

# ETUDE DU POLYMORPHISME GENETIQUE DES SOUCHES DE PLASMODIUM FALCIPARUM AU NIGER

IBRAHIM ARZIKA<sup>1</sup>; MAHAMANE MOUSTAPHA LAMINE<sup>1</sup> ; ABOUBACAR MAHAMADOU<sup>1</sup>; HALIMA ZAMANKA<sup>1</sup> ; IBRAHIM MAMAN LAMINO<sup>1</sup>

## RESUME

**Problématique** : Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est un problème majeur de santé publique au Niger. *Plasmodium falciparum* est l'agent responsable de 97% des cas de paludisme. Il est aussi responsable des formes cliniques graves comme le neuropaludisme et l'anémie sévère. Pour évaluer l'impact des stratégies de lutte contre le paludisme sur la diversité génétique, nous avons caractérisé les populations parasitaires du Niger en amplifiant le block2 du gène *msp1* et la région variable centrale du gène *msp2*. Des amorces spécifiques des différentes familles alléliques (K1, MAD20 et RO33 pour *msp1*) puis (3D7 et FC27 pour *msp2*) ont permis de distinguer les allèles du gène *msp1* et du gène *msp2*.

**Objectif général** : L'objectif est d'analyser la diversité génétique et la complexité des infections à *P. falciparum* au niveau de 13 sites représentatifs de la situation épidémiologique du paludisme au Niger.

**Résultat** : 510 échantillons de 13 sites du Niger ont été génotypés. Une très grande diversité génétique est observée avec les deux marqueurs. En effet, il y a 17 allèles différents de type *msp1* et 14 allèles différents de type *msp2*. La famille allélique la plus fréquente dans la population est 3D7 (63%) suivie de K1 (43.2%). Les familles alléliques les plus rares sont MAD 20 (28.4%) et RO33 (28.4%). La distribution allélique des gènes *msp1* et *msp2* est très variée selon le site. Le nombre de clones varie de 1 à 5 par patient. 23% des infections sont polyclonales. La multiplicité des infections (MOI) est de 2.8 au Niger. Il y'a une différence significative de MOI selon les sites ( $p < 0.05$ ). Nos résultats sont discutés au regard d'études semblables en Afrique de l'ouest.

**Conclusion** : Cette étude montre qu'il y'a une très grande diversité génétique des souches de *Plasmodium falciparum* au Niger. Cette diversité varie selon le site. Le sexe et l'âge n'influencent pas la diversité génétique. Les infections multiples sont fréquentes au Niger. La multiplicité des infections dépend aussi du site. La relation entre la multiplicité des infections et l'intensité de la transmission n'est pas linéaire. Des facteurs écologiques et environnementaux comme la disponibilité en eau de surface et l'humidité relative interviennent.

**Mots-clés** : *P.falciparum*, Diversité génétique, Multiplicité des infections, *msp1*, *msp2*, Niger

## ABSTRACT

### GENETIC POLYMORPHISM OF PLASMODIUM FALCIPARUM STRAINS IN NIGER

**Background**: Malaria is a major public health problem in Niger. *Plasmodium falciparum* is the causative agent of 97% of malaria cases. It is also responsible for severe clinical forms such as cerebral malaria or anemia. To assess the impact of control strategies against malaria on genetic diversity, we characterized the parasite populations of Niger at 13 sites by amplifying the block2 of *msp1* (mérozoïte surface protein 1) gene and the central variable region of *msp2* gene. Primers specific for the different allelic families (K1, MAD20 and RO33 for *msp1*) then (3D7 and FC27 for *msp2*) helped to distinguish alleles of *msp1* and *msp2*.

**Results**: 510 samples were genotyped. A very high genetic diversity was observed for both markers. There are 17 and 14 different allelic types for *msp1* and *msp2*. The most frequent allele is 3D7 (63%) followed by K1 (43.2%). The rarest allelic families are MAD20 (28.4%) and RO33 (28.4%). The number of clones varied from 1 to 5 per patient where 23% of infections were found to be polyclonal. The multiplicity of infection is 2.8 in Niger. There is a significant difference of multiplicity of infection between sites ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions**: There is a high genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in Niger. This diversity varies depending on the site. Sex and age do not influence genetic diversity. Multiple infections are frequent in Niger. The multiplicity of infections also depends on the site. The relationship between the multiplicity of infections and transmission is not linear. Ecological and environmental factors such as surface water availability and relative humidity occur

