

Pas d'influence de la saison de transmission ni de l'âge des patients sur la complexité et la diversité génétique des infections dues à *Plasmodium falciparum* à Cotonou (Bénin).

S. Issifou (1, 2), S. Djikou (3), A. Sanni (1), F. Lekoulou (3) & F. Ntoumi (3)*

(1) Département de biochimie et de biologie cellulaire, Faculté des sciences et techniques, Université nationale du Bénin, 04 B.P. 0320, Cotonou, Bénin.

(2) Centre régional pour le développement et la santé (CREDESA / SSP), 01B.P. 1822, Cotonou, Bénin.

(3) Centre international de recherches médicales (CIRMF), B.P. 769, Franceville, Gabon.

* Adresse actuelle : Hôpital Albert Schweitzer, B.P. 118 Lambaréné, Gabon.

Pour la correspondance : Université de Tübingen, Institut für Tropenmedizin, Wilhelmstrasse 27, 72074 Tübingen, Allemagne. Télécopie : (49) 7071 295 189.

Manuscrit n°2167. "Santé publique". Reçu le 22 février 2000. Accepté le 15 novembre 2000.

Cet article a été présenté à la session poster à la conférence du MIM à Durban, Afrique du Sud (14-19 mars 1999).

Summary: No influence of season of transmission nor age of patients on the complexity and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in Cotonou, Benin.

The aim of the present study was to determine the genetic diversity and allelic frequencies of the genes encoding for the merozoite surface protein-1 (MSP-1) and protein-2 (MSP-2) of *P. falciparum* collected from Beninese patients during the high and low transmission seasons in Cotonou, in South Benin. Sixty and twenty-four patients were sampled during the dry and wet seasons, respectively. Parasite DNA was analysed using allele-specific primers to amplify block2 of MSP-1 and central variable region of MSP-2.

A total of 12 (K1, Mad20, Ro33) MSP-1 and 23 (3D7, FC27 and hybrids) MSP-2 alleles were detected. Neither age nor transmission season modified the genetic diversity of *P. falciparum* nor the distribution of MSP-1 and MSP-2 alleles. Combining the results of MSP-1 and MSP-2 genotyping, multiple *P. falciparum* infections were observed in 57% and 70% of isolates during the wet and dry seasons, respectively. The complexity of infections defined as the number of parasite genotype per isolate was 2.4 and it was not affected either by the season or by the age of the host. We conclude that change of season did not influence the permanent turn-over of parasites and the complexity of infections.

Data obtained here will serve as a baseline for future studies, such as the impact of malaria control measures on parasite populations, to be conducted in Cotonou.

Résumé :

L'objectif de cette étude est de décrire la diversité génétique de *P. falciparum* et de déterminer les fréquences alléliques des gènes MSP-1 et MSP-2 de *P. falciparum* dans des prélèvements de malades souffrant de paludisme pendant la saison sèche et pendant la saison des pluies à Cotonou, au sud du Bénin. Soixante et vingt-quatre patients ont été respectivement sélectionnés pendant la saison sèche et pendant la saison des pluies. L'ADN parasitaire a été analysé en utilisant des amorces afin d'amplifier le block2 de MSP-1 et la région variable centrale de MSP-2. Des amorces spécifiques des principales familles alléliques ont permis de distinguer les différents allèles des gènes MSP-1 et MSP-2.

Nous avons mis en évidence 12 allèles du gène MSP-1 et 23 allèles du gène MSP-2. La diversité génétique de *P. falciparum* ne semble affectée ni par la période à laquelle le prélèvement a été effectué, ni par l'âge du patient. En combinant les résultats du typage des gènes MSP-1 et MSP-2, nous observons respectivement 57 % et 70 % d'infections multiples pendant la saison des pluies et la saison sèche. La complexité des infections déterminée comme étant le nombre de génotypes parasitaires par individu est de 2,4. Cette complexité est, elle aussi, indépendante de la saison de transmission et de l'âge de l'hôte.

Les résultats obtenus dans cette étude serviront de données de base pour évaluer l'impact de certaines mesures de lutte contre la maladie sur les populations parasitaires de la région de Cotonou.

