



**HAL**  
open science

# Déterminants entomologiques de la transmission du paludisme dans la zone transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar dans un contexte d'élimination de *Plasmodium falciparum*

Victor Chaumeau

► **To cite this version:**

Victor Chaumeau. Déterminants entomologiques de la transmission du paludisme dans la zone transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar dans un contexte d'élimination de *Plasmodium falciparum*. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT047 . tel-01684277

**HAL Id: tel-01684277**

**<https://theses.hal.science/tel-01684277>**

Submitted on 15 Jan 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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Entomologie Médicale

École doctorale CBS2 n°168 - Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche UMR MIVEGEC

Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle

Déterminants entomologiques de la transmission du  
paludisme dans la zone transfrontière entre la Thaïlande  
et le Myanmar dans un contexte d'élimination de  
*Plasmodium falciparum*

Présentée par Victor CHAUMEAU

Le 21 novembre 2017

Sous la direction de Vincent CORBEL  
et Theeraphap CHAREONVIRIYAPHAP

Devant le jury composé de

Jean-Pierre DEDET, Professeur émérite, Université de Montpellier

Vincent CORBEL, Directeur de recherche, Institut de Recherche pour le Développement

Marc COOSEMANS, Professeur des Universités, Institut de Médecine Tropicale d'Anvers et Université d'Anvers

Claudio LAZZARI, Professeur, Université de Tours et Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte

Fabrice CHANDRE, Chargé de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement

François NOSTEN, Professeur, Université d'Oxford et Shoklo Malaria Research Unit

Président

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Assesseur

Assesseur



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

*Dédicace,*

A vida é um hospital  
Onde quase tudo falta.  
Por isso ninguém te cura  
E morrer é que é ter alta.

Fernando Pessoa

*A mon grand-oncle Newton Bernardes da Silva.*

# REMERCIEMENTS

---

Au Dr. Vincent Corbel, pour avoir encadré ce travail et dirigé cette étude, je présente mes remerciements les plus sincères ;

Au Pr. Theeraphap Chareonviriyaphap, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et encouragé dans mes études, je présente mes remerciements les plus respectueux ;

Au Pr. François Nosten, pour sa générosité, son charisme et son talent scientifique, j'adresse mes remerciements les plus respectueux ;

Au Pr. Pierre-Antoine Bonnet, pour son engagement à promouvoir et défendre la filière Innovation Pharmaceutique et Recherche de l'internat de Pharmacie et pour avoir soutenu mon projet professionnel, j'adresse mes remerciements les plus respectueux ;

Au Dr. Frédéric Simard et au Dr. Didier Fontenille, pour leur soutien, encouragements et conseils au cours de mon parcours professionnel, j'adresse mes remerciements les plus sincères ;

A toutes les personnes impliquées dans ce projet, en particulier aux membres de l'équipe STOPVEC (Dominique Cerqueira, Bénédicte Fustec, Selma Metaane, Céline Montazeau, Arun Kitti, Nittipha Kwansomboon, Tae et John Zadrozny), à l'équipe du SMRU (Chiara Andolina, Praphan Kittiphanakun, Saw Nay Hsel, Bilion, Slight, Kloloi, Aku, Micho, May Myo, Colley Paw, Clare Ling, Jordi Landier et Daniel Parker), aux communautés des villages de Htoo Pyin Nyar, Tar Au Ta, Ka Nu Hta et Htee Kaw Taw et à toutes les personnes que j'aurais oubliées, pour leur aide indispensable, j'adresse ma plus profonde gratitude ;

A toutes les personnes qui m'ont donné envie de m'engager pour la recherche scientifique et médicale, en particulier au Dr. Dominique Hermier, au Pr. Patrice Le Pape et au Dr. Yvon Sterkers, j'adresse mes remerciements les plus reconnaissants ;

A toute ma famille, en particulier mes parents, mes sœurs, Patrick, Evelyne et Morgane, pour m'avoir toujours soutenu et encouragé pendant mes études, j'adresse mes remerciements les plus reconnaissants ;

A ma grand-mère Marie-Lou, qui occupe une place toute particulière dans mon cœur, j'adresse ma tendresse la plus enfantine ;

A Philippe Paturel, pour m'avoir fait découvrir et aimé l'Asie du Sud Est, j'adresse mes remerciements les plus amicaux ;

Enfin, à ma femme Andréa Bothorel, pour m'avoir soutenu, aimé et encouragé tout au long de cette aventure, j'exprime mon amour éternel.

# TABLE DES MATIERES

---

Remerciements .....	2
Table des matières .....	3
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des abréviations.....	9
Préambule .....	10
I. Introduction .....	11
A. Epidémiologie du paludisme dans la zone transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar .....	11
1. Présentation générale de la zone .....	11
a) Ecologie et géographie.....	11
b) Les populations en présence .....	14
c) La problématique du paludisme .....	17
2. Les cadres nosologiques du paludisme .....	18
a) Le paludisme dans la population générale .....	18
b) Le paludisme chimio-résistant .....	20
c) L'infection asymptomatique en zone de faible endémicité.....	26
d) Le paludisme à <i>Plasmodium vivax</i> .....	28
3. Le contexte entomologique de la transmission .....	30
a) Les vecteurs anophéliens.....	30
b) Indicateurs entomologiques de la transmission .....	38
c) Les outils actuels de lutte anti-vectorielle et leurs limites.....	40
B. Élimination des souches de <i>Plasmodium falciparum</i> résistantes à l'artémisinine.....	45
1. État des lieux sur la résistance à l'artémisinine .....	45
2. L'élimination médicamenteuse ciblée de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	46
a) Les sept piliers de l'élimination.....	46
b) Le « poste palu » et l'accès universel au diagnostic et traitement précoce .....	48
c) Le traitement de masse et l'élimination du réservoir sous-microscopique.....	51
3. Les risques du programme d'élimination .....	54
a) Résurgence du paludisme et prémunition.....	54
b) Aggravation des résistances aux médicaments antipaludiques .....	55
C. Surveillance entomologique dans le contexte de l'élimination .....	56
1. Les indicateurs entomologiques .....	56
a) Le taux d'inoculation entomologique .....	56
b) La capacité vectorielle .....	57
2. Difficultés rencontrées pour la mesure des indicateurs .....	58
a) Les complexes d'espèces et la taxonomie .....	58
b) Le taux de piqûre et les techniques de collection.....	58
c) Les taux d'infection et les techniques de détection .....	59
3. Les modèles statistiques .....	60
a) Structure et caractéristiques des données entomologiques .....	60
b) Les modèles linéaires généralisés mixtes et multi-niveaux .....	61
c) Les systèmes d'équations d'estimation généralisée.....	63
D. Objectifs de la thèse.....	63
II. Matériels et méthodes .....	65

A.	Conception générale de l'étude .....	65
1.	Sélection des villages .....	65
2.	Intervention .....	66
3.	Suivi longitudinal.....	67
B.	Procédures de laboratoire pour l'analyse des échantillons entomologiques .....	68
1.	Description générale de la procédure.....	68
2.	Identification morphologique .....	69
3.	Extraction de l'ADN.....	70
4.	Identification moléculaire des espèces jumelles .....	70
5.	Détection du plasmodium.....	72
a)	Echantillons de référence .....	73
b)	Techniques de PCR en temps réel et choix des amorces .....	73
c)	Dilution en série.....	75
d)	Utilisation en routine .....	75
6.	Suivi de la résistance à la deltaméthrine, à la perméthrine et au DDT.....	76
a)	Test phénotypique de sensibilité .....	76
b)	Détection des mutations <i>kdr</i> .....	76
C.	Analyse et interprétation des données .....	77
1.	Mise au point des techniques de PCR quantitative en temps réel pour la détection du parasite dans les échantillons entomologiques .....	77
a)	Comparaison des performances aux faibles concentrations de parasite .....	77
b)	Quantification absolue de la charge en sporozoïtes.....	78
2.	Résistance aux insecticides .....	78
3.	Définition et calcul des indicateurs entomologiques.....	79
4.	Modélisation des indicateurs entomologiques.....	81
a)	Paramètres des modèles d'équations d'estimation généralisée .....	81
b)	Les covariables .....	82
III.	Chapitre1. Optimisation des techniques utilisées pour la détection de plasmodium dans les échantillons entomologiques .....	85
A.	Optimisation des conditions réactionnelles.....	85
B.	Comparaison des performances aux faibles concentrations .....	87
C.	Vérification des performances analytiques.....	90
IV.	Chapitre 2. Biologie et écologie des anophèles .....	93
A.	Biodiversité et abondance de l'entomo-faune anophélienne .....	93
1.	Identification morphologique .....	93
2.	Diversité spécifique au sein des complexes <i>Minimus</i> et <i>Dirus</i> et du groupe <i>Maculatus</i> .....	95
3.	Variations qualitatives et quantitatives .....	96
B.	Taux d'infection et charges parasitaires des vecteurs .....	102
1.	Taux d'infection .....	102
2.	Charges parasitaires.....	103
C.	Comportement trophique.....	105
1.	Les vecteurs primaires des complexes <i>Minimus</i> et <i>Dirus</i> et du groupe <i>Maculatus</i> .....	109
2.	Les vecteurs secondaires des groupes <i>Aconitus</i> , <i>Annularis</i> , <i>Barbirostris</i> et <i>Subpictus</i> .....	109
3.	Les autres espèces peu abondantes et/ou très zoophagiques .....	110
D.	Résistances aux insecticides utilisés pour la lutte anti-vectorielle.....	110
E.	La transmission résiduelle .....	116
V.	Chapitre 3. Dynamique et modalités des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme .....	118
A.	Valeurs moyennes et dynamique des indicateurs entomologiques .....	118

1.	Le taux de piqûre humain .....	118
2.	L'index sporozoïtaire.....	125
3.	Le taux d'inoculation entomologique .....	125
B.	Hétérogénéité de la transmission .....	125
C.	Facteurs déterminant l'intensité de la transmission.....	127
VI.	Chapitre 4. Impact du traitement de masse sur la transmission du paludisme .....	129
A.	Effet du traitement sur le taux d'inoculation entomologique .....	129
B.	Taux de couverture et effet prophylactique post-traitement de la pipéraqune.....	131
C.	Transmission de <i>P. falciparum</i> après le traitement de masse .....	132
VII.	Discussion .....	134
A.	Objectifs, principaux résultats et limites de cette étude .....	134
B.	Apport de notre étude pour comprendre l'épidémiologie du paludisme dans la zone.....	135
1.	Les systèmes vectoriels en présence du côté birman de la frontière .....	135
a)	Les vecteurs impliqués dans la transmission .....	135
b)	Importance de la transmission « résiduelle » .....	136
c)	Intensité et dynamique de la transmission .....	138
2.	Contribution du réservoir sous-microscopique à la transmission .....	140
3.	Déterminants entomologiques des résistances médicamenteuses .....	142
C.	Impact de l'intervention sur la transmission du paludisme .....	144
1.	Le traitement de masse .....	145
a)	Accélérateur de l'élimination.....	145
b)	Considérations pharmacologiques .....	145
c)	Résistances médicamenteuses .....	146
2.	Le poste palu .....	146
3.	Les moustiquaires .....	147
D.	Perspectives et pistes de réflexion pour la suite du programme d'élimination .....	148
1.	La mise en œuvre d'une surveillance à grande échelle pour documenter l'élimination .....	148
2.	La lutte anti-vectorielle et le contrôle de la transmission résiduelle .....	149
a)	La place de la LAV dans le contexte de l'élimination .....	149
b)	Les difficultés d'évaluer la LAV dans la zone.....	149
c)	Les stratégies .....	150
d)	Les résistances aux insecticides .....	152
3.	Apport de l'entomologie pour l'élimination de <i>Plasmodium vivax</i> .....	152
VIII.	Travaux issus de cette étude .....	154
A.	Articles .....	154
B.	Posters.....	154
C.	Communications orales.....	154
D.	Manuscrits en cours de préparation .....	155
IX.	Conclusion.....	206
	Bibliographie .....	208
	Annexe 1. Arbre décisionnel de prise en charge des patients au poste palu .....	236
	Annexe 2. Clé dichotomique simplifiée utilisée pour l'identification des anophèles .....	237
	Annexe 3. Valeurs moyennes des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme avant l'intervention.....	238
	Annexe 4. Résultats des analyses univariées pour les modèles du taux d'inoculation entomologiques .....	239

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure I.</b> Topologie de l'Asie du Sud-Est. ....	12
<b>Figure II.</b> Spectre d'action des différents médicaments antipaludiques. ....	24
<b>Figure III.</b> Distribution des espèces d'anophèles du sous-groupe <i>Minimus</i> . ....	32
<b>Figure IV.</b> Distribution des espèces d'anophèles du groupe <i>Maculatus</i> . ....	34
<b>Figure V.</b> Distribution des espèces d'anophèles du complexe <i>Dirus</i> . ....	36
<b>Figure VI.</b> Agent de santé communautaire en fonction dans un poste palu. ....	49
<b>Figure VII.</b> Cycle de vie de plasmodium. ....	50
<b>Figure VIII.</b> Dessin réalisé par les écoliers du village de KNH pendant les activités d'engagement communautaire. ....	54
<b>Figure IX.</b> Carte des villages et des sites de capture. ....	66
<b>Figure X.</b> Techniques de collection utilisées lors des enquêtes entomologiques. ....	68
<b>Figure XI.</b> Courbes d'amplification et de fusion obtenues avec cinq techniques différentes de PCR quantitative en temps réel pour la détection de plasmodium. ....	87
<b>Figure XII.</b> Diversité spécifique au sein du groupe <i>Maculatus</i> et des complexes <i>Minimus</i> et <i>Dirus</i> lors de l'enquête de pré-intervention. ....	96
<b>Figure XIII.</b> Abondance et diversité des anophèles en fonction du village et de la méthode de collection. ....	97
<b>Figure XIV.</b> Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode de capture sur sujet humain dans le village de HKT au cours de l'étude. ....	98
<b>Figure XV.</b> Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode capture sur sujet humain dans le village de KNH au cours de l'étude. ....	99
<b>Figure XVI.</b> Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode de capture sur sujet humain dans le village de TOT au cours de l'étude. ....	100
<b>Figure XVII.</b> Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode de capture sur sujet humain dans le village de TPN au cours de l'étude. ....	101
<b>Figure XVIII.</b> Taux d'infection des vecteurs. ....	103
<b>Figure XIX.</b> Histogramme des charges parasitaires. ....	105
<b>Figure XX.</b> Profil d'activité nocturne des différents groupes, complexes ou espèces d'anophèles collectés sur appât humain pendant l'étude. ....	107
<b>Figure XXI.</b> Profil d'activité nocturne des différents groupes, complexes ou espèces d'anophèles collectés sur appât animal pendant l'étude. ....	108
<b>Figure XXII.</b> Détection de la mutation <i>kdr</i> chez 10 espèces d'anophèles présentes dans la zone de l'étude. ....	115
<b>Figure XXIII.</b> Distribution des piqûres infectantes en fonction de l'heure et du lieu de la collection. ....	117
<b>Figure XXIV.</b> Hétérogénéité du taux de piqûre humain en fonction du site de collection. ....	120

<b>Figure XXV.</b> Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de HKT pendant l'étude. ....	121
<b>Figure XXVI.</b> Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de KNH pendant l'étude. ....	122
<b>Figure XXVII.</b> Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de TOT pendant l'étude. ....	123
<b>Figure XXVIII.</b> Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de TPN pendant l'étude. ....	124
<b>Figure XXIX.</b> Hétérogénéité de la transmission. ....	127
<b>Figure XXX.</b> Evolution de l'infectivité des vecteurs et de la prévalence sous-microscopique dans le contexte du traitement de masse. ....	130
<b>Figure XXXI.</b> Taux de couverture du traitement de masse en fonction du village et du nombre participation. ....	132

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1.</b> Résumé des études sur la résistance des anophèles aux insecticides en ASE continentale. ....	45
<b>Tableau 2.</b> Les sept piliers de l'élimination. ....	48
<b>Tableau 3.</b> Objectifs de la thèse et résultats attendus. ....	63
<b>Tableau 4.</b> Amorces utilisées pour les PCR d'espèces jumelles. ....	72
<b>Tableau 5.</b> Résumé des amorces utilisées pour la détection moléculaire de plasmodium dans les moustiques. ....	74
<b>Tableau 6.</b> Conditions réactionnelles optimales de la PCR déterminées par une analyse en mode gradient. ....	86
<b>Tableau 7.</b> Résultats de la comparaison des performances de différentes amorces aux faibles concentrations de parasite en fonction du type de prélèvement. ....	89
<b>Tableau 8.</b> Résultats des gammes de dilution réalisées à partir de suspensions calibrées de sporozoïtes de <i>P. vivax</i> . ....	91
<b>Tableau 9.</b> Résultats des gammes de dilution réalisées à partir de suspensions calibrées de sporozoïtes de <i>P. falciparum</i> . ....	92
<b>Tableau 10.</b> Résultat des identifications morphologiques pour les captures sur sujet humain. ....	94
<b>Tableau 11.</b> Résultat des identifications morphologiques pour les captures effectuées sur appât animal. ....	94
<b>Tableau 12.</b> Statistiques descriptives des charges parasitaires détectées dans les échantillons de routine. ....	104
<b>Tableau 13.</b> Comportement trophique des différentes espèces, groupes ou complexes d'anophèles collectés pendant l'étude. ....	106
<b>Tableau 14.</b> Résultats des tests de sensibilité effectués pour la deltaméthrine (0.05%). ....	112
<b>Tableau 15.</b> Résultats des tests de sensibilité effectués pour la perméthrine (0.75%). ....	113
<b>Tableau 16.</b> Résultats des tests de sensibilité effectués pour le DDT (4%). ....	114
<b>Tableau 17.</b> Résumé des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans les quatre villages de l'étude. ....	118
<b>Tableau 18.</b> Résultats du modèle de l'intensité de la transmission (TIE) en fonction des variables environnementales et parasitologiques pour <i>P. falciparum</i> . ....	128
<b>Tableau 19.</b> Résultats du modèle de l'intensité de la transmission (TIE) en fonction des variables environnementales et parasitologiques pour <i>P. vivax</i> . ....	128
<b>Tableau 20.</b> Résultats du modèle de l'intensité de la transmission en fonction du traitement de masse pour <i>P. falciparum</i> . ....	131
<b>Tableau 21.</b> Résultats du modèle de l'intensité de la transmission en fonction du traitement de masse pour <i>P. vivax</i> . ....	131
<b>Tableau 22.</b> Indicateurs de fonctionnement du poste palu en fonction du village pendant l'étude. ....	133

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ASE** : Asie du Sud-Est  
**CAA** : Capture sur Appât Animal  
**CSH** : Capture sur Sujet Humain  
**CTA** : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine  
**CTAB** : Cetyl TrimethylAmmonium Bromide  
**CV** : Capacité Vectorielle  
**DDT** : DichloroDiphenylTétrachloroéthane  
**DTP** : Diagnostic et Traitement Précoce  
**EEG** : Equations d'Estimation Généralisée  
**ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
**EMC** : Elimination Médicamenteuse Ciblée  
**G6PD** : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase  
**IDP** : *Internally Displaced People*  
**IPR** : Innovation Pharmaceutique et Recherche  
**IRD** : Institut de Recherche pour le Développement  
**IS** : Index Sporozoïtaire  
**ITS2** : *Internal Transcribe Spacer 2*  
**kdr** : *knock-down resistance*  
**LAV** : Lutte Anti-Vectorielle  
**MALDI-TOF** : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*  
**METF** : *Malaria Elimination Task Force*  
**MiVEGEC** : Maladies infectieuses et Vecteurs - Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle  
**MLGM** : Modèle Linéaire Généralisé Mixte  
**OMS** : Organisation Mondiale pour la Santé  
**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*  
**RR** : Risque Relatif  
**RRP** : Ratio de Réduction Parasitaire  
**SMRU** : *Shoklo Malaria Research Unit*  
**SPDC** : *State Peace and Development Council*  
**TdM** : Traitement de Masse  
**TIE** : Taux d'Inoculation Entomologique  
**TMC** : Temps Médian de Collection  
**TPH** : Taux de Piqûre Humain  
**TPA** : Taux de Piqûre Animal  
**UMR** : Unité Mixte de Recherche  
**ZTTM** : Zone Transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar

# PREAMBULE

---

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre l'UMR MiVEGEC (Institut de Recherche pour le Développement, IRD, Montpellier, France), la Shoklo Malaria Research Unit (SMRU, Maesot, Thaïlande) et l'Université de Kasetsart (Bangkok, Thaïlande). Elle s'inscrit dans un programme d'élimination du paludisme le long de la frontière entre la Thaïlande et le Myanmar qui est destiné à réagir face à la menace du paludisme à *Plasmodium falciparum* résistant à l'artémisinine. Ce programme a été initié en 2013 par le SMRU (Pr. F. Nosten), il est financé par la fondation Bill et Melinda Gates, le Fond Mondial et le Wellcome Trust. L'entomologie est l'un des sept piliers de la stratégie d'élimination mise en œuvre. Nous rapportons ici les résultats du volet entomologique de cette étude dirigée conjointement par le Dr. V. Corbel (IRD) et le Pr. T. Chaeronviriyaphap (Université de Kasetsart).

Cette thèse a été financée par l'Agence Régionale de Santé du Languedoc-Roussillon dans le cadre de la filière Innovation Pharmaceutique et Recherche (IPR) de l'Internat de Pharmacie et rendue possible grâce au soutien inconditionnel du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, du Pr. P.A. Bonnet coordinateur inter-régional de la filière IPR et de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à travers l'UMR MiVEGEC dirigée par le Dr. F. Simard et le Dr. D. Fontenille. Nous exprimons à ce titre nos remerciements les plus sincères à l'ensemble des collaborateurs, institutions et organisations impliqués dans ce projet.

L'objectif de ce travail est d'étudier les déterminants entomologiques de la transmission du paludisme dans la zone d'étude et particulièrement de mesurer l'impact de la stratégie d'élimination sur les indicateurs entomologiques de la transmission. Le résultat le plus marquant de notre étude est la forte corrélation observée entre la prévalence de l'infection asymptomatique et le taux d'infection des vecteurs qui explique l'effet de l'intervention (traitement de masse) sur l'intensité de la transmission.