**Keywords**: *P. falciparum*, genetic diversity, multiplicity of infection, *msp1*, *msp2*, Niger

1. IBRAHIM Arzika: E-mail: iarzika@cermes.org
2. Mahamane Moustapha Lamine : E-mail: laminemahamanmoustapha@gmail.com
3. ABOUBACAR Mahamadou: E-mail: boubarcas@yahoo.fr
4. HALIMA Zamanka: E-mail: halimaiz@cermes.org

**Auteur correspondant** : Dr. Ibrahim Maman Laminou : Tel : +227 96 59 13 82.  
E-mail : lamine@cermes.org

## INTRODUCTION

Le rapport mondial sur le paludisme de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) fait état de 198 millions [124.000.000 - 283.000.000] de cas de paludisme et 584.000 [367.000 - 755.000] décès en 2014 [1]. Au Niger, le paludisme demeure un problème majeur de santé publique. Le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a rapporté 3.364.540 cas et plus de 3.000 décès en 2013 [2]. Le Plasmodium falciparum est le principal agent responsable du paludisme dans le monde [3]. Au Niger, il représente à lui seul 97% des infections palustres. L'une des caractéristiques du Plasmodium falciparum est son important polymorphisme génétique et antigénique [4]. Ce qui rend difficile la mise au point d'un vaccin efficace et explique la résistance des souches de Plasmodium falciparum aux antipaludiques [5], [6]. Le type moléculaire utilise des amorces spécifiques de gènes ayant un polymorphisme élevé comme msp1, msp2, glurp et trap[7]. Le gène msp1 est entièrement séquencé. Il gouverne la synthèse d'une protéine appelée msp1 (merozoïte surface protein 1) de 200 KD lors de la schizogonie. Elle est exprimée à la surface des mérozoïtes et intervient dans l'invasion érythrocytaire. La séquence du gène msp1 est subdivisée en 7 blocs variables, séparés par des séquences conservées. Le bloc 2 de la région N terminale est le plus polymorphe. Il est utilisé pour caractériser les populations parasites. Le gène msp1 existe sous trois familles alléliques : K1, MAD20 et RO33 [8].

Le gène msp2 gouverne la synthèse d'une protéine de la surface des mérozoïtes de 40 à 55 KD (merozoïte surface protein2). La région centrale variable du gène msp2 est utilisée pour génotyper les souches parasites. Ce gène présente 2 variants alléliques : 3D7 et FC27 [8]. La fréquence allélique et la complexité des infections sont les principaux critères utilisés pour décrire les populations parasites. Des études épidémiologiques ont montré que la diversité génétique des populations parasites peut varier selon les sites (deux villages distincts), le statut clinique (asymptomatique vs symptomatique), la gravité (paludisme simple vs paludisme sévère), l'âge des patients (jeunes vs adultes), l'endémicité (zone forestière vs sahel), l'urbanisation (urbain vs rural), l'hémoglobinopathie (HbAvs HbS), la saison (saison sèche vs saison pluvieuse) et l'écologie (marécage vs oasis) [9].

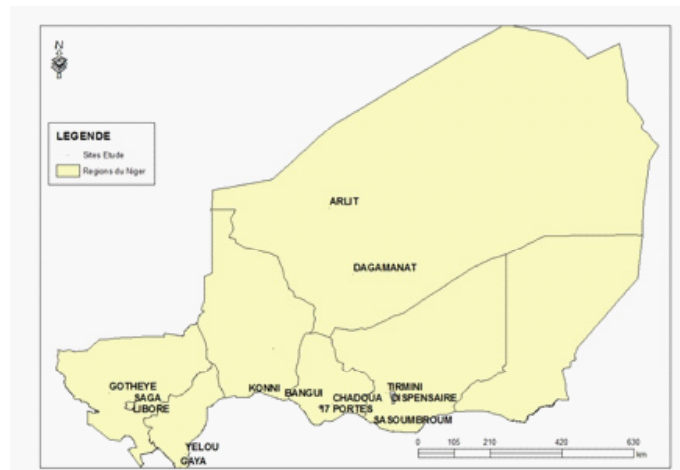
Pour évaluer l'impact des interventions de lutte contre le paludisme sur la diversité génétique au Niger, nous avons caractérisé les populations parasites de 13 sites représentatifs de la situation épidémiologique du Niger. En effet, le programme national de lutte contre le paludisme a mis en œuvre diverses stratégies de lutte (Adoption des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine en 2005, Distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticide

en 2007). Malgré toutes ces mesures, l'incidence du paludisme ne cesse d'augmenter [10]. L'hypothèse d'une grande variabilité des populations parasites est émise. L'objectif de l'étude est de décrire la diversité génétique des souches de P.falciparum et la complexité des infections au niveau de treize sites du Niger. Nos résultats sont aussi discutés à la lumière d'autres études d'Afrique occidentale.