Introduction

L'épidémiologie moléculaire des parasites responsables du paludisme, discipline utilisant la biologie moléculaire pour étudier les parasites circulants, prend un essor de plus

en plus important dans la recherche menée sur le terrain (23, 27). Les infections dues à *P. falciparum* ont été analysées en utilisant les méthodes d'amplification génique ou Polymerase Chain Reaction (PCR) (26, 29) afin d'amplifier les régions polymorphes des gènes du parasite comme ceux codant des

P. falciparum
MSP-1
MSP-2
allelic polymorphism
infection
age
season
transmission
Benin
Sub-Saharan Africa

P. falciparum
Merozoite surface protein 1 et 2
(MSP-1 et MSP-2)
polymorphisme allélique
infection
âge
saison
transmission
Bénin
Afrique intertropicale

antigènes tels que les protéines de surface du mérozoïte (2, 4, 21). Pour identifier l'espèce plasmodiale, l'amplification du gène codant la petite sous-unité du ribosome a été réalisée (21, 22). De nombreuses études (5, 7, 8, 12, 13, 14, 17) utilisant cette technique, ont mis en évidence des différences géographiques importantes dans les populations parasitaires circulantes (7). Les marqueurs du polymorphisme parasitaire utilisés le plus couramment dans ces études sont MSP-1 et MSP-2 (4, 28). Pour décrire les parasites tels qu'ils sont sur le terrain, des critères comme la fréquence allélique des gènes considérés et la complexité des infections ont été déterminés (30). Des études épidémiologiques ont montré que la diversité génétique des populations naturelles de parasites pouvait varier sur deux sites éloignés de quelques kilomètres seulement (15). De même, ces critères pouvaient varier en fonction du statut clinique de l'individu (asymptomatique *versus* symptomatique), de la gravité de la maladie (cas simples *vs* cas sévères) (16, 24), en fonction de l'âge du patient (10, 20), du phénotype de l'hémoglobine de l'hôte (hémoglobine normale Hb AA *versus* trait drépanocytaire Hb AS) (21, 22), et des facteurs écologiques tels que les fluctuations dans la transmission (saison sèche *vs* saison pluvieuse) (25), l'endémicité du paludisme sur le site (2, 15, 30).

Les buts de la présente étude sont :

- de déterminer la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* en analysant les gènes MSP-1 et MSP-2 ;
- de comparer cette diversité en fonction de la saison de transmission (sèche ou pluvieuse) à Cotonou, au sud du Bénin, en Afrique de l'Ouest.

Matériels et méthodes

L'étude a été menée dans la ville de Cotonou située au sud du Bénin. La transmission du paludisme y est intense et permanente avec deux pics au cours de l'année entre mai et juin, puis entre septembre et octobre. Entourée par le lac Nokoué, des flaques d'eau et des marécages sont observés dans cette ville toute l'année. *Plasmodium falciparum* est l'espèce prédominante et le vecteur principal est *Anopheles gambiae s. s* (19). Le nombre de piqûres infestantes a été estimé à 58/personne/an (19).

Les malades souffrant de paludisme (enfants et adultes), venus en consultation à l'hôpital St-Luc de Cotonou, présentant une température axillaire > 37,5 °C et une goutte épaisse positive avec une densité parasitaire 500 parasites/µl de sang en saison sèche et 800 parasites/µl de sang en saison des pluies, ont été recrutés dans l'étude avec le consentement éclairé des patients ou tuteurs. Soixante malades ont été sélectionnés entre le mois d'octobre et le mois de décembre 1997, ce qui correspondait à la saison sèche, et vingt-quatre ont été sélectionnés en avril 1998, ce qui correspondait à la saison pluvieuse. Un frottis sanguin et une goutte épaisse ont été réalisés pour chaque patient. Ces lames ont été séchées et colorées au Giemsa, puis lues avec un microscope optique à l'agrandissement x 100 en comptant les formes asexuées de parasite sur 200 leucocytes. Le nombre de parasites par microlitre de sang a été calculé en estimant qu'un microlitre de sang comportait 8000 leucocytes. Les patients recrutés étaient âgés de 6 mois à 70 ans. Soixante patients dont 23 de la tranche d'âge de 6 mois à 14 ans et 37 dont l'âge était 15 ans ont été recrutés pendant la saison sèche et 24 patients dont 13 âgés de 6 mois à 14 ans et 11 dont l'âge était 15 ans ont été recrutés pendant la saison de forte transmission. Cette étude a été approuvée par le

comité éthique du Ministère de la santé et de l'Université nationale du Bénin avant d'être entreprise.