# I. INTRODUCTION

---

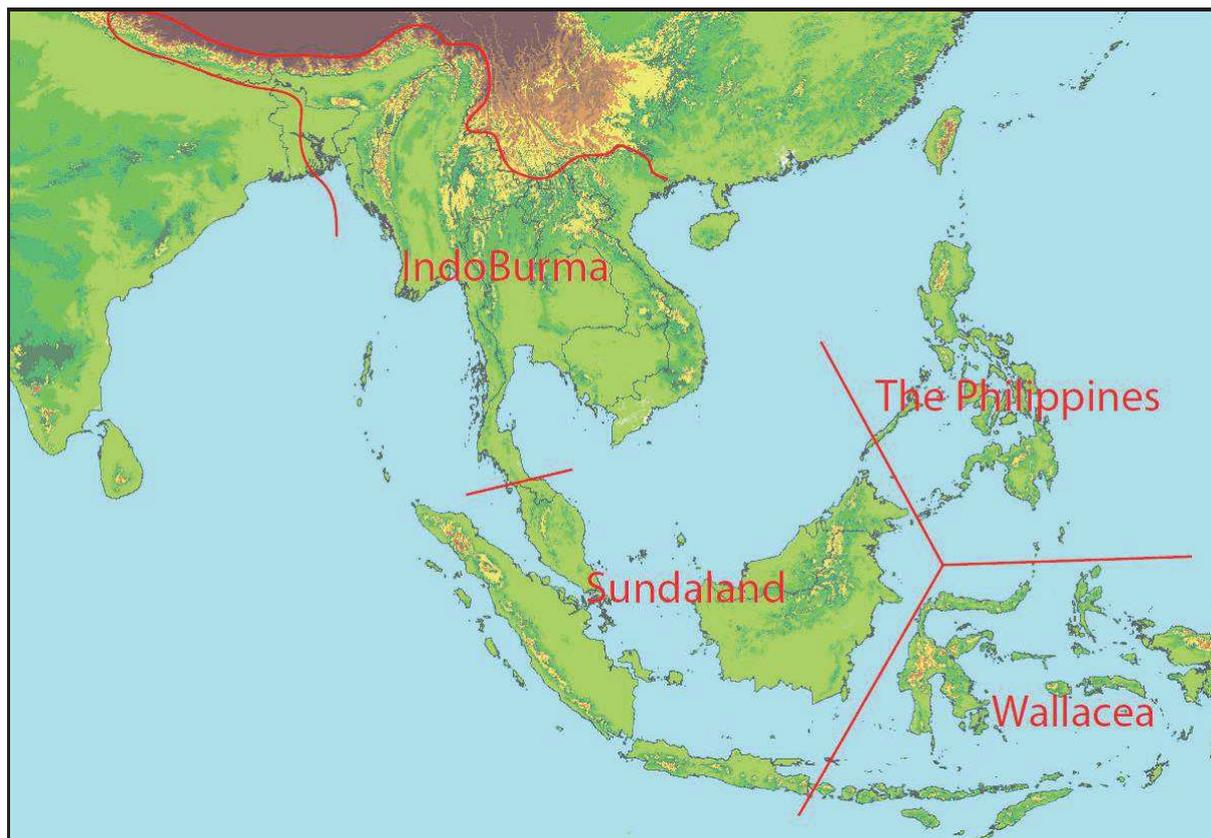
## A. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME DANS LA ZONE TRANSFRONTALIERE ENTRE LA THAÏLANDE ET LE MYANMAR

### 1. Présentation générale de la zone

#### a) Ecologie et géographie

##### (1) *L'Asie du Sud-Est*

L'écologie de l'Asie du Sud-Est (ASE) et ses corollaires pour comprendre l'entomologie du paludisme ont été revus par Morgan *et al.* (Morgan et al., 2013). L'ASE est une région qui s'étend depuis la frontière orientale de l'Inde jusqu'à l'Ouest de la Papouasie-Nouvelle-Guinée et du Sud de la Chine à l'Indonésie (**Figure I**). L'ASE est divisée en deux sous-régions : la sous-région continentale (Birmanie, Thaïlande, Laos, Cambodge, Vietnam et péninsule malaisienne) et la sous-région insulaire (Indonésie, Philippines, Malaisie orientale, Brunei, Singapour et Timor-Est). Sur le plan écologique, cette région est caractérisée par une très grande diversité des espèces et des écosystèmes (Round et al., 2003, Hughes et al., 2011, Woodruff and L.M., 2009). Il est possible de distinguer quatre zones biogéographiques différentes : l'IndoBurma, le Sundaland, le Wallacea et les Philippines (Myers et al., 2000) (**Figure I**). Ces zones biogéographiques ont été façonnées au cours du temps sous l'influence de facteurs géologiques et climatiques (Hall, 1998, Voris, 2000, Heaney, 1991, White et al., 2004, Janis, 1993). Localement, des facteurs écologiques ont joué un rôle très important en favorisant le processus de spéciation (Morgan, 2009, Morgan et al., 2010).



**Figure I. Topologie de l'Asie du Sud-Est (adaptée d'après Morgan et al., 2013).**

Il est possible de distinguer quatre zones biogéographiques en Asie du Sud-Est. La zone transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar est située dans la zone IndoBurma qui comprend l'ensemble des pays de la péninsule indochinoise à l'exception de la Malaisie.

## ***(2) La zone transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar***

La zone transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar (ZTTM) est située au centre de la zone IndoBurma (98°E) et s'étend sur plus de 1000 km du Nord (20°N) au Sud (10°N). La zone IndoBurma est isolée du reste de l'Asie par la chaîne de l'Himalaya (Hall, 1998). Au Sud, la ligne de Kangar-Pattani est une zone de transition écologique qui sépare la péninsule indochinoise du Sundaland (elle se situe proche de la frontière entre la Thaïlande et la Malaisie) (Round et al., 2003, Hughes et al., 2011, Woodruff and L.M., 2009). La Thaïlande est séparée du Myanmar par le Tenasserim, une chaîne de petites montagnes très anciennes qui s'étend du Sud du Laos jusqu'à la Malaisie. C'est une zone de « suture » qui fait office de barrière écologique entre le Myanmar et la péninsule indochinoise (Morgan et al., 2011). La ZTTM est aussi une zone de transition écologique, entre la forêt tropicale humide de la péninsule malaisienne (2°N) et la forêt tempérée caduque du nord de la Thaïlande (12°N). Les

plaines alternent avec des montagnes forestières dont l'altitude varie entre 600-1500m. Le climat de la zone IndoBurma est particulier : pendant les mois d'hiver (Décembre-Février) un vent du Nord-Est froid et sec souffle depuis les systèmes de haute-pression atmosphérique installés au-dessus de l'Asie continentale, c'est la saison sèche. Au printemps (Mars-Mai), cet anticyclone faiblit et les vents changent de direction. Des masses d'air chaud chargées d'humidité sont portées par les vents du Sud-Ouest venant de l'océan Indien. Ces masses d'air provoquent des pluies abondantes et saisonnières, c'est le phénomène de la mousson (Juin-Novembre).

### **(3) Les corollaires en matière d'entomologie du paludisme**

La biodiversité de l'entomo-faune anophélienne reflète l'histoire évolutive de la région : une trentaine d'espèces d'anophèles sont des vecteurs du paludisme (Sinka et al., 2011, Saeung, 2012, Rattanarithikul et al., 2006) et les espèces appartiennent souvent à des complexes d'espèces jumelles (*i.e.* espèces identiques sur le plan morphologique mais bien distinctes sur le plan génétique) (World Health Organization, 2007). Les variations de l'habitat et du comportement trophique des différentes espèces vectrices sont très importantes et déterminent localement une partie des modalités et de la dynamique de transmission du paludisme (donc l'efficacité des stratégies de lutte anti-vectorielles) (Manguin and Boëte, 2011). L'étude des systèmes vectoriels est par ailleurs compliquée par l'hétérogénéité du comportement et de la capacité vectorielle d'une espèce donnée en fonction du site d'étude (Trung et al., 2005, Sinka et al., 2011). La distribution de *An. maculatus* (*s.s.*) et *An. sawadwongporni* est limitée à l'Ouest par la frontière occidentale de l'IndoBurma (Morgan et al., 2013). Les complexes *An. minimus* (*s.l.*) et *An. fluviatilis* (*s.l.*), très proches d'un point de vue phylogénétique, ont une distribution parapatrique le long de cette frontière : *An. minimus* (*s.l.*) est retrouvé du côté oriental alors que *An. fluviatilis* (*s.l.*) est un vecteur dominant sur le sous-continent indien et dans les pays voisins (Sinka et al., 2011). Certaines espèces jumelles ont une distribution parapatrique le long de la ZTTM avec (*An. dirus* (*s.s.*) et *An. baimaii*) ou sans superposition (*An. rampae* et *An. sawadwongporni*) (Morgan et al., 2013). Elle sépare également des lignées distinctes au sein d'une espèce donnée en isolant génétiquement les populations en présence d'un côté et de l'autre de la frontière (*An. splendidus*, *An. minimus* et *An. annularis*) (Morgan et al., 2011). A cette zone de transition écologique s'ajoute la mer

qui sépare la péninsule indochinoise et l'ASE insulaire. Cette barrière physique limite la dispersion des espèces. Par exemple, au sein du groupe *Leucosphyrus*, *An. dirus* (s.s.) et *An. baimaii* sont distribués sur la péninsule alors que *An. macarthuri*, *An. cracens*, *An. introlatus* et *An. latens* sont distribués sur la partie insulaire (Morgan et al., 2013). *Anopheles minimus* (s.l.) et *An. maculatus* (s.l.) sont largement distribués sur toute la péninsule indochinoise alors qu'ils sont rares dans le Sundaland (Morgan et al., 2013, Sinka et al., 2011). Brièvement, dans les deux autres zones biogéographiques que sont le Wallacea et les Philippines, le sous-groupe *Minimus* est absent et *An. flavirostris* est le principal vecteur (Sinka et al., 2011, Morgan et al., 2013). Les espèces jumelles des groupes *Leucosphyrus* et *Maculatus* y sont spécifiques (Morgan et al., 2013).

## **b) Les populations en présence**

### **(1) *Les minorités ethniques***

Le Myanmar est peuplé par plus de 135 minorités ethniques ayant chacune une culture, une histoire et un langage propre (Oxford Burma Alliance, 2017). Le groupe majoritaire est celui des Barmars. Ce groupe représente deux-tiers de la population totale, il contrôle le gouvernement central et l'armée. Les minorités ethniques représentent le tiers restant, les groupes principaux sont les Shans (10%), les Karens (9%), les Arakans (5%), les Mons (2,5%), les Chins (2%), les Kachins (1,5%) et les Karennis (0,8%). Ils vivent principalement dans les zones montagneuses le long des frontières internationales, en marge des grands états souverains, pour des raisons géographiques, politiques et culturelles (Scott, 2009). Les territoires occupés par les minorités ethniques sont très riches en ressources naturelles et représentent 65% de la surface du Myanmar (Human Welfare Foundation, 2010). Ces minorités vivent selon un mode de vie traditionnel (principalement de l'agriculture) dans des villages isolés et difficiles d'accès, parfois en quasi autarcie. Le long de la ZTTM, les minorités ethniques les plus représentées sont les Shans, les Karennis, les Karens et les Mons.

### **(2) *Les réfugiés***

Le conflit entre le gouvernement central et les minorités ethniques est très ancien (Smith, 1994, Scott, 2009). Sous prétexte que seul un pouvoir central est capable de restaurer la paix et l'unité nationale, le parti de la dictature militaire (*State Peace and Development*

*Council*, SPDC) a mené une politique d'assimilation brutale destinée à détruire l'identité et la culture des minorités ethniques entre les années 1980 et 2010 (Smith, 1994, Human Welfare Foundation, 2010). De nombreuses exactions ont été commises pendant la guerre civile : travail forcé, confiscation des terres, destructions de villages, exécutions et viols. Certains auteurs ont même parlé de génocide ou de nettoyage ethnique, cependant ces régions sont très difficiles d'accès ce qui rend les faits particulièrement difficiles à documenter. Par conséquent, des dizaines de milliers de personnes ont fui leur village pour trouver refuge dans les pays voisins ou dans les territoires défendus par certaines minorités alors puissantes sur le plan militaire. Cela a entraîné la création de nombreux camps de réfugiés et de personnes déplacées (*internally displaced peoples*, IDPs). Concernant la ZTTM, le nombre de réfugiés en Thaïlande n'a jamais dépassé 150000 personnes et ils sont actuellement moins de 100000 (The Border Consortium, 2017). Dix camps de réfugiés sont encore ouverts en Thaïlande dans les provinces de Chiang Mai (Kuang Jor), de Mae Hong Son (Ban Mai Nai Soi, Ban Mae Surin, Mae La Oon et Mae Ra Ma Luang), de Tak (Mae La, Umpiem Ma et Nu Bo), de Kanchanaburi (Ban Don Yang) et de Rachaburi (Tham Hin). Du côté birman de la ZTTM, il existe cinq camps de IDPs qui accueillent environ 8000 personnes : Loi Kaw Wan, Loi Sam Sip, Loi Lam, Loi Tai Lang et Ee Tu Hta. La population de réfugiés est composée principalement de Karens (80%), de Karrenis (10%), de Birmans (3%) et de Mons (<1%). Depuis la fin de la dictature militaire et la tenue d'élections libres en 2016, la situation et les problématiques auxquelles font face les réfugiés évoluent très rapidement. A noter qu'il existe d'autres populations de réfugiés qui sont accueillies par d'autres pays (ex. Kachin, Rohyngas).

### **(3) Les travailleurs migrants**

Enfin, le dynamisme économique de la région est un facteur important pour expliquer les flux de population sur la ZTTM. Selon les estimations, le nombre de travailleurs migrants venant du Myanmar varie entre quatre-cent-mille et deux millions. Ils seraient en fait 1,5 millions et la moitié n'aurait pas de permis de travail (United Nation Working Group on Migration in Thailand, 2014, Human Rights Documentation Unit, 2004). Les facteurs qui expliquent ces migrations sont à la fois attractifs (proximité entre la Thaïlande et le Myanmar, besoin de main d'œuvre bon marché en Thaïlande) et répulsifs (faible niveau économique et violation des droits de l'homme au Myanmar). Du fait que la plupart des migrants sont motivés

par des raisons à la fois économiques et politiques, il est difficile de distinguer les migrants économiques, les demandeurs d'asile politique et les réfugiés. Le gouvernement thaïlandais met en œuvre une politique de classification stricte et souvent arbitraire des migrants si bien que des personnes victimes de violations des droits de l'homme se voient refuser l'accès aux camps de réfugiés et à l'aide internationale (Human Rights Documentation Unit, 2004, Shan Women Action Network, 2003). Dans ce cas, ils n'ont pas d'autre choix que de tenter de rentrer illégalement dans les camps de réfugiés ou de devenir des travailleurs. Les migrants birmans arrivent en Thaïlande de différentes manières. Certains ont un permis de travail et séjournent pour la durée qui leur est accordée. D'autres entrent légalement par les postes-frontière de Mae Sot et Mae Sai avant de disparaître. Enfin, certains arrivent clandestinement par des points de passage officiels, en traversant la rivière à la nage ou en marchant des jours durant pour franchir les montagnes et les forêts. Ils sont encadrés par des passeurs auprès de qui ils sont souvent endettés dès leur arrivée en Thaïlande (United Nation Working Group on Migration in Thailand, 2014, Human Rights Documentation Unit, 2004). Une fois arrivés, la plupart des travailleurs migrants restent dans les villes proches de la frontière. En effet, il existe déjà une communauté birmane et voyager plus loin est risqué pour les migrants illégaux. Dans la seule ville de Mae Sot, il y aurait 100000 travailleurs migrants d'origine birmane employés dans quelques 130 usines, dans les plantations de fruits et légumes et dans les fermes d'horticulture environnantes (Human Rights Documentation Unit, 2004). De même, des milliers de Mons travaillent dans l'industrie de la pêche dans la ville frontalière de Maharchai au Sud de la ZTTM, alors que les Shans sont principalement présents au Nord (Human Rights Documentation Unit, 2004). Les travailleurs migrants en Thaïlande font face à de nombreuses difficultés et abus du fait du caractère informel de leur présence et/ou de leur grande précarité économique. Ils sont souvent employés pour des travaux dangereux et les conditions de travail sont très mauvaises. Les accidents sont fréquents et les travailleurs sont exposés à des niveaux très importants de produits toxiques tels que les pesticides agro-chimiques utilisés dans les plantations (Human Rights Documentation Unit, 2004). Tous les migrants partagent la peur d'être arrêtés et déportés. Cette peur les empêche de se déplacer librement et d'accéder au système de santé et aux services sociaux auxquels ils pourraient prétendre. Par ailleurs les employeurs gardent souvent le permis de travail de leurs employés ce qui les empêche de bénéficier de la sécurité sociale (consultation à l'hôpital pour 30 baths

soit 75 centimes). Les migrants illégaux ne bénéficient d'aucune protection sociale et ne peuvent pas s'offrir les prestations de santé dont ils ont besoin. Pour ces raisons, les migrants souffrent souvent en silence de maladies qu'il est pourtant facile de traiter. La barrière de la langue les empêche de demander de l'aide lorsqu'ils font face à des situations dangereuses. Cette combinaison de peur d'être arrêté et de manque de connaissances sur les lois, les coutumes et la langue de leur pays d'accueil fait que les migrants sont une population particulièrement vulnérable et marginalisée, facilement exploitée et abusée (Human Rights Documentation Unit, 2004).

### **c) La problématique du paludisme**

Lors du début de la crise des réfugiés des années 80, le paludisme a été identifié comme le principal problème de santé publique pour les populations vivant le long de la ZTTM (Decludt et al., 1991). L'incidence du paludisme était de 2 cas/personne/an (Decludt et al., 1991, Luxemburger et al., 1996) et cette maladie était une cause majeure de mortalité dans la population générale (Luxemburger et al., 1996, Luxemburger et al., 1997, Decludt et al., 1991). La région est un foyer historique de paludisme chimio-résistant particulièrement difficile à contrôler (Nosten et al., 1987, Looareesuwan et al., 1992, Wernsdorfer, 1994, Wongsrichanalai et al., 2001). Concernant les vecteurs et la prévention du risque d'exposition, la transmission résiduelle (*i.e.* piqûres infectantes qui ne sont pas prévenues par les moustiquaires imprégnées et par la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides) est un obstacle supplémentaire au contrôle du paludisme dans la région (Killeen, 2014, Corbel et al., 2013). Dans la suite de cette introduction, nous allons voir que l'endémicité du paludisme à *P. falciparum* a drastiquement diminuée dans la ZTTM depuis ces 20 dernières années. Cette diminution est multifactorielle, toutefois les moyens médicamenteux ont joué un rôle majeur (Carrara et al., 2013). De fait, l'émergence et la propagation des résistances aux derniers médicaments antipaludiques encore efficaces chez *P. falciparum* est un risque majeur de résurgence de la maladie (White, 2010, White, 2012, Dondorp and Ringwald, 2013). Cette situation justifie de mettre en œuvre une politique d'élimination rapide du paludisme à *P. falciparum* (Nosten, 2016). Par ailleurs, nous verrons que *P. vivax*, bien qu'il ne soit pas responsable de formes sévères du paludisme (Luxemburger et al., 1996, Luxemburger et al., 1997), représente un fardeau considérable pour les communautés exposées (Luxemburger et

al., 1996, Nosten et al., 1999, Poespoprodjo et al., 2009, Carrara et al., 2013). L'endémicité du paludisme à *P. vivax* est particulièrement difficile à contrôler, elle est restée très stable au cours des 30 dernières années (Carrara et al., 2013).

## **2. Les cadres nosologiques du paludisme**

### **a) Le paludisme dans la population générale**

#### **(1) *Evolution de l'endémicité palustre dans la ZTTM depuis les années 1980***

La ZTTM est une zone de faible endémicité palustre où la transmission est saisonnière, instable et hétérogène (Luxemburger et al., 1996). *Plasmodium falciparum* et *P. vivax* sont les espèces plasmodiales les plus fréquentes, *P. malariae* et *P. ovale* ne sont détectés qu'occasionnellement. La transmission de *P. falciparum* est généralement faible en ASE mais elle peut rapidement devenir épidémique lorsque plusieurs facteurs sont réunis (forte densité de population, pas d'accès aux traitements efficaces et/ou forte abondance de vecteurs) (Decludt et al., 1991). L'incidence du paludisme à *P. falciparum* a fortement chuté depuis le milieu des années 1990 passant de deux cas/personne/an à moins de 0.1 cas/personne/par an après 2010 (Carrara et al., 2013). Les causes de cette diminution sont multiples mais le développement économique, la déforestation et l'utilisation systématique des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont les facteurs principaux (Carrara et al., 2006, Carrara et al., 2013, Nosten et al., 2000). Par conséquent, *P. vivax* est devenu le parasite majoritaire et représente actuellement plus de 90% des infections (Carrara et al., 2013).

#### **(2) *L'intensité de la transmission et ses corollaires***

Le paludisme est symptomatique dans toutes les classes d'âge mais la distribution des cas est différente en fonction du parasite (Luxemburger et al., 1996). Pour *P. falciparum*, l'incidence augmente avec l'âge et atteint un maximum chez les hommes jeunes (20-30 ans). Pour *P. vivax*, l'incidence est maximale chez les enfants et diminue avec l'âge. Des antécédents de paludisme et un séjour hors du village sont des facteurs de risque. La complication la plus fréquente du paludisme est l'anémie. Les enfants et les femmes enceintes sont plus sensibles à l'anémie (Nosten et al., 1991b, Luxemburger et al., 1997) qui est souvent favorisée par un

état de malnutrition ou une hémoglobinopathie (Price et al., 2001). La prémunition est faible dans cette population, par conséquent l'infection par *P. falciparum* évolue rapidement vers une forme sévère lorsqu'elle n'est pas traitée (Decludt et al., 1991, Luxemburger et al., 1997). Le risque de faire un paludisme sévère diminue avec l'âge. Les enfants de moins de 5 ans ont un risque accru d'anémie sévère (hémoglobine <7g/dl) par rapport aux enfants de plus de 5 ans et aux adultes. Le risque d'atteinte neurologique augmente avec l'âge. Le taux de mortalité spécifique (nombre de cas mortels/nombre de cas) est de 0.2-0.3% (Luxemburger et al., 1997, Malaria Elimination Task Force, 2017). Dans la ZTTM, les femmes enceintes ont un risque trois fois supérieur de paludisme par rapport aux femmes non enceintes (Luxemburger et al., 1996, McGready et al., 2012). Les patients co-infectés (par *P. falciparum* et *P. vivax*) ont un risque 4.2 fois moindre (Luxemburger et al., 1996).