## MÉTHODOLOGIE :

### 1. Les sites d'étude :

Cette étude a été conduite au niveau de 13 centres de santé intégrés (CSI) du Niger. Les coordonnées géo référencées de tous les sites ont été relevées : Il s'agit de Liboré, Gotheye, Saga, Konni, Bangui, 17 Portes, Chadoua, Dispensaire, Mirria/Tirmini, Sasoumbroum, Arlit, Dagamanet, et Gaya/Yello. Les coordonnées géo référencées de ces sites ont permis d'établir la carte 1. Ces sites sont représentatifs de la situation épidémiologique du paludisme au Niger. Au Niger, le paludisme est endémique avec une recrudescence en saison des pluies (Juillet-Octobre). Anopheles gambiae est le principal vecteur du paludisme. Plasmodium falciparum est le parasite le plus fréquent. Les principales cibles du paludisme sont les enfants de moins de cinq ans, la femme enceinte et les personnes immunodéprimées.



**Carte 1** : Situation géographique des sites de l'étude

### 2. Echantillonnage et période de collecte :

Douze mille six cent quatre vingt neuf (12. 689) sujets suspectés de paludisme ont été examinés. Chaque patient a subi un examen biologique de confirmation par test de diagnostic rapide (SD Bioline HRP II Malaria Antigen®). Une goutte épaisse, un frottis mince et un sérobuvar (une goutte de sang sur un papier filtre de marque Wattman III) ont été confectionnés. Les échantillons ont été collectés pendant la saison de forte transmission. 510 échantillons positifs ont

été sélectionnés de façon aléatoire.

### 3. Extraction d'ADN :

L'extraction de l'ADN des échantillons positifs était faite au moyen du kit Quiagen (DNA Quiamp®, QUIAGEN). Brièvement, la procédure comprend quatre grandes étapes : Une digestion enzymatique à la protéase, suivie de l'adsorption de l'ADN sur la membrane de silica gel d'un collecteur. Après un double lavage avec les tampons AW1 et AW2, l'ADN est élué grâce au tampon AE. Les échantillons sont aliquotés, numérotés et conservés à -20°C.

### 4. Génotypage des souches par PCR nichée :

Le protocole utilisé est décrit dans le bulletin de l'OMS [8]. En résumé, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a permis d'analyser le génotype des souches en amplifiant le block2 de msp1 et la région variable centrale de msp2. Des amorces spécifiques des différentes familles alléliques ont permis de distinguer les allèles[8].

### 5. Electrophorèse

Tous les produits PCR sont mélangés à 2µl de bleu de charge et migrés sur un gel d'agarose à 2% contenant 1µl de bromure d'éthidium. Le générateur de courant est réglé à 120 volts pendant 45 mn. Un marqueur de poids moléculaire (100 paires de base) sert d'échelle et la taille des bandes est déterminée automatiquement par le logiciel infinity Capt du transilluminateur UV de marque BIORAD®.

### 6. Analyse des données :

Toutes les données sont saisies dans un fichier Excel et analysées avec le logiciel EPI 6 info version 2010. 2.3. La distribution des familles alléliques est déterminée dans la population parasitaire. Celle des allèles aussi déterminée dans chaque site et groupe d'âge. La fréquence d'un allèle est calculé comme étant le pourcentage relatif de cet allèle dans l'ensemble des isolats.

La complexité des infections (nombre minimal de génotype par individus) est déterminée en divisant le nombre total de fragments msp1 et msp2 détectés par le nombre total d'échantillons ayant amplifiés. La complexité des infections est définie comme étant le nombre de parasite par isolat.

## RÉSULTATS :

### 1. Caractéristique d'échantillonnage :

Cinq cent dix (510) échantillons provenant de 13 sites sont génotypés avec les marqueurs msp1 et msp2.

