAR R, KEUNDJIAN A & RINGWALD P – Sequence variations in the genes encoding dihydropter-

oate synthase and dihydrofolate reductase and clinical response to sulfadoxine-pyrimethamine in patients with acute uncomplicated falciparum malaria. *J Infect Dis*, 2000, **182**, 624-628.

- CRAVO P, FIGUEIREDO S, NOGUEIRA F, LOPES D, FERREIRA ID *et al.* – High frequency of the genetic polymorphisms associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance, among *Plasmodium falciparum* isolates from São Tomé and Príncipe, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol*, 2004, **98**, 293-296.
- DORSEY G, DOKOMAJILAR C, KIGGUNDU M, STAEDKE SG, KAMYA MR & ROSENTHAL PJ – Principal role of dihydropterolate synthase mutations in mediating resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in single-drug and combination therapy of uncomplicated malaria in Uganda. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, **71**, 758-763.
- HAGMANN R, CHARLWOOD JD, GIL V, FERREIRA C, DO ROSARIO V & SMITH TA – Malaria and its possible control on the island of Príncipe. *Malaria J*, 2003, **2**, 15 (<http://www.malariajournal.com/content/2/1/15>).
- HENNING L, FELGER I & BECK HP – Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. *Acta Trop*, 1999, **72**, 149-155.
- KUBLIN JG, DZINJALAMALA FK, KAMWENDO DD, MALKIN EM, CORTESE JF *et al.* – Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 2002, **185**, 380-388.
- LOPES D, NOGUEIRA F, GIL JP, FERREIRA C, DO ROSARIO VE & CRAVO P – *pfcr* and *pfmdr1* mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol*, 2002, **96**, 831-834.
- LOUREIRO LF, CESÁRIO AM, FRANCO AS, DO ROSÁRIO VE, BENITO A *et al.* – Malaria in São Tomé and Príncipe: prevalence and drug-susceptibility. *Ann Trop Med Parasitol*, 1996, **90**, 223-224.
- MARTET G, DA CONCEIÇÃO S, CORDOLIANI G, DELOLME H, RAPHENON G *et al.* – Le paludisme en République de São Tomé et Príncipe. Évaluation épidémiologique et chimiorésistance de *P. falciparum*. *Bull Soc Pathol Exot*, 1991, **84**, 273-280.
- MAWILI-MBOUMBA DP, EKALA MT, LEKOULOU F & NTOUMI F – Molecular analysis of *DHFR* and *DHPS* genes in *P. falciparum* clinical isolates from the Haut-Ogooué region in Gabon. *Acta Trop*, 2001, **78**, 231-240.
- MÜLLER DA, CHARLWOOD JD, FELGER I, FERREIRA C, DO ROSARIO V & SMITH T – Prospective risk of morbidity in relation to multiplicity of infection with *Plasmodium falciparum* in São Tomé. *Acta Trop*, 2001, **78**, 155-162.
- NDOUNGA M, BASCO LK & RINGWALD P – Evaluation of a new sulfadoxine sensitivity assay *in vitro* for field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001, **95**, 55-57.
- NSIMBA B, JAFARI-GUEMOURI S, MALONGA DA, MOUATA AM, KIORI J *et al.* – Epidemiology of drug-resistant malaria in Republic of Congo: using molecular evidence for monitoring antimalarial drug resistance combined with assessment of antimalarial drug use. *Trop Med Int Health*, 2005, **10**, 1030-1037.
- ORG MOND SANTÉ – *Malaria Control in the African Region: Malaria Country Profiles*. World Health Organization Regional Office for Africa, Harare, Zimbabwe, 2003.
- PINTO J, SOUSA CA, GIL V, FERREIRA C, GONÇALVES L *et al.* – Malaria in São Tomé and Príncipe: parasite prevalences and vector densities. *Acta Trop*, 2000, **76**, 185-193.
- RIBEIRO H, RAMOS HC, PIRES CA – Sobre os vectores da malária em São Tomé e Príncipe. *Garcia de Horta Serie de Zoologia*, 1990, **15**, 135-152.
- RIPERT C, NEVES I, APPRIOU M, TRIBOULEY J, TRIBOULEY-DURET J *et al.* – Épidémiologie de certaines endémies parasitaires dans la ville de Guadalupe (République de São Tomé et Príncipe) II. Autres endémies parasitaires. *Bull Soc Pathol Exot*, 1996, **89**, 259-261.
- SNOUNOU G, PINHEIRO L, ANTUNES AM, FERREIRA C & DO ROSARIO VE – Non-immune patients in the Democratic Republic of São Tomé e Príncipe reveal a high level of transmission of *P. ovale* and *P. vivax* despite low frequency in immune patients. *Acta Trop*, 1998, **70**, 197-203.
- WANG P, SIMS PF & HYDE JE – A modified *in vitro* sulfadoxine susceptibility assay for *Plasmodium falciparum* suitable for investigating Fansidar® resistance. *Parasitology*, 1997, **115**, 223-230.