### **(3) Le diagnostic et le traitement précoce des cas symptomatiques incidents**

Depuis le milieu des années 1980, différents programmes ont été mis en œuvre pour diminuer l'incidence du paludisme. Rapidement, le diagnostic rapide et le traitement précoce (DTP) des cas symptomatiques s'est avéré être la stratégie la plus efficace pour lutter contre la maladie, d'une part en diminuant l'incidence et d'autre part en limitant les complications en particulier l'évolution vers les formes sévères (Decludt et al., 1991, Carrara et al., 2006, McGready et al., 2012). En effet, lors de l'infection par *P. falciparum*, les gamétocytes matures (responsables de la transmission homme-vecteur) apparaissent généralement plus de 14 jours après le début des symptômes (Jeffery and Eyles, 1955, Stepniewska et al., 2008). Dans une étude réalisée dans la ZTTM en 1999, seulement 2.4% des patients faisant un accès palustre simple à *P. falciparum* étaient gamétocytemiques à l'admission et des gamétocytes se sont développés dans 3% des cas après le traitement (dans 89% des cas >14 jours) (Price et al., 1999). A noter que lorsque l'infection n'est pas traitée rapidement, la proportion de patients gamétocytemiques augmente rapidement 3 jours après l'apparition des symptômes. Si l'infection est traitée dans les 48 heures qui suivent le début de la fièvre, le parasite est éliminé avant l'apparition des gamétocytes matures dans le sang du patient et la transmission homme-vecteur du parasite est ainsi évitée. Lorsque cette stratégie est appliquée à l'ensemble d'une population, cela permet de diminuer rapidement l'incidence du paludisme

et d'interrompre progressivement le cycle de transmission du parasite (Nosten et al., 2000, Carrara et al., 2006). A noter que dans l'étude de Nosten *et al.*, le taux d'infection des vecteurs est rapidement passé de 0.3% avant 1994 à 0% en 1994 suite à l'utilisation du traitement artésunate-méfloquine en première ligne dans le cadre du DTP dans les camps de réfugiés (Nosten et al., 2000). Cela suggère que la dynamique du taux d'infection des vecteurs anophéliens reflète celle des indicateurs clinico-épidémiologiques du paludisme dans les populations humaines (prévalence et incidence) et que les CTA ont un impact très fort et rapide sur la transmissibilité de *P. falciparum*.

L'histoire naturelle de l'infection par *P. vivax* est très différente. Les gamétocytes apparaissent rapidement et généralement avant le début des symptômes (Jeffery, 1952). Dans une étude réalisée dans la ZTTM, 84% des patients faisant un accès palustre simple à *P. vivax* étaient gamétocytemiques à l'admission (Douglas et al., 2013). Par ailleurs, des formes quiescentes de *P. vivax* persistent dans le foie (hypnozoïtes) et sont responsables de rechutes à distance de l'épisode primaire. Les hypnozoïtes ne sont pas éliminés par les traitements de première intention (White and Imwong, 2012). Le diagnostic et le traitement précoce des cas symptomatiques n'a donc pas d'impact sur l'endémicité de *P. vivax* qui est, de fait, particulièrement difficile à contrôler (Carrara et al., 2006, Carrara et al., 2013).

## **b) Le paludisme chimio-résistant**

### **(1) *Résistances médicamenteuses chez P. falciparum***

Ce qui caractérise avant tout le paludisme dans la ZTTM est la résistance de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques (Wongsrichanalai et al., 2001, Carrara et al., 2009, Phyo et al., 2016). Les résistances médicamenteuses ont des conséquences dramatiques sur la morbidité et la mortalité du paludisme (Trape, 2001, White, 2010). En effet, les résistances médicamenteuses entraînent *de facto* une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques, donc du nombre de porteurs de gamétocytes. A noter que le risque relatif d'être gamétocytemique est deux fois plus important lorsque l'infection est recrudescence (Price et al., 1999). L'augmentation de l'intensité de la transmission se traduit par une augmentation du nombre des cas, alimentant ainsi le cercle vicieux des résistances. Les souches de *P. falciparum* qui sont transmises dans la zone ont développé des résistances à

tous les antipaludiques connus. La chloroquine, l'amodiaquine et l'association sulfadoxine-pyriméthamine sont inutilisables depuis le milieu des années 1980 (Meek et al., 1986). Une diminution de la sensibilité à la quinine a également été rapportée (Pukrittayakamee et al., 1994, Looareesuwan et al., 1992). Entre les années 1990 et 2000, des résistances se sont développées contre la plupart des autres molécules d'utilisation plus récente, en particulier contre la méfloquine (Brockman et al., 2000, Nosten et al., 1991a, Nosten et al., 2000) et l'halofantrine (ter Kuile et al., 1993). A noter que le niveau de résistance à la méfloquine est extrêmement élevé sur la ZTTM et que le risque de résistance est croisé avec la luméfántrine qui appartient à la même famille chimique (Veiga et al., 2011).

## **(2) Les traitements combinés à base d'artémisinine**

Afin de traiter efficacement ces souches résistantes de *P. falciparum*, des protocoles thérapeutiques particuliers ont été développés : ce sont les CTA (White, 1999, Nosten and White, 2007, White, 1998). Les CTA ont été développés en s'appuyant sur des arguments rationnels qui prennent en compte les propriétés pharmacologiques (*i.e.* pharmacocinétique et pharmacodynamie) des antipaludiques (White, 1997, White, 1999), ainsi que les mécanismes connus d'émergence et de sélection des résistances médicamenteuses (White, 1999, White, 2004).

### **(a) Rationnel biologique**

En ce qui concerne les résistances médicamenteuses, le modèle est le suivant : la résistance se développe principalement pendant la phase endo-érythrocytaire du cycle de vie de plasmodium et en deux phases discrètes (émergence et dissémination) (White, 1998, White, 1999, White, 2013a, Barnes and White, 2005). Le mécanisme génétique en cause est la survenue d'une ou plusieurs mutation(s) ponctuelle(s). L'émergence d'un parasite résistant et viable a lieu *de novo* (lors de la réplication de l'ADN pendant la schizogonie) et spontanément (en présence ou en l'absence d'une pression de sélection). Le clone résistant est ensuite sélectionné par une concentration subthérapeutique du médicament dans le sang qui lui confère un avantage sélectif vis-à-vis de sa transmission au vecteur, c'est la phase de dissémination. La fréquence d'émergence dépend de la molécule antipaludique considérée (la fréquence la plus élevée est  $10^{-12}$  pour la mutation ponctuelle du cytochrome b qui confère une résistance à l'atovaquone). La probabilité qu'un parasite résistant et viable émerge

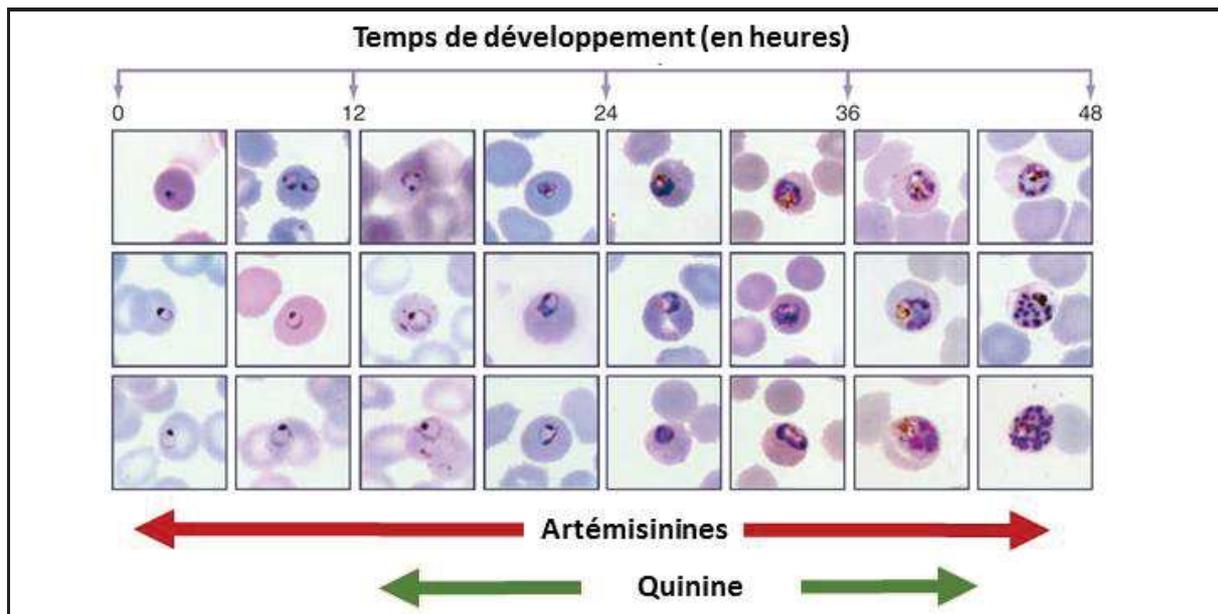
dépend de la fréquence de mutation et de la biomasse parasitaire chez l'hôte (les formes hyperparasitiques sont donc à haut risque d'émergence de résistance) (White et al., 2009). Lorsque deux molécules antipaludiques sont associées, la fréquence à laquelle un clone résistant est susceptible d'émerger est le produit des fréquences de chacune des molécules. L'association de deux médicaments permet donc de diminuer drastiquement la probabilité de voir émerger un parasite résistant. L'étape de dissémination du clone résistant (transmission homme-vecteur) a été revue par Barnes et White en 2005 (Barnes and White, 2005). Elle dépend de la transmissibilité homme-vecteur du clone résistant. La mesure précise de la transmissibilité homme-vecteur est particulièrement difficile. Elle nécessite de quantifier précisément la gamétocytémie à l'échelle individuelle pendant un suivi longitudinal rapproché (mais la prédiction de l'infectivité homme-moustique à partir des densités de gamétocytes observées peut être biaisée par plusieurs facteurs) ou bien de réaliser des infections expérimentales d'anophèles élevés au laboratoire et de compter le nombre d'oocystes qui se sont développés dans le tube digestif du moustique une semaine après le repas infectant. Quoi qu'il en soit, la transmissibilité homme-vecteur est déterminée par la capacité du clone résistant à produire des gamétocytes. L'effet des molécules antipaludiques contre les gamétocytes du parasite est donc un facteur important pour prévenir la transmission et éviter la dissémination du clone résistant. A noter que les mutations ne sont pas le seul mécanisme génétique impliqué dans le développement des résistances. D'autres mécanismes (recombinaison, variation du nombre de copies d'un gène, mécanismes épigénétiques etc.) sont probablement impliqués, par exemple en générant de la diversité génétique, en modifiant l'expression génique ou en sélectionnant les haplotypes résistants. Cependant, ces autres mécanismes sont encore très mal caractérisés et peu étudiés.

*(b) Rationnel pharmacologique*

Sur le plan pharmacologique, les CTA reposent sur l'association d'au moins deux molécules, l'une étant systématiquement un dérivé de l'artémisinine et l'autre un schizonticide tissulaire à longue durée d'action (White, 2013a). Les principaux CTA sont les associations artésunate-méfloquine, arthéméther-luméfantrine et dihydroartémisinine-pipéraquine (Nosten and White, 2007). L'utilisation des associations artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine et artésunate-amodiaquine est compromise par les résistances aux molécules partenaires. D'autres CTA sont en cours de développement (artésunate-proguanil-

atovaquone et artésunate-pyronaridine). L'utilisation opérationnelle des CTA pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* et à *P. vivax* a été revue par Nosten et White en 2007 et par Douglas *et al.* en 2010 respectivement (Nosten and White, 2007, Douglas et al., 2010).

L'artémisinine (molécule princeps d'origine naturelle) a été supplantée par la dihydroartémisinine (bien plus puissante) et ses dérivés hémi-synthétiques (arthéméther et artésunate). A noter que l'artémisinine, l'arthéméther et l'artésunate sont métabolisés *in vivo* en dihydroartémisinine. La principale caractéristique pharmacocinétique de ces molécules est leur faible demi-vie d'élimination (<1h). Les dérivés de l'artémisinine sont très actifs contre toutes les espèces de plasmodium et ont des propriétés pharmacodynamiques supérieures aux autres antipaludiques. Leur action est puissante et rapide : (i) ils diminuent par un facteur 10,000 la biomasse parasitaire à chaque cycle endo-érythrocytaire (contre 10-1000 pour les autres antipaludiques) et (ii) ils ont un spectre d'action très large sur les stades sanguins de *P. falciparum* (White, 2008b). En effet, la plupart des antipaludiques sont actifs sur les trophozoïtes matures, les schizontes et les gamétocytes jeunes (stade I-III). Les dérivés de l'artémisinine ont un spectre étendu aux trophozoïtes et aux gamétocytes de stade IV (**Figure II**). Enfin, ils sont très bien tolérés et peu toxiques (Nosten and White, 2007).



**Figure II. Spectre d'action des différents médicaments antipaludiques (adaptée d'après White, 2008b).**

Le développement endo-érythrocytaire de *P. falciparum* dure 48h pendant lesquelles le parasite se développe en passant par plusieurs formes parasitaires désignées par le terme générique « stades sanguins ». L'artémisinine et ses dérivés sont actifs pendant la quasi totalité du cycle endo-érythrocytaire, depuis les formes en anneau observées au début du cycle jusqu'aux schizontes matures. Les autres médicaments (ex. la quinine) sont actifs à partir de la 12<sup>ème</sup> heure et jusqu'à la 42<sup>ème</sup> heure.

Les molécules partenaires utilisées dans les CTA ont une action moins puissante, moins rapide et sont généralement moins bien tolérées (Nosten and White, 2007). En revanche, elles ont une demi-vie d'élimination longue (>24 heures). Cela a permis de mettre au point des protocoles thérapeutiques de 3 jours qui sont très efficaces y compris sur les souches résistantes de plasmodium. L'artémisinine diminue la biomasse parasitaire d'environ cent millions de fois puis elle est rapidement éliminée de la circulation sanguine. La parasitémie résiduelle (<0.0001% de la biomasse parasitaire initiale) est éliminée par la molécule partenaire dont la concentration plasmatique est suffisante pour assurer un effet jusqu'au quatrième cycle asexué (7-8 jours après le début du traitement). Pendant cette phase, la molécule partenaire est la seule présente. Il existe donc un risque de sélection des résistances qui est néanmoins limité par (i) la faible biomasse parasitaire résiduelle et (ii) par les fortes concentrations plasmatiques qui permettent d'éliminer même les parasites résistants. A noter que l'artémisinine n'est jamais présente en monothérapie (Nosten and White, 2007).

(c) *Impact opérationnel*

Les CTA ont trois propriétés principales. Premièrement, ils ont une très bonne efficacité et sont très bien tolérés pour le traitement des accès palustres (Nosten and White, 2007, Price et al., 1998, van Vugt et al., 2000, van Vugt et al., 2002, Zwing et al., 2009b, Zwing et al., 2009a, Rijken et al., 2008, Phyo et al., 2011, Onyamboko et al., 2014, Nambozi et al., 2011, Nambozi et al., 2015, Nambozi et al., 2017, Pekyi et al., 2016). Deuxièmement, ils limitent le risque d'émergence des résistances et restaurent la sensibilité des souches résistantes à la méfloquine (Nosten and White, 2007, Nosten et al., 2000, White, 1998, White, 1999). Enfin, ils diminuent la transmission et l'incidence du paludisme (Nosten and White, 2007, Price et al., 1996, Nosten et al., 2000, Trape et al., 2011). De fait, ils sont maintenant recommandés par l'O.M.S. pour le traitement de première ligne dans tous les pays endémiques (World Health Organization, 2010).

**(3) *Problématique des résistances à l'artémisinine***

Les CTA permettent de traiter la plupart des infections si le parasite est sensible à au moins un des deux médicaments. Malheureusement la résistance à l'artémisinine a émergé et s'est implantée dans toute la région continentale de l'ASE (Dondorp et al., 2009, Ashley et al., 2014). Elle s'est d'abord manifestée par une augmentation du temps de clairance parasitaire (Dondorp et al., 2009) puis inéluctablement par des échecs thérapeutiques (jusqu'à 40% dans certains foyers de transmission au Cambodge) (Amaratunga et al., 2016, Phyo et al., 2016, Woodrow and White, 2017). Alors que le parasite devient résistant au dérivé de l'artémisinine, la molécule partenaire est plus exposée. Ainsi des résistances à la pipéraquline – la dernière molécule partenaire encore épargnée par les résistances - ont été décrites récemment au Cambodge et au Vietnam (Amato et al., 2017, Phuc et al., 2017, Thanh et al., 2017, Duru et al., 2015, Leang et al., 2015). Il est donc urgent d'éliminer *P. falciparum* de la région face à la menace de résurgence du paludisme. Enfin, nous insistons sur le fait que toutes les résistances aux médicaments antipaludiques ont émergé en ASE avant de disséminer vers l'Inde et l'Afrique (Roper et al., 2004). Par ailleurs, les souches de *P. falciparum* résistantes aux artémisinines peuvent infecter une grande diversité de vecteurs en particulier *An. gambiae*, le principal vecteur du paludisme en Afrique (St Laurent et al., 2015). La résistance à l'artémisinine est donc une menace pour le reste du monde. La problématique de

la résistance à l'artémisinine et de l'élimination sera détaillée plus en détail dans la deuxième partie de cette introduction.

## c) L'infection asymptomatique en zone de faible endémicité

### (1) *Histoire naturelle*

Quel que soit le niveau d'endémicité, l'infection palustre est souvent asymptomatique et se définit par le portage « sain » du parasite en l'absence de symptômes (Imperato, 1986, Koch, 1900, Stephens and Christophers, 1900, Bruce-Chwatt, 1959, MacDonald, 1926, Imwong et al., 2015a). L'infection asymptomatique peut persister pendant de longues périodes dans un état de quasi-équilibre (Fairley, 1947, Kitchen, 1949a, Molineaux and Dietz, 1999, Bruce et al., 2000a, Bruce et al., 2000b, Ashley and White, 2014, Waltmann et al., 2015). Des vagues de parasitémie de plus forte densité se succèdent et correspondent à l'émergence séquentielle de nouveaux variants antigéniques (Thomson, 1911, Fairley, 1947, Kitchen, 1949a, Kitchen, 1949b, Molineaux and Dietz, 1999, Scherf et al., 2008). L'histoire naturelle de l'infection asymptomatique est bien décrite chez les enfants et adultes africains infectés par *P. falciparum*. En zone de faible endémicité et pour les autres espèces de plasmodium, l'histoire naturelle de l'infection asymptomatique a fait l'objet de très peu d'études, sa dynamique et sa contribution à la transmission sont beaucoup moins bien comprises.

Dans les zones de forte endémicité, le seuil pyrogénique est élevé : des parasitémies de 10000 parasites/ $\mu\text{L}$  sont fréquemment asymptomatiques à cause du phénomène de prémunition. Par conséquent, une proportion importante des cas asymptomatiques est détectée avec les tests de diagnostic rapide ou avec la microscopie (Kitchen, 1949a). En zone de faible endémicité, l'infection asymptomatique se traduit généralement par une circulation sanguine du parasite à de faibles niveaux de parasitémie, proches voire en-dessous du seuil de détection de la microscopie (50 parasites /  $\mu\text{L}$  de sang). Lorsque le parasite circule à un niveau de parasitémie indétectable en microscopie, l'infection est dite sous-microscopique. En zone de faible endémicité, l'infection asymptomatique est généralement sous-microscopique. (Imwong et al., 2016).

## **(2) Phénomène des « hotspots »**

Il est important de noter que l'épidémiologie de l'infection asymptomatique est très hétérogène en zone de faible transmission. La prévalence de l'infection asymptomatique (généralement sous-microscopique) est très élevée dans certains villages (60-70%) et nulle dans d'autres villages (Imwong et al., 2015a). Ces villages où la prévalence de l'infection sous-microscopique est élevée sont appelés « hotspots » (point-chaud), ils sont suspectés de jouer un rôle important en alimentant le cycle de transmission du paludisme localement. Le phénomène des hotspots n'est pas bien compris et repose probablement sur des interactions complexes entre l'immunité de l'hôte, des facteurs génétiques du parasite et des facteurs entomologiques. Peu d'études ont été réalisées mais lorsque des collections entomologiques sont réalisées, l'abondance et/ou la diversité des vecteurs n'expliquent pas ces variations de prévalence. Dans un modèle mathématique, Pongtavornpinyo *et al.* ont déterminé qu'en zone de faible transmission, c'est la capacité vectorielle (CV) qui est le facteur déterminant pour la prévalence (Pongtavornpinyo et al., 2008). Il est possible que des variations locales de la CV jouent un rôle important pour l'établissement d'un hotspot. Ces observations posent la question de la contribution du réservoir sous-microscopique à la transmission et de la nécessité de traiter les porteurs asymptomatiques pour éliminer *P. falciparum* (Yekutieli, 1960, von Seidlein, 2014).

## **(3) Transmissibilité**

La transmission homme-vecteur du parasite nécessite qu'un vecteur compétent ingère au moins deux gamétocytes matures (stade V, mâle et femelle) lors d'un repas sanguin pris sur un hôte infecté (Garnham, 1966). La transmissibilité est une mesure quantitative de la transmission homme-vecteur qui intègre la prévalence du portage de gamétocytes dans la population humaine, la durée de l'infection, la maturité des gamétocytes et la quantité de gamétocytes dans le sang (gamétocytémie) (Barnes and White, 2005). Elle est influencée par des facteurs de l'hôte (immunité) (Buckling and Read, 2001, Akim et al., 2000) et du vecteur (compétence, taux de piqûre). On peut donc distinguer la transmissibilité intrinsèque de l'infection qui ne dépend que des facteurs liés au parasite (néanmoins relatifs à son environnement, l'hôte humain) et la transmissibilité extrinsèque qui prend en compte les déterminants entomologiques. L'infectivité des porteurs asymptomatiques de *P. falciparum*

et de *P. vivax* a été démontrée à plusieurs reprises en zone de faible et forte endémicité (Jeffery, 1960, Jeffery and Eyles, 1955, Ouédraogo et al., 2016, Schneider et al., 2007, Gaye et al., 2015, Lin et al., 2016, Alves et al., 2005, Coleman et al., 2004, Kiattibutr et al., 2016, Eyles et al., 1948, Boyd and Kitchen, 1936, Young et al., 1946, Watson, 1945). Cependant la contribution relative des porteurs asymptomatiques et des cas symptomatiques à la transmission ne fait pas l'unanimité et les résultats sont contradictoires. D'un côté le taux d'infection des vecteurs (nombre de moustiques infectés parmi un total de moustiques testés) et la densité d'infection (nombre d'oocystes produit dans chaque moustique infecté) diminuent lorsque la gamétocythémie diminue (Drakeley et al., 1999, Jeffery and Eyles, 1955). D'un autre côté, la prévalence de l'infection asymptomatique est supérieure à celle des cas symptomatiques et la durée de l'infection est plus longue chez les porteurs asymptomatiques. Par ailleurs, en zone de faible transmission, les caractéristiques de l'infection asymptomatique reflètent celles de l'infection symptomatique : toutes les classes d'âge sont concernées et elle est plus fréquente chez les hommes jeunes, la distribution des espèces plasmodiales et celle du marqueur moléculaire kelch13 de la résistance à l'artémisinine sont similaires chez les personnes symptomatiques et asymptomatiques (Imwong et al., 2015a). Cette observation suggère un lien direct entre le portage sous-microscopique et l'évolution vers une forme symptomatique. Cependant, aucune étude longitudinale n'a été réalisée et l'histoire naturelle de l'infection asymptomatique dans les zones de faible transmission reste largement méconnue. Cette hypothèse complique encore la relation entre la prévalence de l'infection asymptomatique et la transmission.