Quarante (40) échantillons tirés au hasard sont génotypés par site. L'âge moyen des patients est de 8,3 ans. La densité parasitaire moyenne est de 12.646 P/µl. Le sex-ratio est de 0,72.

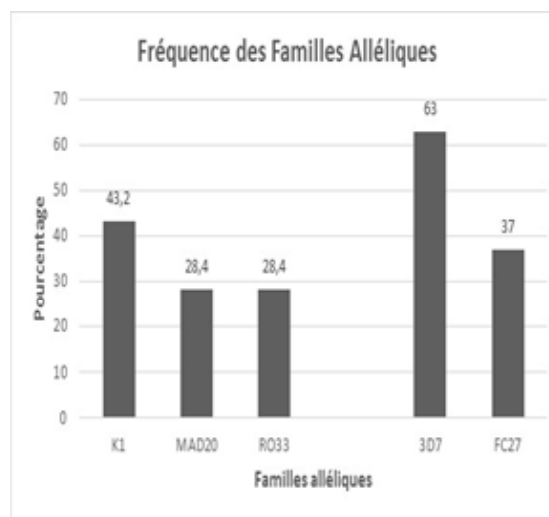
### 2. Diversité génétique des souches :

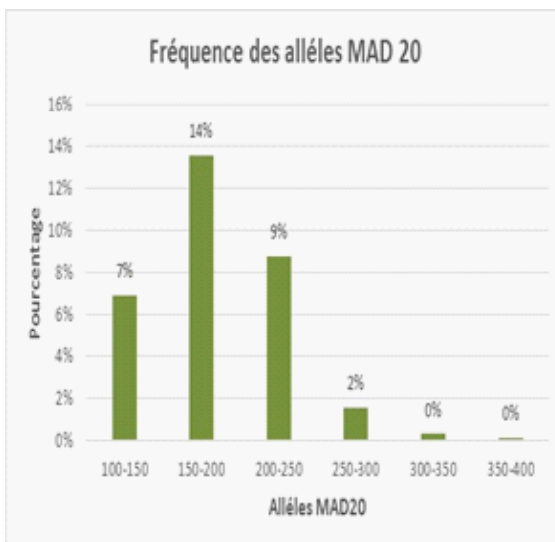
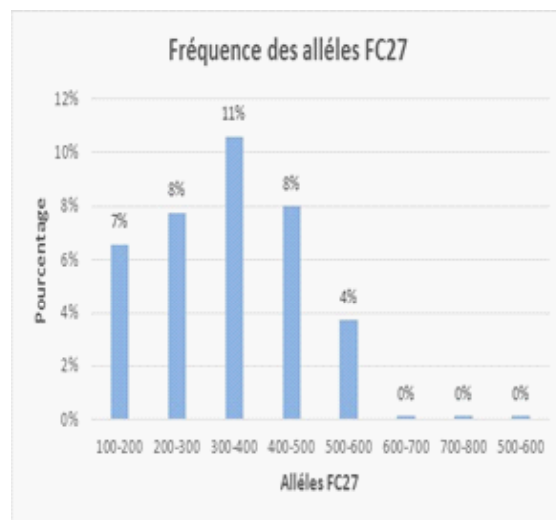
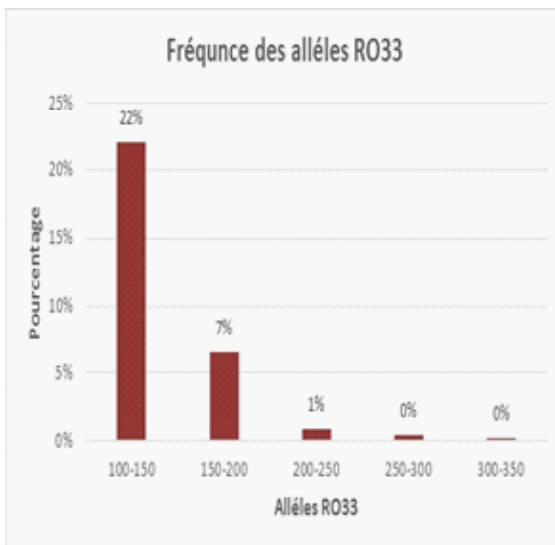
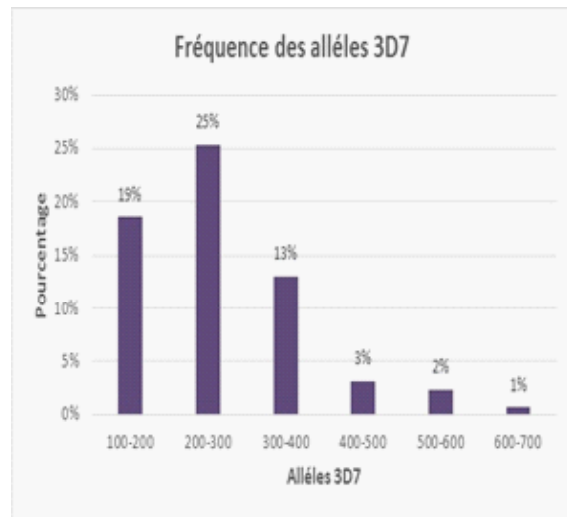
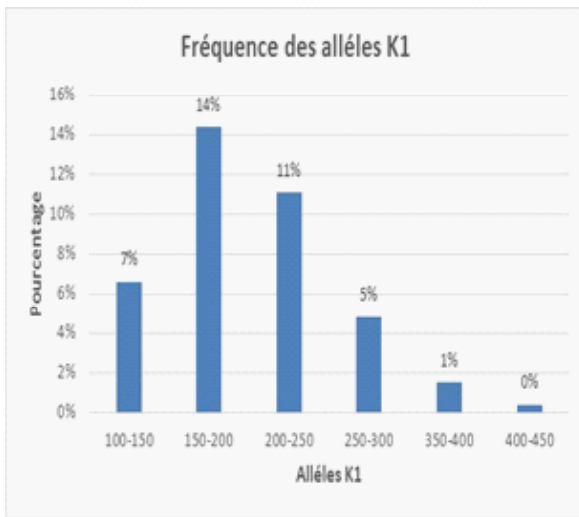
#### 2.1. Le nombre d'allèles détectés :