L'ADN parasitaire a été extrait à partir de 100 µl de sang total congelé en utilisant la méthode du phénol et du chloroforme (4) et cet ADN a été remis en suspension dans 50 µl d'eau distillée. Le typage des gènes MSP-1 et MSP-2 a été réalisé en utilisant des amorces spécifiques des différentes familles alléliques comme décrit par ailleurs (24). Brièvement, les régions polymorphes du bloc 2 du gène MSP-1 et de la région centrale du gène MSP-2 de *P. falciparum* ont été amplifiées par PCR (Polymerase chain reaction) nichée ou double amplification enzymatique en utilisant des amorces spécifiques. Trois familles alléliques ont été déterminées pour le gène MSP-1 : K1, Ro33 et Mad20. Trois familles alléliques 3D7, FC27 et les hybrides ou allèles recombinants (⁶FC27/3D7³ et ⁵3D7/FC27³) (30) du gène MSP-2 ont été considérés. Les fragments amplifiés ont été séparés sur du gel d'agarose 1,5 % (Seakem, produits FMC) par électrophorèse et visualisés avec le bromure d'éthidium sous la lumière ultraviolette. La taille des amplifiats a été estimée en utilisant les marqueurs de poids moléculaire de l'ADN (Marqueur VI, Boehringer Mannheim).

La fréquence d'un allèle a été calculée comme son pourcentage par rapport au nombre total d'allèles détectés dans l'ensemble des isolats. La distribution des familles alléliques des gènes MSP-1 et MSP-2 et le nombre de génotypes parasitaires par personne infectée ont été déterminés dans chaque groupe d'âge en fonction de la saison.

La complexité des infections (nombre minimum de différents génotypes parasitaires par individu infecté) a été estimée en divisant le nombre total de fragments MSP-1 et MSP-2 détectés par le nombre total d'échantillons ayant donné un produit d'amplification. Des comparaisons ont été faites en fonction de la saison et de l'âge.

Résultats

Pendant la saison sèche, les densités parasitaires étaient comprises entre 500 et 85000 parasites/µl de sang, tandis qu'au cours de la saison pluvieuse, elles étaient comprises entre 800 et 240000 parasites/µl de sang. La densité géométrique moyenne des parasites était de 10500 parasites/µl et 4966 parasites/µl de sang pendant les saisons pluvieuse et sèche, respectivement.

L'efficacité de la détection de l'ADN parasitaire définie comme étant la proportion d'échantillons amplifiés avec succès en utilisant la technique d'amplification enzymatique des gènes était de 41 % pour MSP-1 et 81 % pour MSP-2.

Une importante diversité allélique (tableau I) a été observée aussi bien pour le gène de MSP-1 avec 12 allèles que pour le gène de MSP-2 avec 23 allèles dont 10 allèles hybrides détectés comme cela a été décrit par ZWETYENGA *et al.* (30).

Tableau I.

Diversité allélique des gènes MSP-1 et MSP-2 de *P. falciparum* à partir d'isolats prélevés à Cotonou.
Allelic diversity of MSP-1 and MSP-2 *P. falciparum* genes from isolates sampled in Cotonou.

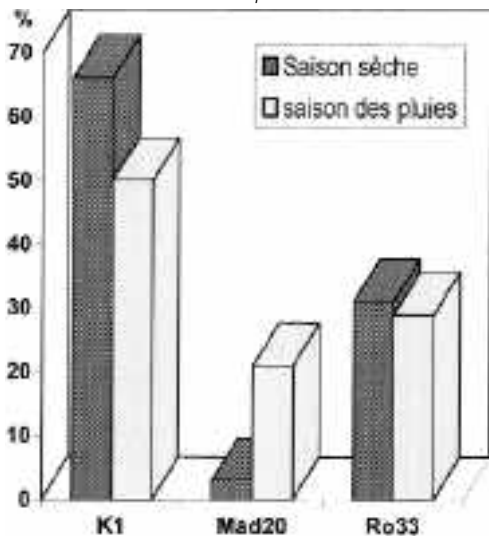
	MSP-1			MSP-2		
	K1	Mad20	Ro33	3D7	FC27	hybrides
210	210	190	220	360	220	
220	230	220	240	380	240	
240	250		270	400	250	
260			290	450	290	
270			310	490	310	
280			330		330	
300			370		350	
			390		390	
					430	
					450	

Figure 1.

Analyse du gène de MSP-1 de *P. falciparum* à partir d'isolats prélevés à Cotonou.

La fréquence des familles alléliques de MSP-1 a été déterminée en utilisant la double amplification enzymatique à l'aide d'amorces spécifiques de ces familles alléliques. Trois principales familles K1, Mad20 et Ro33 ont été identifiées pendant la saison sèche (en gris) et la saison pluvieuse (en clair).