#### **d) Le paludisme à *Plasmodium vivax***

La proportion des cas de paludisme à *P. vivax* est inversement corrélée à l'endémicité du paludisme à *P. falciparum* (Mendis et al., 2001, Carter and Mendis, 2002). Dans les zones de forte endémicité (ex. Afrique tropicale), *P. falciparum* est l'espèce majoritaire (Rosenberg, 2007, Carter and Mendis, 2002). En Amérique du Sud, Océanie et ASE, *P. vivax* est la cause de 50-100% des cas (Price et al., 2007, Carter and Mendis, 2002, Mendis et al., 2001). *Plasmodium vivax* est directement responsable d'une morbidité importante : il provoque de la fièvre, de l'anémie (Price et al., 2007, Spencer, 1966, Rodriguez-Morales et al., 2006) et des complications lors de la grossesse (Price et al., 2009, Nosten et al., 1999, Poespoprodjo et al.,

2008, Anstey et al., 2009). *Plasmodium vivax* est aussi responsable d'une morbidité et d'une mortalité indirectes et différées, particulièrement difficiles à mesurer (Douglas et al., 2014). Certains auteurs ont décrit des accès palustres sévères à *P. vivax* parfois mortels (Barcus et al., 2007, Rodriguez-Morales et al., 2008, Tjitra et al., 2008, Price et al., 2009, Kochar et al., 2005, Kochar et al., 2009, Beg et al., 2008, Genton et al., 2008, Zingman and Viner, 1993). Ces formes sont très controversées : il semble que les cas mortels sont dus à des pathologies surajoutées et surtout à l'anémie chronique plutôt qu'à *P. vivax* directement. A noter que *P. vivax* semble atténuer la sévérité de *P. falciparum* (Luxemburger et al., 1997). Alors que l'endémicité du paludisme à *P. falciparum* a considérablement diminuée le long de la ZTTM au cours des trente dernières années, celle de *P. vivax* est restée très stable (Carrara et al., 2013). Plusieurs particularités biologiques permettent d'expliquer pourquoi ce parasite est particulièrement difficile à contrôler.

Les hypnozoïtes sont des formes quiescentes du parasite qui se développent dans le foie. Ils persistent pendant de nombreuses années et sont responsables de rechutes à distance de l'épisode primaire (Garnham, 1988, White and Imwong, 2012). L'intervalle entre les rechutes est variable en fonction l'origine géographique du parasite : il est de 3 semaines dans les régions tropicales et peut être supérieur à 6 mois dans les régions tempérées (White and Imwong, 2012). Dans certaines régions, la majorité des cas incidents sont dus aux rechutes. Le long de la ZTTM, les rechutes sont particulièrement fréquentes : Adekunle *et al.* ont estimé que 98% des cas incidents sont des rechutes (Adekunle et al., 2015). A noter que la réactivation des hypnozoïtes de *P. vivax* est souvent secondaire à une attaque clinique de *P. falciparum* (Imwong et al., 2011, Shanks and White, 2013), cet argument a été avancé par certains auteurs pour expliquer la diminution de l'incidence du paludisme à *P. vivax* qui est parfois observée secondairement au contrôle du paludisme à *P. falciparum* (Carrara et al., 2013). Actuellement, le seul traitement curatif de l'infection par *P. vivax* (*i.e.* qui permet d'éliminer les hypnozoïtes) est la primaquine (Baird and Hoffman, 2004). Cependant, l'OMS contre-indique l'utilisation de la primaquine chez les patients les plus à risque (femmes enceintes et enfants) (World Health Organization, 2010). En effet, la primaquine entraîne des effets secondaires gastro-intestinaux et peut provoquer une hémolyse chez les patients dont l'activité enzymatique en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est anormalement

basse. Par ailleurs, la compliance au traitement de 14 jours est mauvaise (Khantikul et al., 2009).

Les gamétocytes de *P. vivax* apparaissent très rapidement lors des cas symptomatiques incidents (Mendis et al., 2001, McKenzie et al., 2002) : 50-80% des patients sont gamétocytémiques lors d'un accès palustre à *P. vivax* (Awab et al., 2010, Ratcliff et al., 2007, Douglas et al., 2013) alors que seulement 10-40% sont gamétocytémiques lors d'un accès palustre à *P. falciparum* (Price et al., 1999, Stepniewska et al., 2008). De fait, il est beaucoup plus probable que l'infection soit transmise au moustique avant même que le patient consulte et qu'un traitement soit instauré (Jeffery, 1952). Par ailleurs les gamétocytes de *P. vivax* sont plus efficacement transmis que ceux de *P. falciparum* (Collins et al., 2002, Boyd and Kitchen, 1937) et la sporogonie (*i.e.* le développement des sporozoïtes dans le moustique) est plus rapide pour *P. vivax* que pour n'importe quelle autre espèce de plasmodium (Boyd, 1949).

Certains auteurs ont suggéré que l'utilisation des moustiquaires serait plus efficace pour interrompre la transmission de *P. vivax* que la transmission de *P. falciparum* (Galappaththy et al., 2007). Cependant, les moustiquaires n'ont pas ou peu d'effet sur *P. vivax* dans la plupart des zones où la transmission est instable (Galappaththy et al., 2007, Bockarie and Dagoro, 2006). Cela est probablement lié au comportement trophique des vecteurs (exophagie et activité diurne) (Bockarie and Dagoro, 2006) et/ou à la fréquence des rechutes.

### **3. Le contexte entomologique de la transmission**

#### **a) Les vecteurs anophéliens**

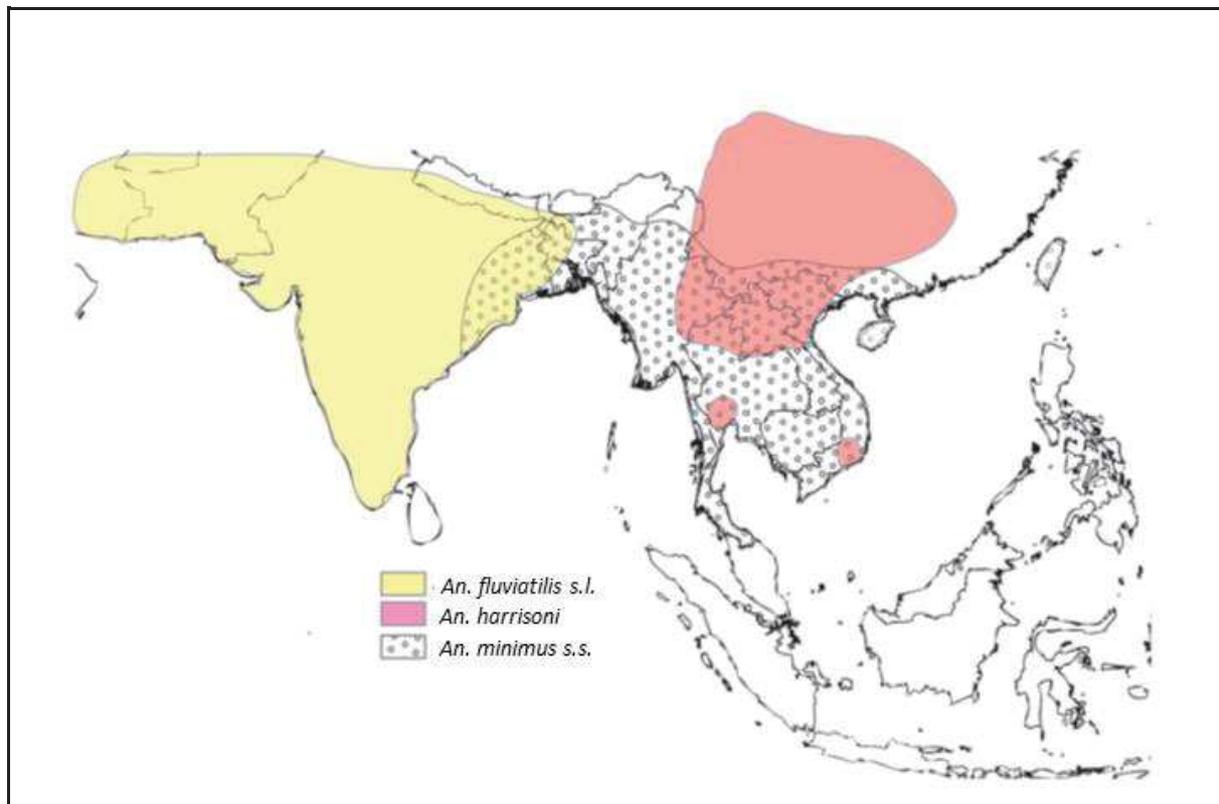
La biodiversité de l'entomo-faune anophélienne reflète la richesse écologique de la zone transfrontalière. Plusieurs études entomologiques ont été réalisées du côté thaïlandais de la frontière mais il n'existe pratiquement pas de données du côté birman. Parmi les 80 espèces d'anophèles décrites en Thaïlande (Saeung, 2012, Rattarithikul et al., 2006), une trentaine a été rapportée dans la zone d'étude (Rattarithikul et al., 2006, Saeung, 2012, Sriwichai et al., 2016b, Tananchai et al., 2012, Kengluetcha et al., 2005, Kongmee et al., 2012, Zollner et al., 2016, Kankaew et al., 2005, Tainchum et al., 2015). Certaines espèces au sein des complexes *Minimus* et *Dirus* et du groupe *Maculatus* sont les vecteurs primaires du paludisme dans la zone, ils sont responsables d'une transmission pérenne et efficace. Plusieurs autres espèces au sein des groupes *Funestus*, *Barbirostris* et *Annularis* sont

suspectées de jouer un rôle secondaire dans la transmission (Suwonkerd et al., 2013, Sinka et al., 2011, Saeung, 2012, Rattarithikul et al., 2006). A noter qu'il est particulièrement difficile de définir le statut vectoriel d'une espèce dans cette zone. Premièrement, l'identification précise des vecteurs nécessite de mettre en œuvre des techniques moléculaires afin de discriminer les espèces jumelles (World Health Organization, 2007). Deuxièmement, les taux d'infection et les charges parasitaires sont très faibles dans les populations sauvages d'anophèles, ce qui complique la détection de spécimens infectés (Imwong et al., 2011, Baker et al., 1987). Troisièmement, l'endémicité est faible et ne permet généralement pas d'établir une corrélation entre la présence ou l'abondance d'une espèce d'anophèle et l'incidence du paludisme. Enfin, une part importante de l'exposition aux vecteurs a lieu à l'extérieur des villages dans des sites où il est difficile de réaliser des enquêtes entomologiques (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998).

### **(1) Le complexe *Minimus***

Le complexe *Minimus* a fait l'objet d'une revue par Garros *et al.* en 2006 (Garros et al., 2006). Ce complexe fait partie du groupe *Funestus*, il est composé de trois espèces jumelles (*An. minimus* (s.s.), *An. harrisoni* et *An. yaeyamaensis*) dont deux ont été rapportées en Thaïlande (*An. minimus* (s.s.) et *An. harrisoni*) (Rattarithikul et al., 2006, Saeung, 2012, Suwonkerd et al., 2013). *Anopheles minimus* (s.s.) est largement distribué dans toute la région IndoBurma. La distribution de *An. harrisoni* est plus limitée et souvent sympatrique avec *An. minimus* (s.s.) (**Figure III**), cependant elle a probablement été sous-estimée du fait de l'apparition relativement récente des méthodes moléculaires permettant son identification. En Thaïlande, *An. harrisoni* a été détecté dans trois provinces (Chiang Mai, Tak et Kanchanaburi) (Rattarithikul et al., 2006). *Anopheles minimus* (s.s.) est un très bon vecteur du paludisme (Ratanatham et al., 1988, Farinaud et al., 1950, Weeks, 1954). Le statut vectoriel de *An. harrisoni* est plus incertain et probablement moindre (Garros et al., 2006). Aux espèces du complexe *Minimus* s'ajoutent d'autres espèces du groupe *Funestus* : trois espèces du sous-groupe *Aconitus* (*An. aconitus* (s.s.), *An. pampanai* et *An. varuna*) et une espèce du complexe *Culicifacies* (*An. culicifacies* B) (Suwonkerd et al., 2013, Sinka et al., 2011, Rattarithikul et al., 2006, Saeung, 2012). Certains auteurs ont évoqué le rôle secondaire de *An. aconitus* (s.s.) et *An. pampanai* dans la transmission du paludisme en Thaïlande mais les données sont très

limitées et plus d'études sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses (Sinka et al., 2011, Gould et al., 1967, Suwonkerd et al., 2013).



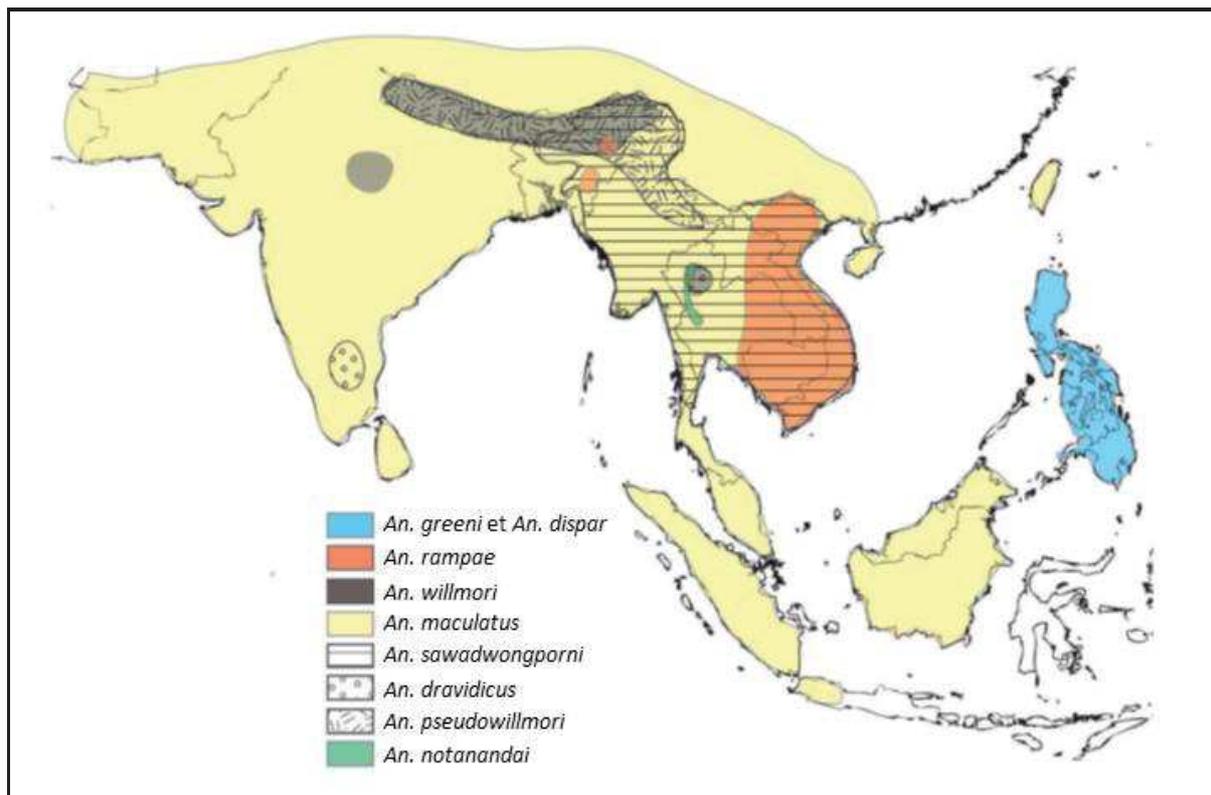
**Figure III. Distribution des espèces d'anophèles du sous-groupe Minimus (adaptée d'après Morgan et al., 2013).**

Le sous-groupe Minimus inclue le complexe Fluviatilis, vecteur dominant du paludisme sur le sous-continent indien, et le complexe Minimus, vecteur dominant du paludisme sur la péninsule indochinoise. Le complexe Minimus est composé de deux espèces jumelles (*An. minimus (s.s.)* et *An. harrisoni*) dont la distribution est souvent sympatrique.

## **(2) Le groupe Maculatus**

Le groupe Maculatus est composé de neuf espèces (*An. maculatus (s.s.)*, *An. sawadwongporni*, *An. dravidicus*, *An. pseudowillmori*, *An. willmori*, *An. notanandai*, *An. greeni*, *An. dispar*, et *An. rampae*) parmi lesquelles sept ont été rapportées en Thaïlande (*An. maculatus (s.s.)*, *An. sawadwongporni*, *An. dravidicus*, *An. pseudowillmori*, *An. willmori*, *An. notanandai* et *An. rampae*) (Rattanarithikul et al., 2006, Saeung, 2012, Suwonkerd et al., 2013) (**Figure IV**). *Anopheles maculatus (s.s.)* est une espèce cosmopolite en Thaïlande contrairement aux autres espèces qui ont une distribution plus limitée : *An. dravidicus* et *An. pseudowillmori* sont présents en sympatrie avec *An. maculatus (s.s.)* dans les provinces du

nord, de l'ouest et du nord-est. La présence de *An. sawadwongporni* a été rapportée dans les provinces du Nord-Est et du Sud. Quant à *An. willmori* et *An. notanandai*, ils ont été décrits dans le Nord et dans l'Ouest respectivement (Rattanarithikul et al., 2006). Le comportement trophique et la capacité vectorielle des différentes espèces jumelles ne sont pas connus précisément (Saeung, 2012, Sinka et al., 2011). Par ailleurs, la capacité vectorielle semble varier en fonction de la zone étudiée (Sinka et al., 2011). *Anopheles maculatus* (s.s.) est un vecteur important dans les provinces de l'Est de l'Inde, dans le Sud de la Thaïlande, en Malaisie et sur l'île de Java bien qu'il soit largement distribué du Pakistan aux Philippines, et du Sud de la Chine aux îles de Bornéo et de Sumatra (Sinka et al., 2011). Les deux autres espèces qui ont un rôle connu dans la transmission du paludisme le long de la ZTTM sont *An. sawadwongporni* (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998) et *An. pseudowillmori* (Green et al., 1991). *Anopheles willmori* est un vecteur primaire au Népal mais il ne contribue pas à la transmission en Thaïlande où il est très peu abondant (Rattanarithikul et al., 2006). Le statut vectoriel de *An. notanandai*, *An. dravidicus* et *An. rampae* est encore indéterminé (Sinka et al., 2011). Les membres du groupe *Maculatus* sont préférentiellement zoophagiques et exophagiques. Néanmoins, une plasticité phénotypique importante a été suggérée chez certaines de ces espèces qui sont fréquemment collectées sur sujet humain dans certains sites d'études (Sinka et al., 2011). Enfin, Somboon *et al.* ont démontré que la proximité avec le bétail augmente le risque d'exposition aux piqûres de *An. sawadwongporni* (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998).



**Figure IV. Distribution des espèces d’anophèles du groupe Maculatus (adaptée d’après Morgan et al., 2013).**

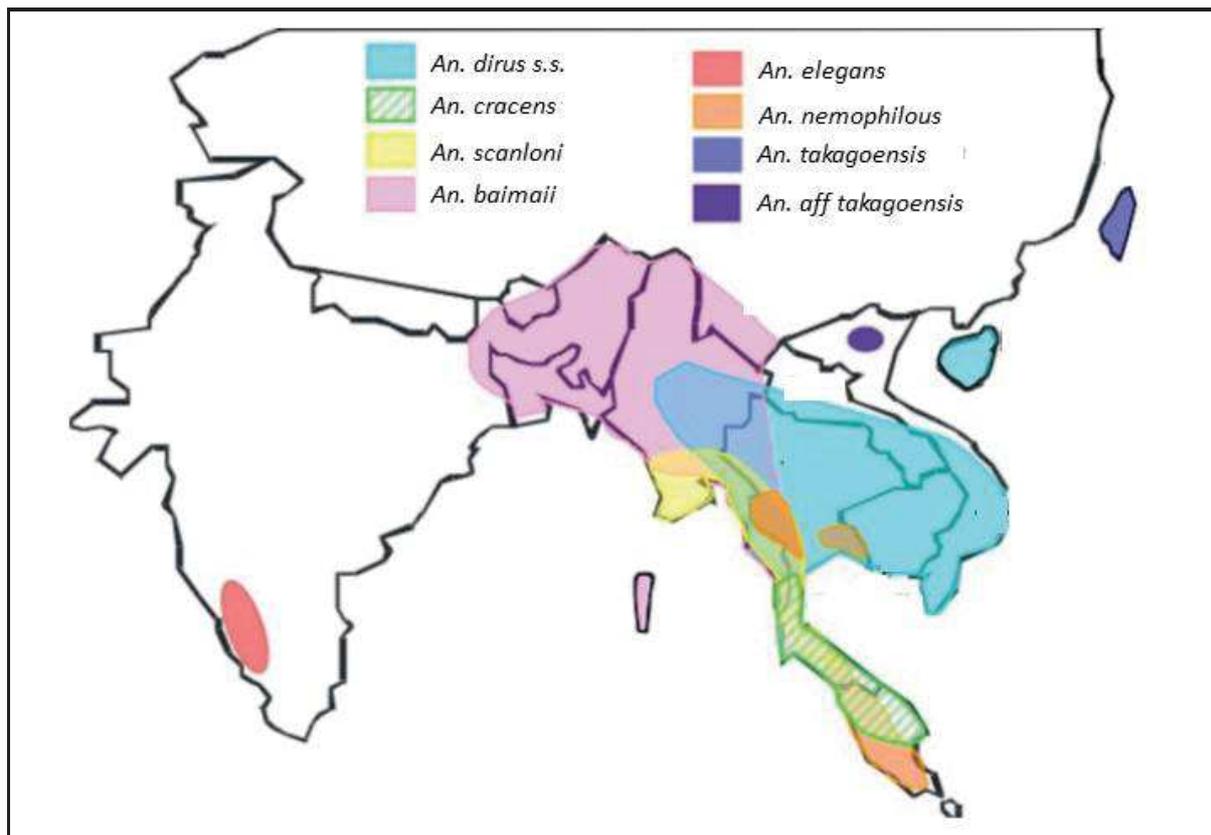
Le groupe Maculatus est largement distribué du Pakistan aux Philippines. Il est composé de neuf espèces différentes parmi lesquelles sept ont été rapportées en Thaïlande. La capacité vectorielle dans ce groupe est très variable.