Une très grande diversité génétique est observée aussi bien avec le marqueur msp1 que le marqueur msp2. Il existe 17 allèles différents de msp1 dont six (6) de type K1, cinq (5) de type RO33 et six (6) de type MAD20. Il existe 14 allèles différents de msp2 dont six (6) de type 3D7 et huit (8) de type FC27. Il existe donc 31 allèles distincts dans la population parasitaire au Niger.

#### 2.2. Fréquence des familles alléliques et des allèles dans la population :

La fréquence d'un allèle est définie comme étant son pourcentage par rapport au nombre total d'allèles détectés dans l'ensemble des isolats. La proportion de chaque famille allélique dans la population parasitaire est déterminée. Celle des allèles est aussi déterminée dans la population parasitaire et dans chaque site. La famille allélique la plus fréquente dans la population étudiée est 3D7 (63%) suivie de K1 (43.2%). MAD20 (28.4%) et RO33 (28.4%) sont les familles alléliques les plus rares. La distribution des différentes familles alléliques puis celle des allèles au sein de la population parasitaire sont représentées par la Figure 1.

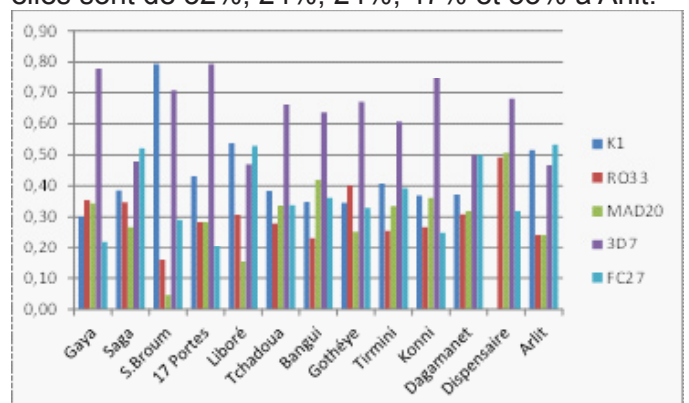




**Figure 1** : Distribution des familles alléliques et des différents allèles.

### 2.3. Distributions alléliques par site :

La distribution des allèles des gènes *msp1* et *msp2* est très variée selon le site. La figure 2 montre la distribution des allèles au niveau des 13 sites. Ces derniers sont classés sur l'histogramme du site de forte transmission (Gaya) vers le site de faible transmission (Arlit). A titre d'exemple, les prévalences de K1, RO33, MAD20, 3D7 et FC27 sont respectivement de 30%, 35%, 34%, 78% et 22% à Gaya. Par contre, elles sont de 52%, 24%, 24%, 47% et 53% à Arlit.