Analysis of the MSP-1 *P. falciparum* gene from isolates sampled in Cotonou.



La diversité génétique n'est affectée ni par l'âge des patients souffrant de paludisme, ni par le niveau de transmission. Nous constatons que 40 % des allèles de MSP-1 et de MSP-2 sont détectés en saison sèche et en saison des pluies.

La distribution des allèles de la famille K1 et Ro33 du gène MSP-1 est la même au cours des différentes saisons de transmission (figure 1). Cependant, pour les allèles de type Mad20, nous observons une réduction, non significative, ($\chi^2 = 0,0012$; $p = 0,22$; ddl = 1), de la fréquence de la famille allélique de Mad20 durant la saison sèche. La distribution des allèles du gène MSP-2 n'est pas modifiée par la saison de transmission (figure 2).

En combinant les résultats du typage des gènes MSP-1 et MSP-2, nous observons que les infections multiples (avec plus d'un génotype parasitaire de *P. falciparum*) représentent 57 % des isolats cliniques obtenus en saison des pluies et 70 % de ceux obtenus en saison sèche. Statistiquement, il n'y a aucune différence entre ces deux pourcentages ($\chi^2 = 1,284$; $p = 0,65$). D'autre part, la complexité des infections est de 2,4 fragments amplifiés/individu. Celle-ci n'est affectée ni par l'âge, ni par la saison de transmission.

Discussion

Cette étude est la première à rapporter une analyse moléculaire des souches de *P. falciparum* prélevées sur un site au Bénin. Les résultats obtenus montrent que la saison de transmission n'influence ni la distribution des allèles des gènes codant MSP-1 et MSP-2, ni la complexité des infections dues à *P. falciparum* chez les patients considérés. Au Soudan et en Tanzanie (2), une analyse similaire a été entreprise sur des sites avec des niveaux de transmission différents. Une réduction du polymorphisme des gènes de MSP-1 et MSP-2 a été associée à la diminution du niveau de transmission.

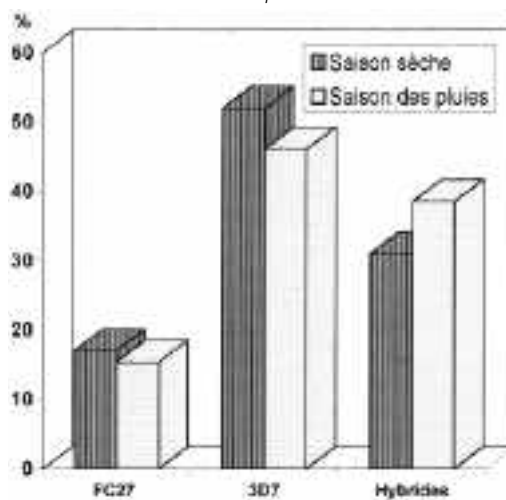
La multiplicité des infections chez un individu peut être due : - à un important taux d'inoculation entomologique (TIE) comme en Tanzanie (village de Michenga) (2) ou au Sénégal (village de Dielmo) (15) où les patients reçoivent un grand nombre de piqûres infectantes ;

Figure 2.

Analyse du gène de MSP-2 de *P. falciparum* à partir d'isolats prélevés à Cotonou.

La fréquence des familles alléliques de MSP-2 a été déterminée en utilisant la double amplification enzymatique à l'aide d'amorces spécifiques de ces familles alléliques. Trois principales familles FC27, 3D7, et des hybrides (allèles recombinants $^{5'}FC27/3D7^{3'}$ et $^{3'}3D7/FC27^{5'}$) ont été détectées pendant la saison sèche (en noir) et la saison pluvieuse (en clair).

Analysis of the MSP-2 *P. falciparum* gene from isolates sampled in Cotonou.