### **(3) Le complexe Dirus**

Le complexe Dirus fait partie du groupe Leucosphyrus qui a été revu par Sallum *et al.* en 2005 (Sallum et al., 2005). Il est composé de sept espèces (*An. dirus* (s.s.), *An. cracens*, *An. baimaii*, *An. nemophilous*, *An. scanloni*, *An. elegans* et *An. takasagoensis*) parmi lesquelles cinq sont endémiques en Thaïlande (*An. dirus* (s.s.), *An. cracens*, *An. baimaii*, *An. nemophilous* et *An. scanloni*) (Rattanarithikul et al., 2006, Saeung, 2012, Suwonkerd et al., 2013) (**Figure V**). *Anopheles dirus* (s.s.) est une espèce cosmopolite en Thaïlande (Suwonkerd et al., 2013, Rattanarithikul et al., 2006, Tainchum et al., 2015). Les quatre autres espèces sont retrouvées en sympatrie avec *An. dirus* (s.s.) dans les provinces de l’Ouest et du Sud (Rattanarithikul et al., 2006, Sallum et al., 2005). Les membres de ce complexe sont particulièrement anthropophiles, exophiles et sont actifs avant la tombée de la nuit (Rosenberg and Maheswary, 1982, Sinka et al., 2011, Killeen, 2014). Par ailleurs, ces espèces sont très

inféodées à l'écosystème forestier (Sinka et al., 2011). Le long de la ZTTM, *An. dirus* (s.s.) et *An. baimaii* sont des vecteurs primaires de *P. falciparum* et de *P. vivax* (Suwonkerd et al., 2013, Rattanarithikul et al., 2006, Saeung, 2012, Somboon, 1993, Somboon et al., 1995, Somboon et al., 1998). Le statut vectoriel de *An. cracens*, *An. nemophilous* et *An. scanloni* est indéterminé (Sinka et al., 2011, Saeung, 2012, Suwonkerd et al., 2013). D'autres membres du groupe *Leucosphyrus* sont distribués dans le Sud de la Thaïlande et sont impliqués dans la transmission de plasmodes de primates (Sinka et al., 2011, Sallum et al., 2005).

La contribution relative de *An. minimus* (s.l.) et de *An. dirus* (s.l.) à la transmission est débattue depuis longtemps (Somboon, 1993) mais la question n'est pas tranchée. En effet, *An. dirus* (s.l.) est très inféodé à la forêt, il est souvent collecté *a minima* à l'intérieur des villages (Sinka et al., 2011, Sallum et al., 2005, Somboon, 1993, Somboon et al., 1995, Somboon et al., 1998, Sriwichai et al., 2016b, Rosenberg and Maheswary, 1982, Rosenberg, 1982). Par ailleurs, *An. dirus* (s.l.) est actif avant la tombée de la nuit (Rosenberg and Maheswary, 1982, Sinka et al., 2011, Killeen, 2014). Son abondance pourrait être sous-estimée lorsque les captures commencent au moment du crépuscule. Le rôle vectoriel de *An. dirus* (s.l.) est donc particulièrement difficile à mesurer et probablement sous-estimé. A noter que certains auteurs ont suggéré que *An. dirus* (s.l.) est un très bon vecteur et que les taux d'infection sont supérieurs dans les foyers de transmission où ce vecteur est majoritaire (Rosenberg and Maheswary, 1982, Somboon, 1993).



**Figure V. Distribution des espèces d’anophèles du complexe Dirus (adaptée d’après Morgan et al., 2013).**

Le complexe Dirus est composé de sept espèces jumelles dont cinq ont été rapportées en Thaïlande. C’est un vecteur dominant sur la péninsule indochinoise et en Indonésie, certaines espèces étant impliquées dans la transmission de plasmodes de primates.

#### **(4) Le groupe *Barbirostris***

La taxonomie du complexe *Barbirostris* n’est pas entièrement élucidée (Sinka et al., 2011, Saeung, 2012). Cinq espèces ont été nommées et sont présentes en Thaïlande (*An. barbirostris* (s.s.), *An. vanderwulpi*, *An. dissidens*, *An. saeungae* et *An. wejchoochotei*) (Taai and Harbach, 2017) auxquelles s’ajoutent les formes moléculaires décrites par Saeung *et al.* et dont la classification n’est pas encore formellement résolue (Saeung et al., 2008). La présence de cinq autres espèces du groupe *Barbirostris* a également été rapportée en Thaïlande, parmi lesquelles trois sont distribuées sur la ZTTM (*An. barbumbrosus*, *An. campestris* et *An. hodgkini*) (Rattanarithikul et al., 2006). Les espèces du groupe *Barbirostris* sont typiquement zoophiles, à l’exception de *An. campestris* qui est plus anthropophile et endophage (Sinka et al., 2011). Le statut vectoriel des différentes espèces de ce groupe n’est pas défini précisément et plus d’études sont nécessaires (Thongsahuan et al., 2011).

*Anopheles barbirostris* (s.s.) est un vecteur dominant en Indonésie, au Sri Lanka et au Bangladesh (Sinka et al., 2011). *Anopheles campestris* est un vecteur important en Malaisie (Sinka et al., 2011). En Thaïlande, *An. barbirostris* (s.l.) a été incriminé comme vecteur secondaire de *P. vivax* (Limrat et al., 2001, Zollner et al., 2016, Sriwichai et al., 2016a). Il est intéressant de noter que *An. barbirostris* (s.l.) semble réfractaire à l'infection par *P. falciparum* en Thaïlande (Thongsahuan et al., 2011, Somboon, 1993).

### **(5) Le groupe Annularis**

Le groupe Annularis est composé de six espèces (*An. annularis* (s.l.), *An. nivipes*, *An. pallidus*, *An. philippinensis* et *An. schueffneri*) (Sinka et al., 2011). En effet, le complexe Annularis est composé de deux espèces jumelles qui ont été décrites en Inde mais qui ne sont pas encore nommées (Sinka et al., 2011). *Anopheles annularis* (s.s.), *An. nivipes* et *An. philippinensis* ont une distribution sympatrique dans toute la Thaïlande (Rattanarithikul et al., 2006). *Anopheles annularis* (s.s.) est largement distribué depuis l'Afghanistan jusqu'aux Philippines mais sa capacité vectorielle est très variable en fonction du site d'étude (Sinka et al., 2011). C'est un vecteur important en Inde, au Népal et au Sri Lanka (Sinka et al., 2011). Il a également été incriminé comme vecteur secondaire du paludisme dans certains foyers de transmission au Myanmar et en Thaïlande (Sinka et al., 2011, Rattanarithikul et al., 2006). Une plasticité importante du comportement trophique a été suggérée par certains auteurs (Sinka et al., 2011). En effet, *An. annularis* (s.s.) est capable de s'adapter rapidement à des changements du paysage (irrigation, cyclones). C'est le principal vecteur collecté lors de certaines épidémies. Il existe beaucoup moins de données concernant les autres espèces mais elles sont probablement plus zoophiles (Sinka et al., 2011).

### **(6) Les autres espèces**

De nombreuses autres espèces d'anophèles sont fréquemment rapportées lors des enquêtes entomologiques réalisées le long de la ZTTM notamment *An. kochi*, *An. tessellatus*, *An. karwari*, *An. subpictus* (s.l.), *An. hyrcanus* (s.l.) et *An. jamesii* (s.l.) (Rattanarithikul et al., 2006, Somboon, 1993, Somboon et al., 1995, Somboon et al., 1998, Sriwichai et al., 2016b). Le statut vectoriel de ces espèces est plus incertain (Saeung, 2012). En effet, elles sont beaucoup plus zoophagiques et/ou peu abondantes et/ou non compétentes pour le

paludisme (Saeung, 2012, Rattanarithikul et al., 2006, Somboon, 1993, Somboon et al., 1995, Somboon et al., 1998). Somboon *et al.* ont étudié la compétence vectorielle de ces espèces et démontré que des oocystes de *P. falciparum* peuvent se développer chez *An. vagus* (groupe Subpictus) et chez *An. kochi*, et que des oocystes de *P. vivax* peuvent se développer chez *An. vagus*, *An. kochi* et *An. hyrcanus (s.l.)* (Somboon, 1993). Ces mêmes auteurs ont souligné les limites des tests immunologiques pour mesurer le taux d'infection des populations d'anophèles collectées sur appât animal. En effet, lorsque les spécimens sont gorgés, le résultat est souvent faussement positif (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998, Durnez et al., 2011). La contribution de ces espèces à la transmission du paludisme est probablement limitée voire nulle dans la plupart des circonstances. Cependant, leur rôle vectoriel dans des conditions particulières n'est pas caractérisé (*ex.* chez les bergers vivant en contact rapproché avec du bétail, ou au contraire lorsque le bétail est absent et que l'homme devient l'hôte principal). A noter que *An. tessellatus* et certaines espèces des groupes Hyrcanus et Subpictus sont des vecteurs importants dans d'autres régions d'ASE (Sinka et al., 2011).

## **b) Indicateurs entomologiques de la transmission**

Plusieurs études ont mesuré les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme en ASE continentale (Ismail et al., 1974, Ismail et al., 1978, Baker et al., 1987, Harbach et al., 1987, Ratanatham et al., 1988, Upatham et al., 1988, Rosenberg et al., 1990b, Gingrich et al., 1990, Rahman et al., 1993, Somboon, 1993, Somboon et al., 1998, Rattanarithikul et al., 1996, Nosten et al., 2000, Limrat et al., 2001, Toma et al., 2002, Sithiprasasna et al., 2003, Sidavong et al., 2004, Muenworn et al., 2009, Zollner et al., 2016, Van Bortel et al., 2010, Manh et al., 2010, Wang et al., 2015, Sriwichai et al., 2017, Sriwichai et al., 2016b). Le taux de piqûre humain (TPH) par les vecteurs du paludisme est globalement élevé et très hétérogène dans le temps et dans l'espace. Il varie sur une échelle allant de zéro à plusieurs milliers de piqûres/personne/mois avec des moyennes dont l'ordre de grandeur est de 10 et 100 piqûres/personne/mois pendant la saison sèche et la saison des pluies respectivement. Ce qui caractérise la région est avant tout le faible taux d'infection des vecteurs (Imwong et al., 2011). L'index sporozoïtaire (IS), c'est-à-dire la prévalence du portage de sporozoïtes de plasmodium dans la population anophélienne, est en moyenne inférieur à 1%. L'index oocystique, c'est-à-dire la prévalence du portage d'oocystes de plasmodium dans

la population anophélienne, est en moyenne deux à trois fois supérieur (Rahman et al., 1993). L'intensité de la transmission, mesurée par le taux d'inoculation entomologique (TIE), est faible pour *P. falciparum* (moyenne de l'ordre de 1 piqûre infectante/personne/an) et modérée pour *P. vivax* (moyenne de l'ordre de 10 piqûres infectantes/personne/an). A titre de comparaison, le taux d'infection des vecteurs en Afrique est généralement de l'ordre de 2-5% (Mulamba et al., 2014, Gimnig et al., 2003, Fontenille et al., 1997, Corbel et al., 2012, Pringle, 1966, Collins et al., 1984) et peut atteindre les 10% (Ebenezer et al., 2016, Beier et al., 1987). En Afrique, le taux d'inoculation entomologique (TIE) est fréquemment >100 piqûres infectantes/personne/an et peut atteindre 1000 piqûres infectantes/personne/an (Smith et al., 2005).

Dans la ZTTM, la transmission de *P. falciparum* est saisonnière avec deux pics de transmission entre les mois de Juin et Septembre et en Novembre (Luxemburger et al., 1996). La détection de moustiques infectés par *P. falciparum* pendant la saison sèche est rare dans la plupart de foyers de transmission. Certains auteurs ont associé cette saisonnalité à des variations importantes de la capacité vectorielle (Rosenberg et al., 1990b, Gingrich et al., 1990, Rattanarithikul et al., 1996). Dans un travail de modélisation mathématique, Pongtavornpinyo *et al.* ont identifié des différences entre les facteurs qui déterminent la prévalence en zone de forte et de faible endémicité respectivement. Ils ont notamment suggéré l'importance de la capacité vectorielle en zone de faible transmission (Pongtavornpinyo et al., 2008). A noter que Rosenberg *et al.* ont documenté un foyer de transmission particulier où la transmission pendant la saison sèche, assurée par *An. dirus* (*s.l.*), était particulièrement intense (Rosenberg et al., 1990a, Rosenberg et al., 1990b). Au contraire, la transmission de *P. vivax* (détection de moustiques infectés par plasmodium) a lieu pendant toute l'année. Cette absence de saisonnalité est probablement liée au phénomène des rechutes (réactivation des hypnozoïtes). Le long de la ZTTM, la fréquence des rechutes est particulièrement importante. Adekunle *et al.* ont montré que les rechutes sont à l'origine de 96% des accès palustres à *P. vivax* le long de la ZTTM alors qu'en Papouasie-Nouvelle-Guinée ce chiffre est de 70% (Adekunle et al., 2015). La transmission du paludisme à *P. falciparum* est interrompue du côté thaïlandais de la frontière et la majorité des cas sont des cas sporadiques importés (Sriwichai et al., 2017). Plus d'études sont nécessaires pour mieux comprendre la dynamique des

indicateurs clinico-épidémiologiques en fonction des indicateurs entomologiques de la transmission en zone de faible transmission.

Un autre élément est le site de la transmission. En effet, un séjour en dehors du village est un facteur de risque pour l'infection palustre (Somboon, 1993, Price et al., 1999, Luxemburger et al., 1996). Certains auteurs ont soutenu l'hypothèse que la transmission a lieu principalement à l'extérieur du village, lorsque les villageois travaillent aux champs ou séjournent dans la forêt. Lors d'une étude réalisée le long de la ZTTM dans des villages traditionnels Karen situés du côté thaïlandais de la frontière, Somboon *et al.* ont montré que le contexte entomologique est qualitativement très proche dans le village et dans les fermes situées à l'extérieur du village, mais que le taux de piqûre est environ 10 fois supérieur du fait de la faible disponibilité d'hôtes (*i.e.* un faible nombre d'hôtes concentre les piqûres) (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998). Le contexte entomologique en forêt reste très peu documenté dans la région (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998). En effet, il est particulièrement difficile d'organiser des collections en forêt car les sites sont très difficiles d'accès et souvent le siège d'activités illégales (*ex.* exploitation de bois précieux).

## **c) Les outils actuels de lutte anti-vectorielle et leurs limites**

### ***(1) Les outils actuels pour le contrôle des vecteurs du paludisme***

La lutte anti-vectorielle (LAV) est définie comme l'ensemble des interventions qui sont mises en œuvre afin de prévenir la transmission du paludisme en ciblant les moustiques vecteurs du parasite. L'O.M.S. recommande principalement deux interventions pour le contrôle des vecteurs du paludisme : les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action et la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides. La lutte anti-larvaire est également recommandée lorsque les gîtes sont facilement identifiables et traitables (World Health Organization, 2013, World Health Organization, 2017a).

#### ***(a) Les moustiquaires imprégnées d'insecticide***

L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide pour le contrôle du paludisme a été revue par Curtis en 2006 (Curtis et al., 2006). Les moustiquaires agissent comme une barrière physique entre l'hôte humain et le vecteur, assurant ainsi une protection personnelle pour les individus qui dorment sous la moustiquaire (Noukpo et al., 2016). Les pyréthroides,

insecticides utilisés pour imprégner les moustiquaires, ont un effet irritant et répulsif vis-à-vis des moustiques, ce qui confère un niveau additionnel de protection et diminue d'autant plus le contact homme-vecteur (Moiroux et al., 2017). Par ailleurs, les moustiquaires imprégnées ont un effet létal sur les moustiques (barrière chimique) (Corbel et al., 2002, Njunwa et al., 1991). Lorsque le taux d'utilisation dans la population cible est suffisant, les moustiquaires imprégnées ont un effet délétère sur les vecteurs en diminuant la taille, la longévité et le taux d'infection des populations anophéliennes (Lindsay et al., 1989, Magesa et al., 1991). Les moustiquaires imprégnées diminuent alors la transmission du paludisme et ont un effet communautaire en protégeant non seulement les utilisateurs mais également les personnes qui ne dorment pas sous la moustiquaire (Lindsay et al., 1989, Magesa et al., 1991, Corbel et al., 2012).

*(b) La pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides*

La pulvérisation intra-domiciliaire consiste à imprégner les murs des habitations dans le but d'exposer les vecteurs à une concentration létale d'insecticide lorsqu'ils se reposent sur les surfaces traitées, avant ou après le repas sanguin (Kouznetsov, 1976). La pulvérisation intra-domiciliaire permet de diminuer la densité de la population et la longévité des vecteurs par un effet létal immédiat ou différé, et donc de diminuer la capacité vectorielle et l'intensité de la transmission (Ismail et al., 1975, Djenontin et al., 2010, Agossa et al., 2014). Lorsque l'insecticide a un effet irritant et répulsif (*ex.* les pyréthroïdes), la pulvérisation intra-domiciliaire permet également de prévenir l'entrée du vecteur dans l'habitation (Curtis and Mnzava, 2000, Djenontin et al., 2010, Agossa et al., 2014). L'effet insecticide est résiduel, c'est-à-dire qu'il persiste pendant plusieurs mois après l'intervention (en pratique, pendant 3-6 mois en fonction du produit appliqué) (Rohani et al., 2006, Rowland et al., 2013, Agossa et al., 2014, Djenontin et al., 2013).

Les moustiquaires imprégnées et la pulvérisation intra-domiciliaire ciblent les moustiques adultes femelles qui prennent un repas sanguin sur un hôte humain à l'intérieur des habitations. Elles sont efficaces pour contrôler les vecteurs anthropophiles, endophages et actifs au milieu de la nuit (lorsque l'hôte est protégé par la moustiquaire). Cependant, l'efficacité de ces méthodes diminue drastiquement lorsque les vecteurs sont zoophagiques et/ou exophagiques et/ou ont une activité diurne (avant la tombée de la nuit ou après le coucher du soleil) (Killeen, 2014, Somboon et al., 1995, Ismail et al., 1978, Ismail et al., 1975).

(c) *La lutte anti-larvaire*

L'efficacité de la lutte anti-larvaire pour le contrôle des vecteurs du paludisme a été revue par Tusting *et al.* (Tusting et al., 2013). Les interventions de lutte anti-larvaire peuvent être classées en quatre catégories : (i) modification de l'habitat, (ii) manipulation de l'habitat, (iii) contrôle biologique, (iv) traitement des gîtes avec de produits larvicides (Rozendaal, 1997). L'impact théorique de la lutte anti-larvaire s'explique par une réduction du contact homme-vecteur en prévenant l'émergence des imagos à partir des stades larvaires. Cette réduction permet de diminuer l'intensité de la transmission et la capacité vectorielle. Un intérêt majeur de la lutte anti-larvaire est son effet potentiel sur la transmission résiduelle en diminuant l'abondance des vecteurs exophagiques et zoophagiques, qui ne sont pas ou faiblement impactés par les autres méthodes (moustiquaires imprégnées et la pulvérisation intra-domiciliaire).

Bien que cette stratégie ait été largement employée avant l'apparition des moustiquaires imprégnées et de la pulvérisation intra-domiciliaire, peu d'études ont été réalisées de manière suffisamment rigoureuse pour pouvoir en évaluer l'efficacité (*ex.* essais contrôlés randomisés). De plus, il existe un biais de publication important qui rend les conclusions plus fragiles (études menées dans des sites où l'intervention a plus de chance de réussir, non publication des résultats négatifs). Toutefois, Trusting *et al.* ont conclu que la lutte anti-larvaire pouvait avoir un impact important sur les indicateurs clinico-épidémiologiques du paludisme (incidence, prévalence et index splénique) du paludisme, dans des « conditions particulières soigneusement sélectionnées » en Afrique et en Asie. En effet, la faisabilité et l'efficacité de l'intervention dépend directement de l'écologie des gîtes larvaires (nature, fractionnement, nombre, accessibilité etc.).

En ce qui concerne la ZTTM, la biodiversité des vecteurs est très importante. Les gîtes larvaires sont multiples, fragmentés et souvent difficiles d'accès, ce qui limite drastiquement la faisabilité de la lutte anti-larvaire (Kankaew et al., 2005, Sinka et al., 2011, Rattanaarithikul et al., 2006). Cependant, aucune étude n'a été réalisée du côté birman de la frontière et plus d'études sont nécessaires afin de caractériser l'écologie des habitats larvaires (*ex.* existence de gîtes péri-domestiques) et de mieux définir l'intérêt et la place de la lutte anti-larvaire dans le contrôle des vecteurs du paludisme en présence.

## **(2) La transmission résiduelle**

D'un point de vue entomologique, la transmission résiduelle est définie comme la part de la transmission qui n'est pas prévenue par la couverture universelle avec les moustiquaires et la pulvérisation intra-domiciliaire (Killeen, 2014). Quantitativement, l'importance de la transmission « résiduelle » varie entre 5% et 80% en fonction de la zone étudiée (Killeen, 2014). A noter qu'en ASE, l'hétérogénéité du comportement des vecteurs est très importante et ne permet pas de généraliser les résultats observés dans un site à l'ensemble d'une région (Trung et al., 2005).