**Figure 2** : Distribution des allèles au niveau des 13 sites.

## 2.4. Fréquence allélique par âge et par sexe :

Les patients sont classés en deux groupes d'âges. Les enfants de moins de cinq ans et les patients de plus de cinq ans. La distribution des allèles est homogène et n'est pas affectée par les classes d'âges. Il n'y a pas de différence de distribution des fréquences alléliques selon l'âge ( $p < 0.05$ ).

La distribution des allèles n'est pas aussi affectée par le sexe des patients. A titre d'exemple la fréquence de l'allèle K1 est de 79% chez le sexe masculin contre 82 % chez le sexe féminin. Pour l'allèle FC27, les prévalences sont respectivement de 41% chez les garçons et 43% chez les filles.

## 3. Multiplicité des infections (MOI) :

La multiplicité des infections est mesurée par le MOI. Au Niger, Le nombre de clones varie de 1 à 5 clones par patient. 23% des infections sont polyclonales dont 18% biconales.

### 3.1. Multiplicité des infections selon les sites :

La multiplicité des infections (MOI) moyenne est de 2.8 au Niger. La complexité des infections varie de 2 au site de Dispensaire dans la région de zinder à 3.7 à Konni dans la région de Tahoua. Il y'a une différence significative de MOI selon les sites ( $p < 0.05$ ). La figure 3 représente la variation du MOI selon le site.

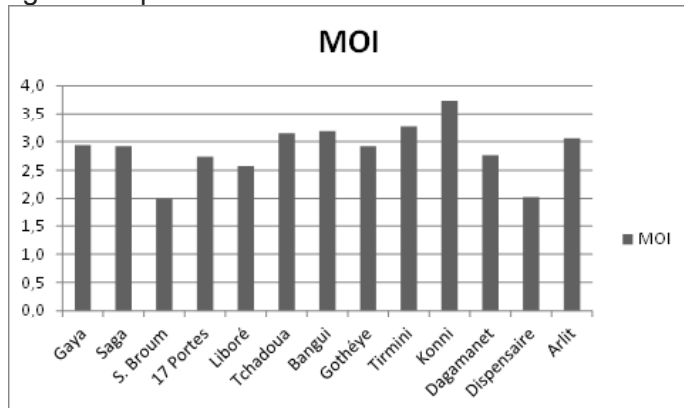


Figure 3 : Multiplicité des infections selon les sites

### 3.2. MOI selon l'âge et le sexe

La multiplicité des infections est de 2.06 chez les patients de moins de cinq ans et 2.12 chez les patients de plus de cinq ans. Il n'y a pas de différence de multiplicité des infections selon les classes d'âges ( $p = 0.4$ ).

Le sexe n'a pas d'influence sur la multiplicité des infections palustres. Le MOI est de 2.07 chez les filles et le nombre de clones par sujet varie de 1 à 5. Chez les garçons le MOI est 2.1 et le nombre de clones par patient varie de 1 à 6. Il n'y a pas de différence statistiquement significative de multiplicité d'infection entre les sexes.

### 3.3. Multiplicité des infections selon la latitude et

## la longitude

La variation de la multiplicité des infections selon la latitude et la longitude des sites d'étude n'est pas linéaire. La figure 4 montre respectivement la variation du MOI selon la latitude et la longitude des sites.