Cotonou, avec un TIE de 58 (19), donc le double de celui observé à Madang, la multiplicité des infections était seulement de 2. En Gambie, des isolats cliniques présentaient en moyenne 2 clones de *P. falciparum* avec un TIE sur ce site de 4 à 24 (18). Il semble évident que le taux d'inoculation entomologique a un impact sur la multiplicité des infections, mais cette relation est loin d'être linéaire. Cependant, nous pouvons imaginer que, dans une zone à transmission permanente, le changement de saison influence peu la diversité des parasites et le nombre de génotypes parasitaires par personne parce que les habitants sont continuellement infectés et le renouvellement des populations de parasites peut être important (8, 11). La stratégie employée ici pour déterminer la multiplicité des infections dans les isolats cliniques est l'amplification enzymatique des gènes polymorphes. CONTAMIN *et al.* (4) ont montré que la sensibilité de détection des génotypes parasitaires dans un isolat dépendait de la quantité de ce génotype. Il est important d'avoir à l'esprit cette notion de seuil de détection pour l'interprétation des résultats concernant la complexité des infections. C'est ainsi que, dans les infections cliniques où les densités parasitaires sont élevées, il est beaucoup moins aisé de détecter les génotypes parasitaires mineurs. Aucune influence de l'âge des patients sur la multiplicité des infections et la distribution des allèles par rapport à l'âge des patients n'a été observée dans des isolats du Bénin. Ceci est en contradiction avec d'autres sites où la transmission est pérenne (15, 20). Mais les résultats obtenus au Bénin peuvent s'expliquer par les mesures préventives prises par les mères pour réduire les épisodes cliniques chez les enfants. Ces mesures consistent à donner un antipaludéen, préférentiellement la chloroquine, à tout enfant (S. ISSIFOU, données non publiées) par automédication ou prescription médicale. Cette même étude entreprise dans un village du Bénin donnerait vraisemblablement des résultats plus conformes aux observations faites ailleurs en Afrique. Cette automédication couramment pratiquée en ville conduit à une réduction du nombre de souches portées par les jeunes enfants et il devient alors difficile de mettre en évidence une diminution de la multiplicité des infections en fonction de l'âge.

- par un seul moustique porteur de plusieurs clones parasitaires dans son *inoculum* (9).

Dans le contexte de cette étude, il est difficile de spéculer sur l'influence de l'*inoculum* du moustique sur la multiplicité des infections parce qu'aucune donnée de ce type n'est disponible sur ce site au Bénin. Nous ne pouvons spéculer qu'à partir d'observations faites dans d'autres lieux où les TIE sont identiques à celui de Cotonou. À Madang, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, où le TIE est en moyenne de 30, le nombre de différents clones de *P. falciparum* par personne était de 1,7 (1) et, à

Dans cette étude au Bénin, il n'a pas été mis en évidence de changement dans les populations parasitaires en saison des pluies et en saison sèche. Ceci n'est guère surprenant au regard des travaux menés sur plusieurs années en Gambie (6) et au Soudan (3). En effet, il est rapporté que les populations parasitaires restaient stables au cours du temps.

L'ensemble des données publiées à ce jour montre que la complexité des infections dues à *P. falciparum* et/ou le polymorphisme allélique de certains gènes de *P. falciparum* dépendent des niveaux de l'endémicité paludéenne, de la transmission sur le site considéré et du comportement individuel et/ou collectif face à l'infection. Ceci doit être pris en considération dans l'interprétation des données d'épidémiologie moléculaire, sachant que différents modèles épidémiologiques des interactions hôte-parasite qui prévalent dans chaque zone endémique peuvent affecter la structure génétique des parasites. Les résultats obtenus ici serviront de données de base pour des études futures sur l'analyse de l'impact de toutes mesures de lutte contre le paludisme sur des populations de parasites à Cotonou.

Remerciements

Nous remercions tous les patients et leurs parents pour leur participation à cette étude. Nous sommes tout particulièrement reconnaissants au Dr Servais CAPOCHICHI, directeur de l'Hôpital St Luc et à tout son personnel. Nous remercions aussi N. Worou CHABI, A.E. ANAGO, P. MAWILI-MBOUMBA et M.-T. EKALA pour leur aide technique.

Support financier :

La formation du Dr Saadou ISSIFOU est supportée par le TDR /OMS. Cette étude a reçu le soutien financier du PNUD/Banque Mondiale/OMS, Programme spécial pour la recherche et la formation sur les maladies tropicales (TDR). Le Centre international de recherches médicales de Franceville est financé par le Gouvernement gabonais, Elf Gabon et le Ministère de la coopération française.