Somboon *et al.* ont caractérisé le contexte entomologique de la transmission dans un écotype très similaire à celui de notre étude (villages traditionnels Karen du côté thaïlandais de la frontière) (Somboon, 1993, Somboon et al., 1995, Somboon et al., 1998). Ils ont rapporté la présence de plusieurs vecteurs principalement exophagiques et/ou zoophagiques. En réalisant des enquêtes entomologiques et en étudiant les habitudes de coucher, les auteurs ont estimé que, en théorie, la part de la transmission prévenue par les moustiquaires varie entre 36% et 78% pour *An. sawadwongporni* et *An. minimus* (s.s.) respectivement (Somboon, 1993). Ils n'ont observé aucun effet sur la densité et la longévité des vecteurs malgré un taux d'utilisation élevé (Somboon, 1993, Somboon et al., 1995). Dans une autre étude réalisée par Dolan *et al.* (Dolan et al., 1993), l'efficacité des moustiquaires a été évaluée spécifiquement chez les femmes enceintes dans les camps de réfugiés. L'utilisation de moustiquaires a été associée à une diminution significative du risque d'anémie sévère mais pas du paludisme. Luxemburger *et al.* ont évalué l'efficacité des moustiquaires chez les enfants vivant dans les camps de réfugiés (Luxemburger et al., 1994). L'utilisation des moustiquaires a été associée à une réduction significative de l'incidence du paludisme à *P. falciparum* mais aucun effet n'a été observé sur le paludisme à *P. vivax*. Les auteurs ont conclu à un effet limité des moustiquaires car la prévalence de l'infection palustre et le nombre de cas symptomatiques ont persisté à un niveau élevé dans les deux bras de l'étude (intervention et contrôle). Des études plus récentes réalisées au Myanmar ont été rapportées par Smithuis *et al.* (Smithuis et al., 2013b, Smithuis et al., 2013a). Les auteurs ont constaté l'absence d'effet des moustiquaires imprégnées sur les indicateurs clinico-épidémiologiques du paludisme (prévalence, incidence, anémie et index splénique) parmi une cohorte de 175 enfants suivis pendant 10 mois (Smithuis et al., 2013b). Cette absence d'effet a été expliquée par le

comportement trophique des vecteurs, principalement exophagiques et actifs très tôt dans la soirée (51% des spécimens ont été collectés avant 20h) (Smithuis et al., 2013a). En Afrique, la couverture universelle avec des moustiquaires imprégnées a également été associée avec une modification du comportement des vecteurs qui ont tendance à piquer plus tôt dans la soirée et/ou plus tard dans la matinée (résistance comportementale) (Moiroux et al., 2012, Moiroux et al., 2014a, Russell et al., 2011).

D'autres facteurs sont à prendre en compte pour mieux percevoir l'efficacité des moustiquaires en condition réelle d'utilisation. A noter que lors des études destinées à évaluer l'efficacité d'une intervention, les participants sont informés du bénéfice potentiel de l'intervention et sont particulièrement observants. Les taux d'utilisation qui sont rapportés dans ce type d'étude ont tendance à être surestimés (Grietens et al., 2012, Moore et al., 2008, Gryseels et al., 2015a, Xu et al., 2014, Singh et al., 2013, Chanda et al., 2014). Par ailleurs, il est important de prendre en compte les habitudes des populations locales. Par exemple, le long de la ZTTM, les villageois sont souvent amenés à dormir à l'extérieur du village (séjours en forêt ou dans les fermes) (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998, Malaria Elimination Task Force, 2017). Dans ces contextes, les habitations sont virtuellement inexistantes et la transmission a lieu exclusivement en extérieur ce qui limite l'utilisation des moustiquaires. De plus, l'intégralité des moustiquaires et les modalités de leur utilisation peuvent en influencer l'efficacité (Noukpo et al., 2016, Harvey et al., 2017). Cela montre l'importance des sciences sociales dans les programmes de lutte anti-vectorielle.

### **(3) Les résistances aux insecticides**

Les résistances des anophèles aux insecticides et les implications pour le contrôle du paludisme ont fait l'objet d'une revue par Corbel & N'Guessan en 2013 (Corbel and N'Guessan, 2013) et un état des lieux de la situation en Thaïlande a été réalisé par Chareonviriyaphap et al. en 2013 (Chareonviriyaphap et al., 2013). Les résistances aux insecticides sont associées à une diminution de l'efficacité des moustiquaires imprégnées et de la pulvérisation intradomiciliaire (Curtis et al., 1998, N'Guessan et al., 2007, Pennetier et al., 2007, Asidi et al., 2012, Strode et al., 2014, Churcher et al., 2016). Les données sur la résistance aux insecticides sont très limitées dans la zone étudiée (**Tableau 1**). En Thaïlande, la résistance au DDT a été rapportée chez *An. minimus* (s.l.), *An. maculatus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) (Somboon et al., 2003,

Van Bortel et al., 2008b, Chareonviriyahpap et al., 1999) et la résistance aux organophosphates a été rapportée chez *An. maculatus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) (Overgaard et al., 2005, Hii, 1984). La résistance aux pyréthroïdes semble limitée aux pays voisins. Elle a été rapportée chez *An. minimus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) au Vietnam (Van Bortel et al., 2008b). A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée dans les villages Karen le long de la ZTTM, en particulier du côté birman de la frontière.

**Tableau 1. Résumé des études sur la résistance des anophèles aux insecticides en ASE continentale.**

Espèce(s)	Insecticide(s)	Pays	Date(s)	Référence(s)
<i>An. minimus</i> (s.s.)	DDT	Thaïlande, Vietnam, Cambodge	1999, 2000, 2003, 2008	(Van Bortel et al., 2008a, Somboon et al., 2003, Chareonviriyahpap et al., 1999, Prapanthadara et al., 2000)
<i>An. maculatus</i> (s.s.) et <i>An. sawadwongporni</i>	Pyréthroïdes <sup>a</sup>	Vietnam	2008	(Van Bortel et al., 2008a)
	DDT	Thaïlande	1999	(Chareonviriyahpap et al., 1999)
	Méthylparathion	Thaïlande	2005	(Overgaard et al., 2005)
<i>An. dirus</i> (s.s.)	DDT	Cambodge	2008	(Van Bortel et al., 2008a)
	Pyréthroïdes <sup>b</sup>	Vietnam	2008	(Van Bortel et al., 2008a)
<i>An. cracens</i>	DDT et fénitrothion	Thaïlande et Malaisie	1984	(Hii, 1984)
<i>An. vagus</i>	DDT et pyréthroïdes <sup>c</sup>	Thaïlande, Vietnam, Cambodge	2008	(Van Bortel et al., 2008a)

<sup>a</sup> alpha-cyperméthrine, lambda-cyhalothrine and perméthrine ;

<sup>b</sup> alpha-cyperméthrine and lambda-cyhalothrine ;

<sup>c</sup> alpha-cyperméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine and perméthrine.

## **B. ELIMINATION DES SOUCHES DE PLASMODIUM FALCIPARUM RESISTANTES A L'ARTEMISININE**

### **1. Etat des lieux sur la résistance à l'artémisinine**

La résistance aux dérivés de l'artémisinine a été décrite pour la première fois au Cambodge en 2007. Elle se manifeste initialement par un allongement du temps de clairance parasitaire chez les malades (Dondorp et al., 2009) puis par une diminution de l'efficacité

thérapeutique des CTA (Carrara et al., 2009, Amaratunga et al., 2016, Phyo et al., 2016, Woodrow and White, 2017). Les mécanismes de la résistance restent mal caractérisés mais des études sur le transcriptome parasite suggèrent une modification du métabolisme dans les formes en anneau pendant les six premières heures du cycle endo-érythrocytaire (Mok et al., 2011). En 2014, des chercheurs de l'Institut Pasteur du Cambodge ont montré une forte corrélation entre certaines mutations du gène codant pour la protéine *kelch13* et la résistance à l'artémisinine (Ariey et al., 2014). La découverte de ce marqueur a permis de montrer l'étendue du phénomène depuis le Vietnam jusqu'à la frontière occidentale de la Birmanie, aux portes de l'Inde et du Bangladesh (Ashley et al., 2014, Tun et al., 2015, Spring et al., 2015). La résistance à l'artémisinine compromet l'efficacité des CTA et augmente la probabilité de voir se développer des résistances à la molécule partenaire (le plus souvent la méfloquine, la luméfantine ou la pipéraquline). Des travaux récents ont confirmé l'augmentation des échecs thérapeutiques avec les CTA dihydroartémisinine-pipéraquline au Cambodge (Amaratunga et al., 2016) et artésunate-méfloquine le long de la frontière birmano-thaïlandaise (Phyo et al., 2016). Il est donc urgent d'éliminer *P. falciparum* avant que les résistances aux CTA ne se développent davantage et ne provoquent une résurgence de la maladie. Par ailleurs, toutes les résistances aux antipaludiques sont apparues en ASE et ont disséminé vers l'Afrique où le niveau de transmission est bien plus élevé (Verdrager, 1986, Bjorkman and Phillips-Howard, 1990, Wongsrichanalai et al., 2001, Roper et al., 2004). Les souches de *P. falciparum* résistantes aux artémisinines sont transmissibles par les vecteurs africains (St Laurent et al., 2015). La résistance à l'artémisinine est donc une menace localement mais aussi pour le reste du monde (White, 2010, Trape, 2001).

## **2. L'élimination médicamenteuse ciblée de *Plasmodium falciparum***

### **a) Les sept piliers de l'élimination**

Afin d'éliminer les souches de *P. falciparum* résistantes à l'artémisinine qui sont transmises dans la ZTTM, un programme d'élimination a été lancé en 2013. La stratégie d'élimination mise en œuvre dans cette étude se distingue de celle proposée par l'OMS (World Health Organization, 2017b) et repose sur sept piliers qui sont présentés dans le **Tableau 2**. Le recensement exhaustif des villages et leur cartographie permet de définir précisément la

population ciblée par l'intervention. L'engagement communautaire a pour objectif de comprendre la situation politique et économique dans les villages, d'expliquer l'intervention et de faire en sorte que la communauté s'approprie le programme. Ces étapes préparatoires sont particulièrement importantes et conditionnent les chances de réussir l'élimination. Le terme d'élimination médicamenteuse ciblée (EMC) a été proposé pour désigner cette stratégie qui repose principalement sur des moyens médicamenteux : d'une part l'accès universel au diagnostic et au traitement précoce (DTP) et d'autre part l'élimination du réservoir sous-microscopique par le traitement de masse (TdM) dans les villages où la prévalence de l'infection asymptomatique est particulièrement élevée. La première étape de ce programme a été de réaliser une étude pilote dans quatre villages afin de démontrer l'efficacité, la sécurité, la faisabilité et l'acceptabilité de la stratégie d'EMC. Depuis 2014, le programme a été étendu dans quatre départements de l'est de l'état Karen. Il couvre plus de 1200 villages et une population d'environ 400000 personnes (Malaria Elimination Task Force, 2017). L'impact de l'intervention est mesuré par un système de recueil des données clinico-épidémiologiques en temps réel et par la surveillance entomologique. Chaque poste palu communique sur une base hebdomadaire le nombre de consultations et le nombre de cas de paludisme. La surveillance entomologique a pour objectif de décrire les systèmes vectoriels en présence et de monitorer les indicateurs entomologiques de la transmission.

**Tableau 2. Les sept piliers de l'élimination.**

<b>Pilier</b>	<b>Objectif et description</b>
1. Cartographie	Géolocalisation précise et régulièrement mise à jour de la population cible
2. Engagement communautaire	Informar la population, comprendre la situation économique et politique, expliquer les buts de l'intervention
3. Dispensaire « poste palu »	Dans chaque village, un agent de santé choisi par la communauté est en mesure d'utiliser les tests de diagnostic rapide et CTA pour traiter les accès palustres incidents dans les 24/48h de fièvre
4. Détection des réservoirs sous-microscopiques	Détection active par une technique moléculaire ultrasensible des foyers où la prévalence de l'infection asymptomatique sous-microscopique est élevée
5. Traitement de masse	Elimination du réservoir sous-microscopique par le traitement de masse à base de dihydroartémisinine-pipéraquline + primaquine
6. Recueil de données en temps réel	Collecte et analyse des données de chaque poste palu afin de vérifier leur bon fonctionnement et de mesurer leur impact
7. Entomologie	Décrire les systèmes vectoriels et les taux d'infection des anophèles dans le contexte de l'élimination

**b) Le « poste palu » et l'accès universel au diagnostic et traitement précoce**

L'accès universel au DTP est garanti par la mise en place d'un « poste palu » dans tous les villages de la zone cible. Un agent de santé communautaire (villageois ordinaire choisi par la communauté) est formé pour réaliser le diagnostic et le traitement des cas symptomatiques incidents (**Figure VI**). Cela a été rendu possible par le développement des tests de diagnostic rapide (TDR) et de protocoles thérapeutiques efficaces, courts et très bien tolérés (les CTA) dont la mise en œuvre ne nécessite pas de compétences médicales particulières. L'arbre décisionnel utilisé pour la prise en charge des patients au poste palu est présenté en **Annexe 1**.

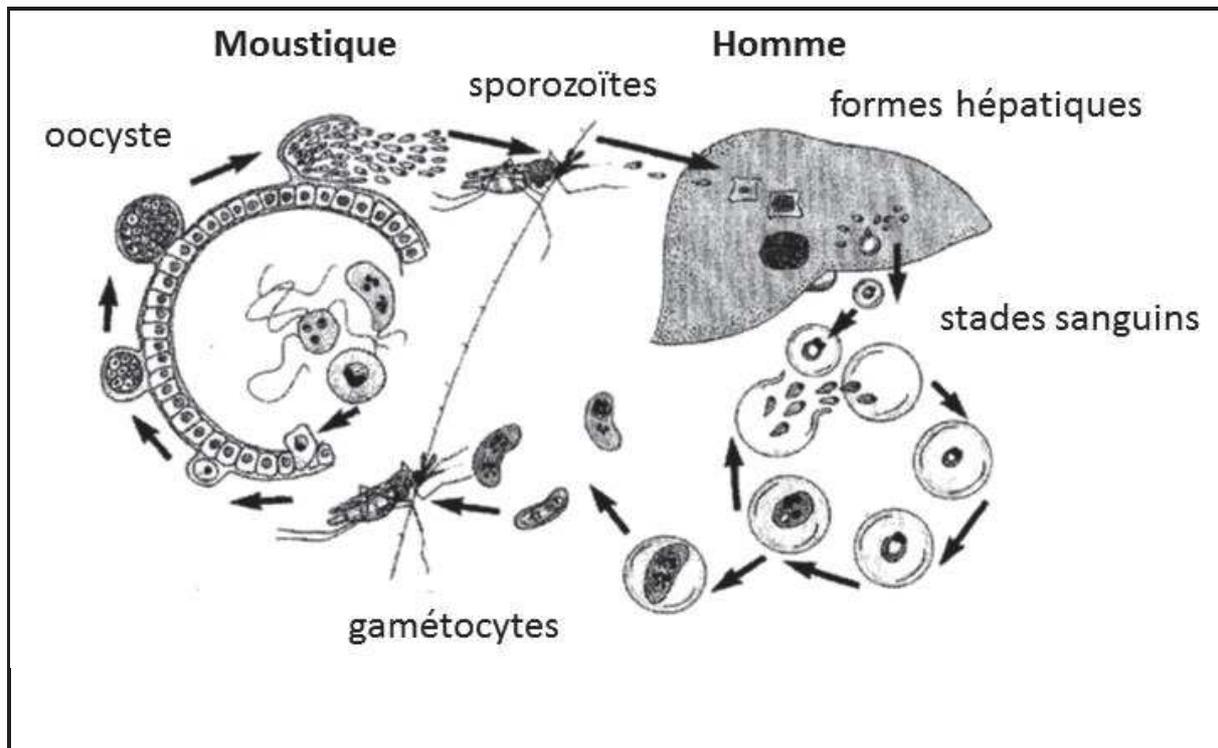


**Figure VI. Agent de santé communautaire en fonction dans un poste palu.**

Dans chaque village de la zone cible, un agent de santé choisi par la communauté est formé à l'utilisation des tests de diagnostic rapide et au traitement du paludisme. L'accès au diagnostic et au traitement précoce des cas incidents est dispensé gratuitement 24/24 heures et 7/7 jours au poste palu. Les traitements combinés à base d'artémisinine sont utilisés en première ligne de traitement pour les cas de paludisme à *P. falciparum*.

L'objectif du DTP est de prévenir la transmission homme-vecteur du parasite lorsque les personnes infectées sont symptomatiques. Seuls les formes sexuées du parasite (et plus particulièrement les gamétocytes matures ou de stade V) sont capables d'infecter le vecteur anophélien (Garnham, 1966) (**Figure VII**). Lors de l'infection par *P. falciparum*, les gamétocytes matures apparaissent généralement plus de 3 jours après le début des symptômes (Jeffery and Eyles, 1955, Price et al., 1999, Stepniewska et al., 2008). Dans l'étude de Price *et al.* réalisée dans la ZTTM (Price et al., 1999), 2.4% des patients faisant un accès palustre non compliqué étaient gamétocytemiques à l'admission. Lorsque l'infection n'est pas traitée, la proportion de patients qui développent une gamétocytemie patente augmente rapidement 48h après le début des symptômes. Par conséquent, lorsque l'infection est traitée efficacement et dans les 48 heures qui suivent le début de la fièvre, le parasite est

généralement éliminé avant l'apparition des gamétocytes matures dans le sang du patient et la transmission homme-vecteur du parasite est ainsi évitée (Nosten et al., 2000). Lorsque cette stratégie est appliquée à l'ensemble d'une population, cela permet de diminuer rapidement l'incidence du parasite et d'interrompre progressivement le cycle de transmission du parasite (Nosten et al., 2000, Carrara et al., 2006, Barnes et al., 2005).



**Figure VII. Cycle de vie de plasmodium.**

Seuls les stades sexués du parasite (gamétocytes), lorsqu'ils sont matures, sont transmis au vecteur anophélien. Dans le cas du paludisme à *P. falciparum*, les gamétocytes apparaissent généralement plus de 48 heures après le début de la fièvre. Lorsque l'infection est diagnostiquée et traitée précocement, le parasite est éliminé avant l'apparition des gamétocytes et la transmission au moustique est ainsi évitée.

Tous les traitements n'ont pas la même efficacité pour réduire le risque de gamétocytémie et *in fine* prévenir la transmission homme-vecteur. La proportion de patients qui développent une gamétocytémie patente après la mise en place d'une thérapeutique spécifique varie en fonction du traitement administré, allant de 1.5% avec les CTA jusqu'à 22% avec le traitement quinine-tétracycline (Price et al., 1999). Dans une autre étude, les auteurs ont montré que lorsque l'épisode primaire est traité avec la CTA artésunate-méfloquine, le risque d'être gamétocytémique après le traitement est 8 fois moindre qu'avec la méfloquine

en monothérapie. Par ailleurs, l'incidence du paludisme a chuté de moitié dans cette étude après l'introduction des CTA en première ligne de traitement (Price et al., 1996). L'effet des CTA sur la transmission est expliqué par deux facteurs : le spectre d'action des artémisinines et l'excellent taux de guérison des CTA. La plupart des antipaludiques sont actifs sur les trophozoïtes tardifs, les schizontes et les gamétocytes immatures (stades I-III) de *P. falciparum*. Les artémisinines ont un spectre d'action élargi aux trophozoïtes jeunes et aux gamétocytes plus matures (en particulier les stades IV). Cette propriété remarquable contribue à l'effet des CTA sur la transmission. Par ailleurs, en cas d'échec thérapeutique, le risque de voir des gamétocytes se développer lors de la recrudescence de l'infection est 2 fois supérieur (Price et al., 1996, Price et al., 1999). L'excellent taux de guérison des CTA explique également leur effet sur la transmission (Nosten and White, 2007). Enfin, la seule molécule active contre les gamétocytes matures est la primaquine (White, 2013b). L'addition d'une dose unique de primaquine à faible posologie (0.25 mg/kg) est sans danger et efficace pour diminuer rapidement l'infectivité des patients symptomatiques en éliminant les gamétocytes matures déjà présents à l'admission (Bancone et al., 2016, Dicko et al., 2016, White, 2013b). Elle est donc indiquée dans tous les cas incidents de paludisme à *P. falciparum* (**Annexe 1**).

### **c) Le traitement de masse et l'élimination du réservoir sous-microscopique**

Dans les paragraphes précédents, nous avons vu que la prévalence de l'infection asymptomatique est particulièrement élevée dans certains villages (*hotspots*). Ces villages sont suspectés d'alimenter le cycle de transmission du parasite dans les villages alentours. Nous avons également vu que l'infection asymptomatique est généralement sous-microscopique et que le parasite peut être transmis au vecteur dans ce cadre nosologique. Il semble donc nécessaire de traiter les porteurs asymptomatiques afin d'interrompre le cycle de transmission du paludisme et d'éliminer *P. falciparum* (von Seidlein, 2014). Les villages *hotspots* sont identifiés en réalisant des enquêtes de prévalence. Afin de détecter les porteurs sous-microscopiques, il est nécessaire de prélever un volume de sang suffisant et de les analyser avec une technique moléculaire très sensible. Actuellement, la technique utilisée est une technique de PCR quantitative en temps réel dite « ultra-sensible » dont le seuil de détection est de 22 parasites/ml de sang (Imwong et al., 2014). Des travaux sont en cours afin d'évaluer le potentiel de tests de diagnostic rapide dont la sensibilité est optimisée par rapport

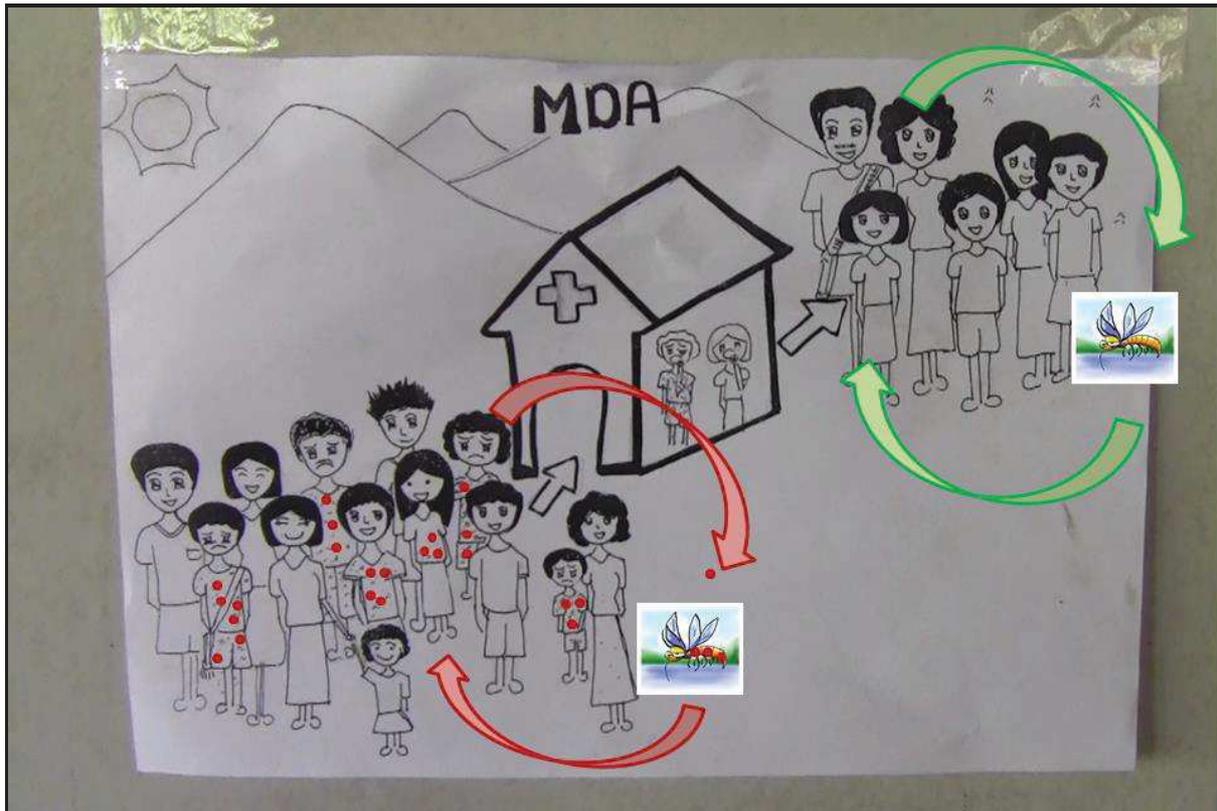
aux tests classiques afin de détecter les porteurs sous-microscopiques. Cela faciliterait grandement l'identification des villages *hotspots*. Une fois les villages *hotspots* identifiés, le réservoir sous-microscopique est éliminé avec le traitement de masse (TdM). Le TdM consiste à traiter l'ensemble d'une population, indépendamment du diagnostic de l'infection. Cela permet de s'affranchir du seuil de détection des techniques de diagnostic utilisables dans les villages et donc de traiter de manière exhaustive toutes les personnes infectées, y compris les porteurs sous-microscopiques. Le TdM est mis en œuvre uniquement dans les villages *hotspots* (afin de diminuer rapidement l'endémicité du paludisme et accélérer l'élimination), il n'est pas destiné à être mis en œuvre dans tous les villages de la zone cible.