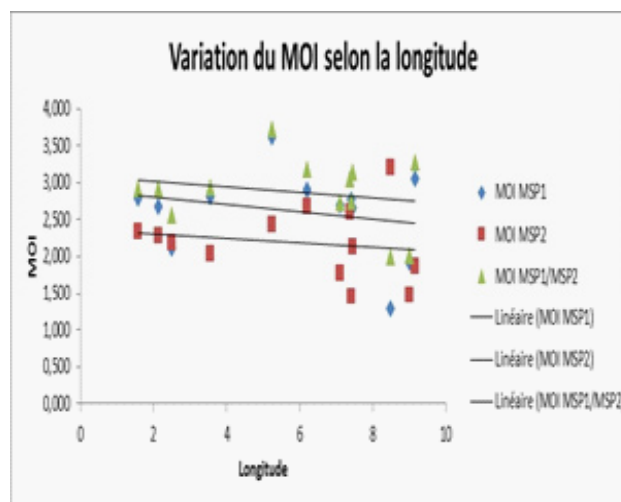
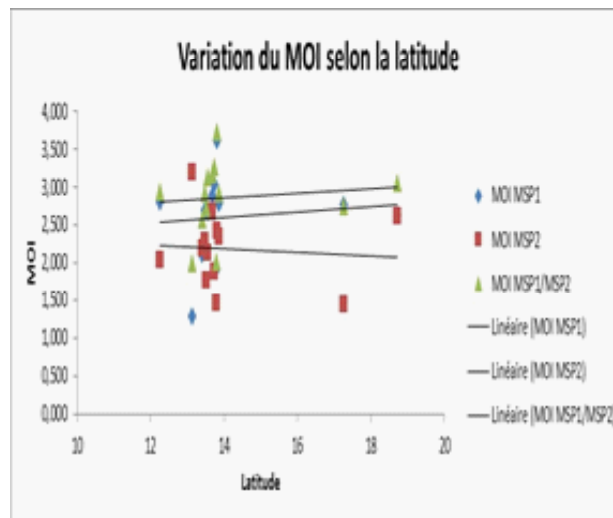


Figure 4 : Variation de la multiplicité des infections selon la latitude de et la longitude

## DISCUSSION :

Ce travail décrit pour la première fois la diversité génétique des souches de *P.falciparum* et leur complexité au niveau de treize sites représentatifs de la situation épidémiologique du paludisme du Niger. L'étude montre que la diversité génétique et la complexité des infections dépendent du site. Les deux marqueurs *msh1* et *msh2* sont très polymorphes car il y'a 17 allèles différents du gène *msh1* et 14 allèles différents du gène *msh2*. Des résultats semblables sont observés au Sénégal [13] et au Bénin où 23 allèles de type *msh1* et 12 allèles de type *msh2* sont rapportés [9]. La famille allélique la plus fréquente dans la population est 3D7 (63%) suivie de K1 (43.2%) et de FC27 (37%). Les familles alléliques les plus rares sont MAD20 (28.4%) et RO33 (28.4%). Ces dernières sont observées dans des proportions compara-

bles à Cotonou en saison des pluies [9]. En Côte d'Ivoire ce sont les familles alléliques FC27 (52%) et 3D7 (48%) qui prédominaient [11]. Par contre, au Burkina c'est la famille K1 qui était la plus répandue [12]. Les fréquences alléliques sont très différentes d'une famille à une autre et la distribution de ces allèles révèle la variabilité génétique présente dans la population parasitaire. Il y'a une différence statistiquement significative de la distribution des allèles entre les sites. En effet, ces zones correspondent à des situations épidémiologiques différentes du paludisme, liées à des facteurs écologiques locaux et à des intensités de transmission différentes. Plusieurs travaux en Afrique au sud du Sahara ont montré le polymorphisme des gènes msp1 et msp2 au niveau de deux pays comme la Tanzanie et le Burkina [14] ou même de deux villages d'un même pays comme Dielmo et Ndiop au Sénégal avec différente intensité de transmission palustre [15]. Il existe donc une hétérogénéité géographique des parasites.

Au Niger, 23% des infections sont polyclonales. Le nombre de clones par patient variant de 1 à 5. La multiplicité des infections moyenne est de 2.8 avec des valeurs extrêmes à Konni (MOI= 3.7), à S.Broum (MOI=2) et au Dispensaire (MOI=2). Ce qui place le Niger dans les zones de transmission méso endémique car la complexité des infections informe sur le niveau de transmission. Il y'a une différence significative de la complexité des infections selon les sites. Au Burkina, pays voisin du Niger, le nombre de clones par patient varie de 1 à 6 mais la proportion des infections multiples chez des patients en milieu urbain est plus marquée (96%) [12]. Au Ghana, le nombre de clones varie de 1 à 6. La prévalence des infections multiples est de 69.7% et le MOI moyen varie entre 2.2 et 2.3 [16]. En côte d'Ivoire où la transmission est hyper endémique, le nombre de clones varie de 1 à 10 par patient. Il y'a 86.5% d'infections multiples avec une complexité de 3.8 génotypes par infection [11].