Références bibliographiques

- ARNOT D - Unstable malaria in Sudan: the influence of dry season. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, **92**, 580-585.
- BABIKER HA, LINES J, HILL WG & WALLIKER D - Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in East Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **56**, 141-147.
- BABIKER HA, SATTI G & WALLIKER D - Genetic changes in the population of *Plasmodium falciparum* in a Sudanese village over a three-year period. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **53**, 7-15.
- CONTAMIN H, FANDEUR T, BONNEFOY S, SKOURI F, NTOUMI F & MERCEREAU-PUIJALON O - Typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 944-951.
- CONTAMIN H, FANDEUR T, ROGIER C, BONNEFOY S, KONATÉ L *et al.* - Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in senegalese children. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**, 632-643.
- CONWAY DJ, GREENWOOD BM & McBRIDE JS - Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* polymorphic antigens in a malaria-endemic population. *Infect Immun*, 1992, **60**, 1122-1127.
- CREASEY A, FENTON B, WALKER A, THAITHONG S, OLIVIERA S *et al.* - Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, **42**, 403-413.
- DAUBERSIES P, SALLENAVE-SALES S, MAGNE S, TRAPE JP, CONTAMIN H *et al.* - Rapid turn-over of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**, 18-26.
- DRUILHE P *et al.* - A primary malaria infection is composed of a very wide range of genetically diverse but related parasites. *Am J Clin Invest*, 1998, **101**, 9, 2008-2016.
- ENGELBRECHT F, FELGER I, GENTON B, ALPERS M & BECK HP - *Plasmodium falciparum*: Malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp Parasitol*, 1995, **81**, 90-96.
- FARNERT A, SNOUNOU G, ROUTH I & BJORKMAN A - Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **56**, 538-547.
- FELGER I, IRION A, STEIGER S & BECK HP - Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, **93**, 3-9.
- FERREIRA MU, KANEKO O, KIMURA M, LIU Q, KAWAMOTO F & TANABE K - Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus in natural *Plasmodium falciparum* populations: a brief overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998, **93**, 631-638.
- HADDAD D, SNOUNOU G, MATTEI D, ENAMORADO IG, FIGUEROA J *et al.* - Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, **60**, 30-34.
- KONATÉ L, ZWETYENGA J, ROGIER C, BISHOFF E, FONTENILLE D *et al.* - Variation of *Plasmodium falciparum* MSP-1 block2 and MSP-2 allelic prevalence and infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, **93**, S121-S128.
- KUN JF J *et al.* - Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, **92**, 110-114.
- KYES S, HARDING R, BLACK G, CRAIG A, PESHU Net *al.* - Limited spatial clustering of individual *Plasmodium falciparum* alleles in field isolates from coastal Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **57**, 205-215.
- LINDSAY SW, SHENTON FC, SNOW RW & GREENWOOD BM - Responses of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in the use of untreated bednets in the Gambia. *Med Vet Entomol*, 1989, **3**, 253-262.
- MINISTÈRE LASANTE DU BENIN - *Statistiques sanitaires nationales*, 1994.
- NTOUMI F, CONTAMIN H, ROGIER C, BONNEFOY S, TRAPE JF & MERCEREAU-PUIJALON O - Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 81-88.
- NTOUMI F, MERCEREAU-PUIJALON O, OSSARI S, LUTY A, RELTIEN J *et al.* - *Plasmodium falciparum*: Sickle cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol*, 1997, **87**, 39-46.
- NTOUMI F, ROGIER C, DIEYE A, TRAPE JF, MILLET P & MERCEREAU-PUIJALON O - Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* MSP-1 genotypes related to sickle cell trait. *Mol Med*, 1997, **3**, 581-592.
- PAUL REL, BROCKMAN A, PRICE RN, LUXEMBURGER C, WHITE NJ *et al.* - Genetic analysis of *Plasmodium falciparum* infections on the north-western border of Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, **93**, 587-593.
- ROBERT F, NTOUMI F, SARTHOU JL, ROGIER C, FANDEUR T *et al.* - Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 704-711.
- ROPER C, RICHARDSON W, ELHASSAN IM, GIHA H, HVIID L *et al.* - Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village. *Parasitol*, 1998, **116**, 501-510.
- SAIKI R, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS K, HORN G *et al.* - Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, **230**, 1350-1354.
- SNOUNOU G, VIRIYAKOSOL S, JARRA W, THAITHONG S & BROWN KN - Identification of the four human malaria parasites species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, **58**, 283-292.
- VIRIYAKOSOL S, SIRIPOON N, PETCHARAPIRAT C, PETCHARAPIRAT P, JARRA W *et al.* - Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull Org Mond Santé*, 1995, **73**, 85-95.
- WOODEN J, GOULD EE, PAULI AT & SIBLEY CH - *Plasmodium falciparum*: A simple Polymerase Chain Reaction method for differentiating strains. *Exp Parasitol*, 1992, **75**, 207-212.
- ZWETYENGA J, ROGIER C, TALL A, FONTENILLE D, SNOUNOU G *et al.* - No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **59**, 726-735.