Le protocole de TdM Mahidol-Oxford a été optimisé pour interrompre durablement la transmission du parasite. L'hypothèse est que si toute la population est traitée de manière synchrone pendant une durée suffisante, le parasite ne sera plus transmis au vecteur et le cycle de transmission sera interrompu (**Figure VIII**). Trois phénomènes sont à prendre en compte : (i) l'élimination du parasite de l'hôte infecté (taux de guérison du traitement utilisé), (ii) effet « blocage de la transmission homme-vecteur » des médicaments utilisés (effet gamétocytocide du traitement) et (iii) la prévention de la réinfection du fait de la longue demi-vie d'élimination de la molécule partenaire (effet prophylactique post-traitement, EPPT) (White, 2008a). En pratique, le schéma thérapeutique du TdM fait intervenir un CTA et une faible dose de primaquine. Le CTA utilisé est la dihydroartémisinine-pipéraquline. Ce CTA a un double avantage. Premièrement, l'absence de résistance à la molécule partenaire dans la zone lui confère un taux de guérison de 100%. Deuxièmement, la très longue durée de demi-vie d'élimination de la pipéraquline permet d'obtenir un EPPT pendant 30 jours après la dernière prise du médicament. La durée de l'EPPT de l'association dihydroartémisinine-pipéraquline est supérieure à celle de tous les autres CTA (Bretscher et al., 2014, Pekyi et al., 2016, Nosten and White, 2007, Høglund et al., 2012, Saunders et al., 2014). La faible dose de primaquine permet de tuer les gamétocytes de stade V sur lesquels les autres molécules ne sont pas actives et de réduire très rapidement l'infectivité des patients (Dicko et al., 2016, White, 2013b). Le TdM est répété trois fois à un mois d'intervalle. Les personnes qui reçoivent trois fois le TdM sont protégées de toute réinfection pendant trois mois consécutifs et ne transmettront plus le parasite au vecteur anophélien. A noter que la durée de vie d'un vecteur est de 20-30 jours au laboratoire et qu'elle est estimée à 8-15 jours en conditions naturelles (Cohuet et al., 2010,

Dawes et al., 2009, Ratanatham et al., 1988, Upatham et al., 1988). Le TdM s'étend donc sur une durée allant de 3-10 générations de vecteurs.

Le TdM est indissociable du poste palu. En effet, c'est une intervention ponctuelle qui permet théoriquement de diminuer très rapidement la transmission. L'accès au DTP sera donc très important pour empêcher la reprise de la transmission après le TdM. Ce point est une originalité majeure du protocole Mahidol-Oxford par rapport aux tentatives précédentes. Par ailleurs, le TdM n'a pas pour objectif d'éliminer *P. vivax*. En effet, le parasite n'est pas éliminé avec le schéma thérapeutique du TdM : la clairance des hypnozoïtes nécessite un traitement par la primaquine à forte posologie pendant 14 jours alors que le TdM consiste en une dose unique de primaquine à faible dose. Concernant le taux d'infection des vecteurs et les indicateurs clinico-épidémiologiques (prévalence et incidence), l'effet attendu est donc transitoire pendant la durée de l'EPPT (un mois après la dernière prise du traitement).

Cette conception du TdM diffère drastiquement des tentatives précédentes de par son objectif (élimination vs contrôle) et/ou les protocoles thérapeutiques utilisés (CTA + faible dose de primaquine vs dose sous-optimale d'antipaludique ayant un faible impact sur la transmission) et/ou les moyens logistiques mis en œuvre (administration orale sous supervision directe dans certains villages vs traitement de tous les villages de la zone cible sans supervision directe) et/ou sa place au sein de la stratégie d'élimination (relation avec le diagnostic et traitement précoce, traitement des *hotspots* vs traitement de villages sans réservoir asymptomatique) etc. Pour une revue des tentatives précédentes, voir Greenwood 2004 et Newby *et al.* 2015 (Greenwood, 2004, Newby et al., 2015), pour une revue spécifique sur l'intérêt de la primaquine, voir Malaria Elimination Initiative, 2014 (Malaria Elimination Initiative, 2014) et pour l'avis de l'OMS, voir World Health Organization, 2015 (World Health Organization, 2015). A noter qu'un programme particulièrement ambitieux et intéressant d'élimination de *P. vivax* a été réalisé en Chine en recourant à une distribution massive de primaquine dans les années 1980 (>30M de personnes traitées) (Liu et al., 1986, Malaria Elimination Initiative, 2014).



**Figure VIII. Dessin réalisé par les écoliers du village de KNH pendant les activités d'engagement communautaire.**

L'engagement communautaire joue un rôle crucial dans le succès du programme d'élimination. Il a pour objectif que les communautés locales s'approprient le programme et soient les principaux acteurs de l'élimination.

### **3. Les risques du programme d'élimination**

Il existe deux risques principaux souvent opposés au programme d'élimination : d'une part la crainte d'observer un effet rebond lié à la réintroduction du parasite dans une population dont le niveau de prémunition a baissé (résurgence) et d'autre part celle de voir les résistances médicamenteuses aggravées.

#### **a) Résurgence du paludisme et prémunition**

Le risque de résurgence est faible pour autant que le système de détection mis en place soit maintenu. Cette affirmation est basée sur 30 ans d'expérience dans les camps de réfugiés situés le long de la frontière. La transmission a été complètement interrompue malgré la présence de vecteurs efficaces et d'une forte densité de population qui n'a jamais été exposée au parasite. Les rares cas symptomatiques importés sont diagnostiqués et traités rapidement

avant que la transmission homme-vecteur du parasite n'ait lieu. A mesure que le niveau de prémunition diminue dans la population, l'infection est plus fréquemment symptomatique et donc il est plus facile de détecter les cas et de les traiter. Il est important d'insister sur l'importance de maintenir un accès universel du DTP et d'informer les populations sur la nécessité de consulter rapidement en cas de fièvre bien que la maladie ait disparu.

## **b) Aggravation des résistances aux médicaments antipaludiques**

Dans le cadre du TdM, certains auteurs ont évoqué la crainte de voir les résistances s'aggraver du fait de l'utilisation massive des médicaments antipaludiques. Afin de comprendre ce point particulièrement important, il est nécessaire de définir précisément le risque. Nous rappellerons ici que le risque est celui de l'émergence *de novo* d'un clone de parasite résistant et viable chez un hôte infecté puis sa sélection le mois qui suit le traitement lorsque la concentration subthérapeutique du médicament confère un avantage sélectif au clone résistant par rapport aux clones sensibles. Pour cette raison, il est essentiel de mettre en place une surveillance des résistances médicamenteuses. Cela passe par la recherche de marqueurs moléculaires ainsi que le phénotypage *in vitro* (mesure de la CI50, essais de survie) et *in vivo* (mesure du temps de clairance parasitaire). Cependant, les risques de voir les résistances s'aggraver est très faible. Chez les porteurs sous-microscopiques, la charge parasitaire est très basse et il existe un certain degré de prémunition (l'infection est asymptomatique). Il est donc très peu probable que le parasite puisse survivre aux fortes concentrations des médicaments utilisés (White, 2017). Par ailleurs, lorsque la transmission du paludisme diminue, le nombre des cas cliniques diminue également. Or, la charge parasitaire est beaucoup plus élevée chez les porteurs symptomatiques qui sont la principale source de parasites *de novo* résistants (White et al., 2009). Si le nombre de cas cliniques diminue, le risque de voir des résistances se développer diminue également (White, 2017).

## C. SURVEILLANCE ENTOMOLOGIQUE DANS LE CONTEXTE DE L'ÉLIMINATION

### 1. Les indicateurs entomologiques

De nombreux indicateurs permettent de mesurer la transmission du paludisme. Chaque indicateur possède des avantages et des inconvénients et le choix dépend principalement de l'objectif du travail réalisé, de la précision, de l'exactitude et du coût de la mesure (Tusting et al., 2014). Concernant l'entomologie, deux indicateurs sont utilisés : le taux d'inoculation entomologique (TIE) et la capacité vectorielle (CV) (Tusting et al., 2014).

#### a) Le taux d'inoculation entomologique

Le TIE est défini comme le nombre de piqûres infectantes reçu par personne et par unité de temps, il mesure l'intensité de la transmission (Onori and Grab, 1980, Davey and Gordon, 1932). La méthode de référence pour estimer le TIE est de mesurer directement le taux de piqûre humain (TPH) et l'infectivité des vecteurs ou index sporozoïtaire (IS) puis de calculer la valeur du produit (1). Cette méthode simple peut rendre le calcul de l'intervalle de confiance compliqué car le TPH et l'IS ne sont pas indépendants ce qui nécessite d'estimer la covariance des deux paramètres (Charlwood et al., 1995). Une alternative est de considérer le TIE comme un compte de moustiques relatif à un nombre d'unités.temps de collection (Drakeley et al., 2003) et de calculer l'intervalle de confiance correspondant à l'aide de la loi distribution binomiale négative (Shilane et al., 2010, Nedelman, 1983) (2).

$$(1) TIE = ma \times IS = \frac{Nb. moustiques collectés}{Nb. nuits de collection} \times \frac{Nb. moustiques positifs}{Nb. moustiques testés}$$

$$(2) TIE = \frac{Nb. moustiques positifs}{Nb. de personnes.nuit de collection}$$

Les TIE est un indicateur fréquemment utilisé mais certains auteurs ont souligné les problèmes liés à l'hétérogénéité des méthodes utilisées pour estimer le TPH et l'IS. En effet, dans une méta-analyse, 230 estimations du TIE ont été recensées entre 1990 et 2004 et 11

méthodes différentes ont été utilisées (Hay et al., 2000, Kelly-Hope and McKenzie, 2009). Si l'IS et le TPH ne sont pas estimés précisément, il devient compliqué de mettre en évidence des variations du TIE du fait de l'incertitude inhérente à la mesure, surtout dans les zones de faible endémicité. Enfin, il est important de noter que le modèle de Ross-MacDonald considère une relation linéaire entre la force de l'infection (FOI) et le TIE. Cependant, l'efficacité de la transmission (FOI/TIE) diminue à mesure que l'intensité de la transmission augmente (Smith et al., 2006, Smith et al., 2010, Churcher et al., 2015). Smith *et al.* (Smith 2006) ont proposé trois hypothèses pour expliquer ce phénomène : l'immunité, la distribution hétérogène des piqûres et un biais systématique dans l'estimation du TIE (l'hétérogénéité étant l'hypothèse la plus forte). Cette observation souligne certaines limites des modèles actuels de transmission du paludisme et la nécessité d'ajuster ces modèles en tenant compte de cette hétérogénéité (Bousema et al., 2011).

## **b) La capacité vectorielle**

La capacité vectorielle est définie comme le nombre de piqûres potentiellement infectantes qu'une population de vecteurs est susceptible de générer à partir d'un hôte infectant par unité de temps (Macdonald, 1952, Garrett-Jones and Shidrawi, 1969). La CV est une mesure de « l'intensité potentielle de la transmission » en l'absence virtuelle du parasite. En effet, elle dépend de paramètres intrinsèques des vecteurs et ne repose pas sur l'estimation du taux d'infection dans la population d'anophèles considérée. Les paramètres sont le TPH (ou  $ma$ ), la probabilité de survie ( $p$ ) et la durée du cycle sporogonique ( $n$ ). Le paramètre  $p$  peut être calculé en élevant la proportion de femelles pares (taux de parité) à la puissance  $1/d$  avec  $d$  la durée du cycle gonotrophique. La durée du cycle gonotrophique peut être estimée en fonction de la température et de l'humidité (Detinova, 1962) ou mesurée expérimentalement.

$$(2) CV = \frac{ma^2 \times p^n}{-\ln(p)}$$

Les limites de la CV sont les assumptions sur lesquelles cet indicateur repose et le nombre important de paramètres à estimer. La longévité des vecteurs a un poids particulièrement important car elle est élevée à la puissance  $n$  (de Meillon et al., 1967). Dye en 1986 résume les limites de la CV : « *In summary, methods based on untested assumption are used to estimate parameters with unknown error* » (Dye, 1986). La CV est principalement

utilisée pour évaluer l'impact des interventions de LAV et comme covariable dans les modèles de transmission. Des travaux de modélisation ont montré qu'en zone de faible endémicité, la CV serait le principal déterminant de la prévalence du paludisme (Pongtavornpinyo et al., 2008). Il serait donc particulièrement important de comparer la CV mesurée dans les villages *hotspots* et dans des villages sans réservoir sous-microscopique.

## **2. Difficultés rencontrées pour la mesure des indicateurs**

### **a) Les complexes d'espèces et la taxonomie**

Dans la zone d'étude, la plupart des anophèles appartiennent à des complexes d'espèces jumelles qui sont identiques sur le plan morphologique (ou à des groupes d'espèces très proches pour lesquelles la morphologie classique est souvent équivoque) (World Health Organization, 2007). La description d'espèces jumelles repose sur une conjonction d'arguments à la fois phénotypiques (morphologie avancée, profil enzymatique, analyse de la composition chimique de la cuticule, viabilité de la descendance après croisement génétique) et génotypiques (chromosome polythène, caryotypes mitotiques et méiotiques et analyse de la séquence du génome) qui requièrent de mettre en œuvre des techniques très spécialisées (World Health Organization, 2007). En pratique, des techniques moléculaires simples à mettre en œuvre et relativement peu coûteuses ont été développées pour discriminer les espèces jumelles parmi les principaux complexes/groupes de vecteurs. Le plus souvent, elles sont basées sur le principe de la PCR (Garros et al., 2004, Walton et al., 2007, Walton et al., 1999). A noter que les technologies de protéomique telles que le MALDI-TOF ont été utilisées avec succès (Muller et al., 2013) mais elles sont rarement utilisées en routine. La discrimination des espèces jumelles est importante car différentes espèces sont associées à différents niveaux de compétence vectorielle, de comportement trophique, de résistance aux insecticides et/ou d'habitats larvaires (Sinka et al., 2011).

### **b) Le taux de piqûre et les techniques de collection**

La méthode de choix pour collecter les moustiques et estimer le TPH est la capture sur sujet humain (Silver, 2008). D'autres méthodes ont été utilisées notamment les pièges lumineux mais elles peuvent introduire un biais important dans l'estimation du TPH, à la fois qualitatif et quantitatif (Wong et al., 2013, Jawara et al., 2011). Un autre biais dans l'estimation

du TPH est la variabilité interindividuelle dans l'attractivité des collecteurs (Knols et al., 1995, Lindsay et al., 2000, Knols, 1996, Port et al., 1980, Ansell et al., 2002, Murphy et al., 2001) et l'hétérogénéité du TPH dans le temps et dans l'espace (Mbogo et al., 2003). Cela nécessite de multiplier les sites de collection et le nombre de nuits de collection afin de pouvoir réaliser une estimation précise du TPH et de sa variabilité.

### **c) Les taux d'infection et les techniques de détection**

En zone de faible endémicité, le taux d'infection et les charges parasitaires sont très faibles dans les populations d'anophèles infectées naturellement (Baker et al., 1987, Kabiru et al., 1997, Collins et al., 1984, Beier et al., 1991, Burkot et al., 1987, Wirtz et al., 1987). Cela nécessite de mettre en œuvre des techniques de détection très sensibles et spécifiques pour monitorer les taux d'infection et l'intensité de la transmission. Trois méthodes sont utilisées pour analyser en routine les échantillons entomologiques collectés en zone d'endémie : l'observation microscopique du tube digestif et/ou des glandes salivaires (Shute and Maryon, 1960), la détection d'antigènes du parasite par des technique d'ELISA (Burkot et al., 1984) ou la détection moléculaire de l'ADN du parasite par PCR (Snounou et al., 1993, Tassanakajon et al., 1993).

La microscopie est une méthode très sensible et spécifique mais elle nécessite d'analyser des échantillons fraîchement collectés (Shute and Maryon, 1960). Lorsque cette technique est utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques, la dissection d'un grand nombre d'échantillons nécessite une organisation considérable et d'important moyens humains (Shute and Maryon, 1960). Il n'est généralement pas possible d'identifier directement l'espèce plasmodiale. Shute *et al.* ont proposé une méthode basée sur l'observation du pigment dans les oocystes mais cela est rarement faisable en pratique et probablement imprécis (Shute and Maryon, 1960). A noter que l'identification peut être réalisée dans un second temps en utilisant une autre technique (ELISA ou PCR). Avec cette technique, les valeurs de l'index oocystique et de l'index sporozoïtaire mesurées dans la zone sont de 1-2% et 0.1-1% respectivement (Ismail et al., 1974, Rosenberg et al., 1990b, Rahman et al., 1993, Limrat et al., 2001).

Les techniques ELISA sont relativement sensibles (seuil de détection de 30 sporozoïtes/moustique) mais le problème majeur vient de la spécificité. En effet, plusieurs

études ont évoqué les limites de cette technique du fait de résultats faussement positifs, en particulier lorsque les spécimens sont gorgés et collectés sur appât animal (Somboon, 1993, Somboon et al., 1998, Durnez et al., 2011). Ce problème de spécificité se traduit en pratique par une surestimation du taux d'infection des vecteurs et par l'incrimination d'espèces dans la transmission alors que ce ne sont pas des vecteurs.

Enfin, la détection moléculaire de l'ADN de plasmodium par PCR est un outil intéressant mais les performances sont très hétérogènes. Elles varient en fonction de la technique utilisée mais aussi en fonction de l'expertise du groupe de travail (Apfalter et al., 2005, Bustin, 2010, Bastien et al., 2008). Deux technologies sont utilisées : la PCR conventionnelle et la PCR en temps réel. La PCR en temps réel a trois avantages principaux : elle diminue drastiquement le risque de contamination, elle diminue la charge de travail et elle permet de mettre au point des techniques quantitatives. Le problème des contaminations est une limitation majeure du diagnostic moléculaire. Il se traduit par une surestimation des taux d'infection et par l'incrimination à tort d'espèces dans la transmission. Par ailleurs, lorsque la technique de PCR est peu sensible, la plupart des spécimens infectés naturellement ne sont pas détectés car ils ont une charge parasitaire en-dessous du seuil de détection de la technique de PCR utilisée. A la différence des études cliniques, la vérification-validation de la méthode et le contrôle de la qualité est rarement mis en œuvre lors des études entomologiques. Le dernier article à avoir rapporté un seuil de détection sur une gamme de sporozoïtes de plasmodium date de 1993 (Tassanakajon et al., 1993). Les autres paramètres analytiques, en particulier la spécificité, sont particulièrement difficiles à mesurer du fait de l'absence de technique de référence et de la difficulté de produire des échantillons de référence. En effet, cela nécessite de faire des infections expérimentales d'anophèles au laboratoire et de produire des suspensions calibrées de sporozoïtes.

### **3. Les modèles statistiques**

#### **a) Structure et caractéristiques des données entomologiques**

La modélisation des données entomologiques nécessite de mettre en œuvre des méthodes statistiques avancées. En effet, les indicateurs entomologiques sont généralement des réponses binaires (ex. présence ou absence d'une espèce dans un site donnée), des proportions (ex. taux d'infection et taux de mortalité) ou des comptes (ex. TPH et TIE) dont la

distribution statistique ne suit pas une loi Normale. Les comptes suivent traditionnellement une loi de Poisson. Cependant les comptes de vecteurs ont la particularité d'être souvent surdispersés du fait d'un excès de zéro (Boussari et al., 2012). Par conséquent, la fonction binomiale négative est souvent préférée pour décrire la distribution statistique de la variable à expliquer (Nedelman, 1983, Drakeley et al., 2003, Wong et al., 2013). Certains auteurs ont également utilisé un mixte de la loi de Poisson et de la loi binomiale négative (Boussari et al., 2012).

Les données sont généralement hiérarchisées dans l'espace (village, site de collection et positionnement du collecteur à l'intérieur ou à l'extérieur de l'habitation) et longitudinales (mesures répétées dans le temps). Cela nécessite de prendre en compte les effets aléatoires liés à l'hétérogénéité spatiale des indicateurs et le fait que les données ne sont pas indépendantes. En pratique, deux approches sont principalement utilisées. La première repose sur l'utilisation des modèles linéaires généralisés mixtes (MLGM), la seconde sur l'utilisation des systèmes d'équations d'estimation généralisée (EEG). Burton *et al.* ont écrit une bonne introduction pour l'analyse des données longitudinales et corrélées en couvrant différents aspects des MLGM et des GEE (Burton et al., 1998). Plus récemment, Bolker *et al.* (Bolker et al., 2009) et Hanley *et al.* (Hanley et al., 2003) ont apporté des éléments supplémentaires concernant les MLGM et les EEG respectivement. A noter que certains auteurs ont proposé l'utilisation de modèles de haie ou « *hurdle models* » pour expliquer dans un premier temps la présence/absence d'une espèce vectrice (comptes nuls vs positifs) (Moiroux et al., 2013) puis dans un second temps, l'abondance de cette espèce (distribution des valeurs positives) (Moiroux et al., 2014b). Enfin, les modèles de trajectoire latente de classe (Muthen and Muthen, 2000, Andruff et al., 2009) sont intéressants pour modéliser le profil d'exposition à une espèce donnée mesuré lors d'un suivi longitudinal (*ex.* exposition continue vs transitoire) mais leur utilisation en entomologie est rare et beaucoup plus récente (Boussari et al., 2014).