La variation de la complexité génétique des infections n'est pas une fonction linéaire de la transmission. On pouvait s'attendre à des MOI décroissants du sud vers le nord en fonction de l'intensité de la transmission. En effet, des facteurs écologiques et environnementaux locaux comme la présence d'un fleuve, d'une marre, des systèmes d'irrigation pour la culture de contre saison, la profondeur de la mappe phréatique, la nature du sol, l'humidité relative interviennent dans le maintien d'une transmission forte et permanente. C'est le cas des sites de Konni, Mirrya, Madaoua où des canaux d'irrigation des cultures de contre saison et des marres permanentes expliquent un MOI très élevé. La présence du fleuve Niger à Gaya, Kollo, Tera a très certainement une influence sur des gîtes larvaires et l'entretien de la transmission. Par contre, la région de Zinder est caractérisée par son socle granitique et la sécheresse de son sol

a des MOI relativement faibles. Une situation exceptionnelle est celle d'Arlit qui mérite des investigations supplémentaires pour comprendre des niveaux de transmission relativement hauts.

## CONCLUSION :

Cette étude montre qu'il y'a une très grande diversité génétique des souches de Plasmodium falciparum au Niger. Cette diversité varie selon le site. Le sexe et l'âge n'influencent pas la diversité génétique. Les infections multiples sont fréquentes au Niger. La multiplicité des infections dépend aussi du site. La relation entre la multiplicité des infections et l'intensité de la transmission n'est pas linéaire.

## REMERCIEMENTS :

Nous remercions la fondation AREVA pour avoir financé ce projet.

## CONFLITS D'INTÉRÊT :

Les auteurs déclarent qu'il n'y a aucun conflit d'intérêt.

## BIBLIOGRAPHIE :

1. OMS. OMS | Rapport 2012 sur le paludisme dans le monde [Internet]. WHO. [cited 2014 Sep 3]. [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/report/fr/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/fr/)
2. OCHA\_NIGER\_Bulletin Humanitaire Mensuel\_Novembre\_2013 - OCHA\_NIGER\_BH\_Novembre\_2013.pdf [http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/OCHA\\_NIGER\\_BH\\_Novembre\\_2013.pdf](http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/OCHA_NIGER_BH_Novembre_2013.pdf)
3. Picot S, Bienvenu A-L. Plasmodium vivax sera-t-il un autre tueur en série ? médecine/sciences. 2009 Jun;25(6-7):622-6.
4. Vilvie Manguin, Pierre Carnevale, Jean Moulchet et al. Biodiversity of Malaria in the World. John Libbey Eurotext; 468 p.
5. Khaminsou N, Kritpetcharat O, Daduang J. et al. Genetic analysis of the merozoite surface protein-1 block 2 allelic types in Plasmodium falciparum clinical isolates from Lao PDR. Malar J. 2011 Dec 17;10(1):371.
6. Labie D. Polymorphismes de Plasmodium vivax: Comment les interpréter ? Quelles incidences en santé publique aujourd'hui ? médecine/sciences. 2005 Feb;21(2):123-4.
7. Schoepflin S, Valsangiacomo F, Lin E. et al. Comparison of Plasmodium falciparum allelic frequency distribution in different endemic settings by high-resolution genotyping. Malar J. 2009;8(1):250.
8. Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C. et al.

Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ.* 1994;73(1):85–95.

9. Issifou S, Djikou S, Sanni A. et al. 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). *Bull Soc Pathol Exot.* 2001;94(2):195–8.

10. Doudou MH, Mahamadou A, Ouba I, et al. A refined estimate of the malaria burden in Niger. *Malar J.* 2012 Mar 27;11(1):89.

11. Silue KD, Felger I, Utzinger J. et al. Prevalence, genetic diversity and multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in school children in central Cote d'Ivoire. *Médecine Trop Rev Corps Santé Colon.* 2006 Apr;66(2):149–56.

12. Soulama I, Nébié I, Ouédraogo A. et al. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J.* 2009;8:135.

13. Zwetyenga J, Rogier C, Spiegel A. et al. A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999 juillet;93(4):375–80.

14. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S. et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2011;10:79.

15. Konaté L, Zwetyenga J, Rogier C. et al. Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999 Feb;93 Suppl 1:21–8.

16. Buchholz U, Kobbe R, Danquah I. et al. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection following intermittent preventive treatment in infants. *Malar J.* 2010;9(1):244.