## **b) Les modèles linéaires généralisés mixtes et multi-niveaux**

Les modèles linéaires généralisés mixtes combinent les propriétés de deux approches statistiques : les modèles linéaires mixtes (qui incorporent des effets aléatoires) et les modèles linéaires généralisés (qui permettent d'analyser des données qui ne suivent pas une loi

Normale) (Bolker et al., 2009, McCullagh and Nelder, 1989). Lors d'une régression linéaire classique, le coefficient de la régression prend une valeur fixe pour tous les individus du jeu de données, d'où le terme « effet fixe ». Au contraire, l'effet aléatoire est un coefficient de la régression qui peut prendre des valeurs différentes d'un individu à l'autre. Cela consiste à déterminer une valeur de l'interception à l'origine pour chacun des individus et de définir une interception générale pour la population. La différence entre la vraie valeur de l'interception à l'origine pour un individu donné et la valeur de l'interception à l'origine pour la population correspond à l'effet aléatoire. Le paramétrage du modèle nécessite de spécifier une fonction de liaison, une loi de distribution et une structure pour l'effet aléatoire. La fonction de liaison spécifie une transformation non linéaire des valeurs observées de sorte que leur distribution suive l'une des lois de la famille des distributions exponentielles (ex. gamma, Poisson, binomiale, etc.). La fonction de liaison est utilisée pour modéliser les réponses si l'on suppose qu'une variable à expliquer est liée de façon non linéaire à des prédicteurs. Plusieurs fonctions de liaison sont couramment utilisées suivant la distribution des valeurs de la variable à expliquer (McCullagh and Nelder, 1989). La méthode statistique pour estimer les coefficients du modèle - effets fixes (effet des variables explicatives, par exemple l'effet de la pluie sur le TPH) et des effets aléatoires (par exemple les variations du TPH liées au site de collection) - fait appel à la notion statistique du maximum de vraisemblance. Dans le cas des MLGM, l'estimation du maximum de vraisemblance doit intégrer toutes les valeurs possibles de l'effet aléatoire ce qui rend le calcul généralement impossible sur le plan computationnel. Des méthodes alternatives ont été proposées pour estimer le maximum de vraisemblance notamment la pseudo quasi-vraisemblance, l'approximation de Laplace, la quadrature de Gauss-Hermite et la méthode de Monte-Carlo par chaîne de Markov (Bolker et al., 2009). Une fois les paramètres du modèle estimés, le but ultime du travail de modélisation est de réaliser des inférences statistiques, c'est-à-dire tirer des conclusions statistiques et biologiques (par exemple en examinant la valeur des coefficients et leur intervalle de confiance ou en réalisant des tests d'hypothèse). Dans le cas des MLGM, les inférences sont compliquées par des effets limites et parce qu'il est difficile de déterminer le nombre de degrés de liberté (Bolker et al., 2009). Les avantages et inconvénients des différents tests statistiques utilisables ont été présentés en détail par Bolker *et al.* (Bolker et al., 2009).

### c) Les systèmes d'équations d'estimation généralisée

Les modèles EEG ont deux particularités majeures par rapport aux MLGM. Premièrement, ils permettent d'estimer la corrélation intra-individuelle de la variable à expliquer et de la prendre en compte dans le calcul des coefficients. Deuxièmement, il est possible d'utiliser une méthode *robuste* (c'est-à-dire empirique) pour le calcul des écart-types des coefficients (Hanley et al., 2003, Burton et al., 1998). Cela permet de faire des inférences statistiques correctes même si la structure de corrélation n'est pas exacte. Les EEG appartiennent aux modèles marginaux, c'est-à-dire que la relation de régression linéaire et les paramètres de la corrélation intra-individuelle sont modélisés séparément. Il existe plusieurs types de structure de corrélation et celle-ci doit être spécifiée *a priori*. Dans le cas de la structure « échangeable », toutes les mesures d'un individu sont également corrélées.

## D. OBJECTIFS DE LA THESE

Cette étude pilote s'inscrit dans le cadre d'un essai clinique multicentrique randomisé par grappe visant à évaluer l'efficacité, la sécurité, l'acceptabilité et la faisabilité du TdM pour l'élimination des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux artémisinines en ASE continentale (ClinicalTrials.gov: NCT01872702). Les quatre villages inclus dans le site thaïlandais sont des *hotspots* où la prévalence de l'infection asymptomatique (généralement sous-microscopique) est particulièrement élevée. L'objectif principal du volet entomologique de cette étude est d'évaluer l'impact de l'élimination du réservoir sous-microscopique (par le TdM) sur les indicateurs entomologiques de la transmission. L'ensemble des objectifs et des résultats attendus sont présentés dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3. Objectifs de la thèse et résultats attendus.**

Objectif	Résultat(s) attendu(s)
<b>Objectif primaire.</b> Evaluer l'impact de l'élimination du réservoir sous-microscopique par le TdM sur les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme.	<b>1.</b> modélisation statistique de l'intensité de la transmission (TIE) avant, pendant et après l'intervention en regard de la prévalence de l'infection asymptomatique et de l'incidence clinique du paludisme.
<b>Objectif secondaire n°1.</b> Mettre au point une technique de détection sensible, spécifique et quantitative pour la détection	<b>1.</b> optimisation des conditions réactionnelles de cinq techniques de PCR en temps réel ; <b>2.</b> comparaison des performances aux faibles concentrations ;

de plasmodium dans les échantillons entomologiques.	<b>3.</b> vérification et validation des performances de la méthode d'analyse utilisée en routine.
<b>Objectif secondaire n°2.</b> Déterminer l'importance de l'EPPT de la pipéraquline pour expliquer l'effet du TdM sur la transmission.	<b>1.</b> modélisation statistique de l'intensité de la transmission (TIE) en fonction du taux de couverture du TdM.
<b>Objectif secondaire n°3.</b> Décrire la biodiversité de l'entomo-faune anophélienne.	<b>1.</b> identification morphologique des anophèles collectés sur sujet humain et appât animal ; <b>2.</b> identification moléculaire des espèces au sein des groupes <i>Funestus</i> , <i>Leucosphyrus</i> et <i>Maculatus</i> .
<b>Objectif secondaire n°4.</b> Identifier les vecteurs du paludisme responsables de la transmission dans la zone étudiée.	<b>1.</b> mesure des taux d'infection des anophèles collectés sur sujet humain ; <b>2.</b> mesure des charges parasitaires des spécimens positifs en PCR ; <b>3.</b> identification moléculaire des spécimens positifs en PCR.
<b>Objectif secondaire n°5.</b> Décrire le comportement trophique des vecteurs du paludisme.	<b>1.</b> détermination du taux d'exophagie, du taux de zoophagie et du profil d'activité nocturne des différentes espèces ou groupes d'espèces collectés sur sujet humain et appât animal.
<b>Objectif secondaire n°6.</b> Décrire l'hétérogénéité spatiale et la saisonnalité des indicateurs entomologiques de la transmission.	<b>1.</b> dynamique du TPH, de l'IS et du TIE mesurés mensuellement pendant une période de deux ans dans quatre villages.
<b>Objectif secondaire n°7.</b> Evaluer la sensibilité des vecteurs du paludisme à la deltaméthrine, à la perméthrine et au DDT et déterminer l'implication des mécanismes de type <i>kdr</i> .	<b>1.</b> résultats des tests phénotypiques réalisés sur des populations adultes sauvages d'anophèles ; <b>2.</b> mise au point et validation d'une technique de PCR pour la détection des mutations <i>kdr</i> dans les populations anophéliennes de la ZTTM ; <b>3.</b> génotypage des spécimens ayant survécu aux tests phénotypiques.
<b>Objectif secondaire n°8.</b> Déterminer l'impact théorique des méthodes de lutte anti-vectorielle recommandées par l'O.M.S. et émettre des recommandations pour le contrôle de la transmission résiduelle.	<b>1.</b> distribution des piqûres infectantes à l'intérieur et à l'extérieur des habitations en fonction de l'heure de collection ; <b>2.</b> détermination du taux de piqûre et du taux d'infection des vecteurs collectés sur appât animal.

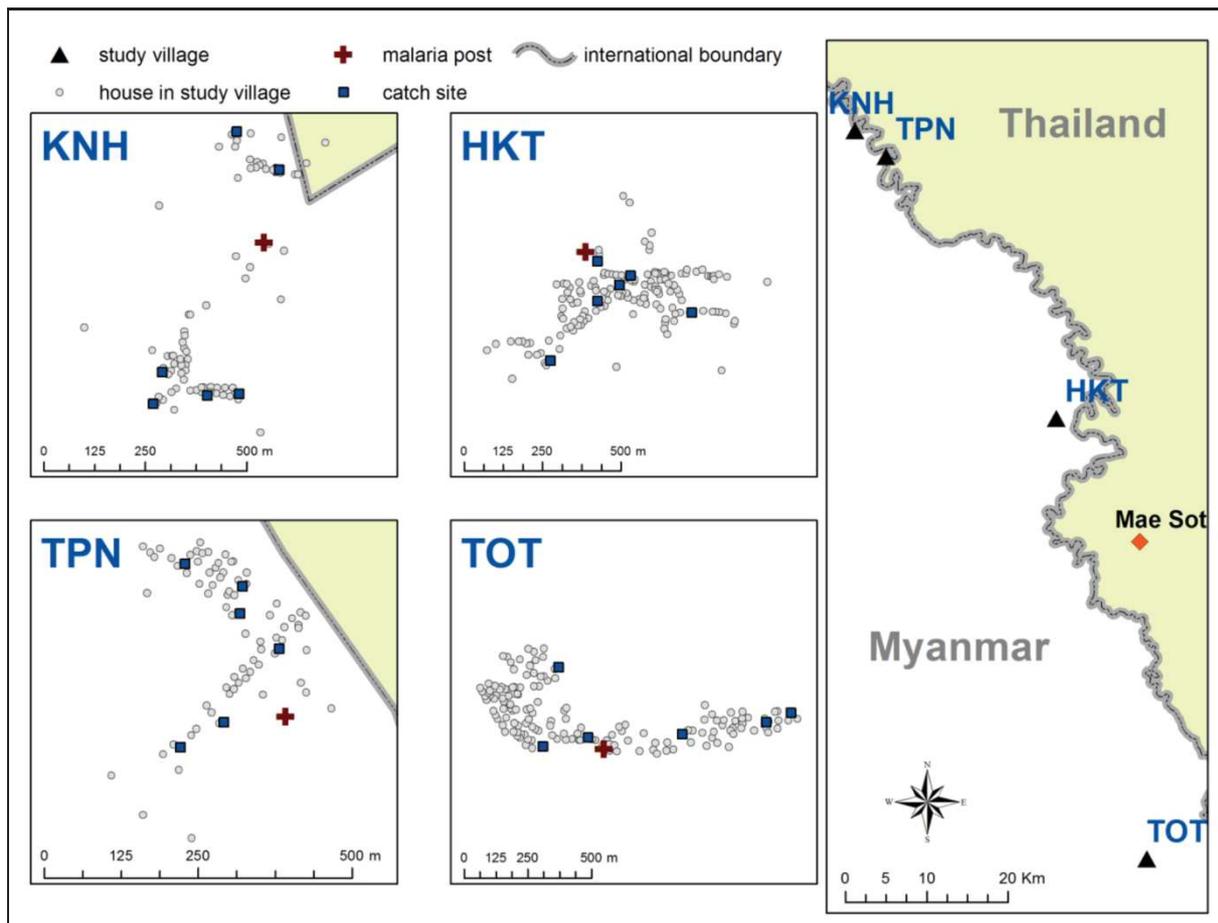
## II. MATERIELS ET METHODES

---

### A. CONCEPTION GENERALE DE L'ETUDE

#### 1. Sélection des villages

Cette étude a été réalisée dans l'Est de l'état Karen en Birmanie entre 2013 et 2015. Au début de l'année 2013, des enquêtes transversales ont été réalisées dans 12 villages (Imwong et al., 2015a) afin déterminer la prévalence de l'infection palustre en utilisant une technique moléculaire « ultra-sensible » (Imwong et al., 2014). Quatre villages ont été sélectionnés sur la base des critères d'inclusion suivants : (i) prévalence de l'infection asymptomatique (généralement sous-microscopique) >30% pendant la saison des pluies dont >10% de *P. falciparum* parmi les échantillons positifs, (ii) accessibilité depuis Maesot et (iii) volonté de la communauté de participer à l'étude (**Figure IX**).



**Figure IX. Carte des villages et des sites de capture.**

Quatre villages ont été sélectionnés pour cette étude pilote sur la base de leur accessibilité à partir de Maesot, de la volonté des communautés de participer à l'étude et de critères parasitologiques (résistance à l'artémisinine chez *P. falciparum* et forte prévalence de l'infection asymptomatique, généralement sous-microscopique).

## 2. Intervention

Au début de l'étude, un poste palu a été mis en place dans chaque village afin de diagnostiquer et de traiter de manière précoce tous les cas incidents (symptomatiques) de paludisme. L'arbre décisionnel définissant la prise en charge des patients au dispensaire est présenté en **Annexe 1**. Des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (Permanet® 2.0, Bayer) ont été distribuées dans tous les foyers. Les villages ont été appariés et le TdM a été administré séquentiellement : les villages du groupe A (A1-KNH et A2-TOT) ont reçu le traitement de masse au début de l'étude (à M0, M1 et M2). Les villages du groupe B (B1-TPN and B2-HKT) ont reçu le traitement de masse pendant la deuxième partie de l'étude (à M9, M10 et M11). Le CTA utilisé pour le traitement de masse est la dihydroartémisinine-

pipéraquline (2.1 mg/kg de dihydroartémisinine et 17.0 mg/kg de pipéraquline une fois par jour pendant trois jours). Une faible dose de primaquine (0.25 mg de primaquine base/kg) a été administrée à J1 du traitement dihydroartémisinine-pipéraquline. Le TdM a été répété trois fois à un mois d'intervalle dans chaque village et administré sous supervision directe par voie orale. L'intervention a été présentée de manière détaillée par Landier *et al.* en 2017 (Landier et al., 2017).

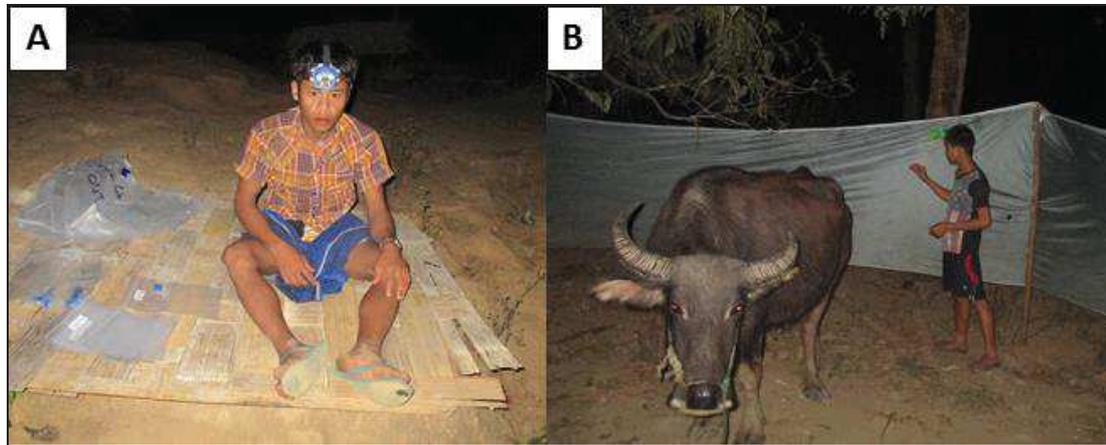
### 3. Suivi longitudinal

Sur le plan démographique, un recensement de la population a été organisé au début de l'étude afin de déterminer le nombre total de résidents (Landier et al., 2017). Tous les villageois ont été invités à participer à l'étude. Tous les participants ont reçu un numéro d'identification unique. Toutes les habitations ont été géoréférencées et l'adresse de chaque résident a été enregistrée. Des visites à domicile ont été réalisées tous les 15 jours afin de documenter la mobilité des participants ainsi que les arrivées et départs dans la communauté.

Sur le plan clinico-épidémiologique, des enquêtes exhaustives de prévalence ont été effectuées de manière transversale aux mois 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 et 24. L'ensemble des procédures utilisées pour le prélèvement, le prétraitement des échantillons et le diagnostic moléculaire de l'infection palustre ont été décrits précédemment (Imwong et al., 2014, Imwong et al., 2015a). Le seuil de détection de la technique de PCR utilisée est de 22 parasites/ml de sang (Imwong et al., 2014). Les cas symptomatiques incidents ont été documentés au poste palu de manière continue pendant toute la durée de l'étude.

Enfin, une surveillance entomologique a été mise en place dans chaque village afin de monitorer les aspects entomologiques de la transmission (biodiversité, abondance, taux d'infection, comportement et sensibilité aux insecticides des anophèles). Des enquêtes ont été réalisées mensuellement pendant 18 mois puis une mesure en point final a été effectuée 24 mois après le début de l'étude (total de 21 enquêtes par village). Les collections ont eu lieu entre 18:00h et 06:00h pendant 5 nuits consécutives dans 6 sites par village. Les moustiques ont été collectés par capture sur sujet humain (CSH) dans cinq maisons traditionnelles Karen (un collecteur assis à l'intérieur et un collecteur assis à l'extérieur) et par capture sur appât animal (CAA) en utilisant une vache dans le sixième site (**Figure X**). Chaque enquête représente un total de 50 hommes.nuit et 5 vaches.nuit de collection. La deuxième enquête dans le village

B2-HKT n'a duré que deux nuits (20 hommes.nuit et 2 vaches.nuit) et la onzième enquête dans le village B1-TPN a été annulée. Les sites de capture ont été géoréférencés et conservés pendant toute la durée de l'étude.



**Figure X. Techniques de collection utilisées lors des enquêtes entomologiques.**  
A) capture sur sujet humain, B) capture sur appât animal.

## **B. PROCEDURES DE LABORATOIRE POUR L'ANALYSE DES ECHANTILLONS ENTOMOLOGIQUES**

### **1. Description générale de la procédure**

Une fois réceptionnés au SMRU, les moustiques ont immédiatement été identifiés au niveau du genre. Les anophèles ont été conservés individuellement à -20°C dans des tubes de 1,5 ml contenant du gel de silice. Chaque tube a reçu un numéro unique puis la date, le village, le site, la méthode de collection et l'heure de la capture ont été enregistrés pour chaque spécimen et saisis dans une base de données. Chaque spécimen a été identifié sur la base de critères morphologiques (Rattanarithikul et al., 2006) puis l'ADN des espèces vectrices a été extrait afin de déterminer leur taux d'infection et d'identifier les espèces jumelles par des techniques moléculaires. A noter que la tête et le thorax de chaque spécimen ont été séparés de l'abdomen afin de détecter spécifiquement les moustiques infectants (dont les glandes salivaires sont infestées de sporozoïtes), c'est-à-dire capables de transmettre l'infection pendant un repas sanguin. La détection moléculaire du plasmodium a été réalisée en utilisant des techniques de PCR quantitatives en temps réel développées spécifiquement durant cette

thèse (Chaumeau et al., 2016). Les espèces jumelles des complexes *An. minimus s.l.*, *An. maculatus s.l.* et *An. dirus s.l.* ont été discriminées en utilisant des techniques de PCR conventionnelle adaptées d'après les travaux de Walton *et al.* et de Garros *et al.* (Walton et al., 1999, Walton et al., 2007, Garros et al., 2004). Le suivi de la résistance des populations anophéliennes à la deltaméthrine, la perméthrine et au DDT a été réalisé à trois reprises au cours de l'étude en utilisant un test phénotypique standardisé (test cylindre OMS) (World Health Organization, 2016). La recherche de mutations *kdr* impliquées dans la résistance aux insecticides a été réalisée sur les individus survivant au test cylindre par une technique de PCR adaptée d'après les travaux de Syafruddin *et al.* (Syafruddin et al., 2010).

## 2. Identification morphologique

L'identification morphologique a été réalisée en utilisant la clé dichotomique illustrée pour les anophèles de Thaïlande publiée par Rattanaritikhul *et al.* en 2006 (Rattanarithikul et al., 2006). Le cheminement nécessaire pour identifier les anophèles collectées dans la zone d'étude a été simplifié *a posteriori*, il est présenté en **Annexe 2**. En pratique, 12 espèces ou groupes d'espèces ont été collectés. Seulement deux sont des espèces *stricto sensu* (*An. tessellatus* et *An. kochi*). De par l'ampleur des collections, il n'a pas été possible d'être exhaustif dans la discrimination des espèces au sein des groupes Barbirostris, Hyrcanus, Annularis, Jamesii, Subpictus, Maculatus et Aconitus bien que cela soit techniquement possible.

### 3. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une étape particulièrement importante qui détermine de manière restrictive la qualité du diagnostic moléculaire (Yera et al., 2009). Au début de l'étude, les performances de plusieurs méthodes commerciales basées sur l'utilisation de colonnes de silice ont été comparées à celles d'une méthode « maison » adaptée d'après le travail de Winnepenninckx *et al.* (Winnepenninckx et al., 1993) utilisant le bromure de cetyltriméthylammonium (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide, CTAB). Cette dernière méthode, par ailleurs très bon marché, a été sélectionnée du fait de la qualité de l'ADN et du rendement de l'extraction (contrôlés par la mesure du ratio des absorbances à 260 et à 280 nm). Brièvement, l'échantillon à extraire est placé dans un tube de 1,5 ml avec deux billes de tungstène de 1mm de diamètre et 200 µL de solution de CTAB à 2% (TrisHCl pH = 8, 20mM; EDTA 10mM; NaCl, 1.4 mM; N-cetyl-N,N,N,-trimethyl ammonium bromide 2%) ; puis broyé avec un broyeur TissueLyser II<sup>®</sup> (Qiagen) réglé à 29 mvt/sec pendant 4 min. Le broyat est ensuite chauffé à 65°C pendant 5 min avant d'ajouter 200 µL de chloroforme. Les échantillons sont centrifugés à 10,000 rpm pendant 5 min puis le surnageant est transféré dans un tube de 1,5 ml. L'ADN est précipité en ajoutant 200 µL d'isopropanol puis centrifugé pendant 15 min à 10,000 rpm. Le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol à 70% puis le culot est dissout dans 40 µL d'eau (Chaumeau et al., 2016).

### 4. Identification moléculaire des espèces jumelles

La mise en œuvre de techniques moléculaires est nécessaire pour discriminer les espèces jumelles au sein des complexes Annularis, Barbirostris, Culicifacies, Dirus et Minimus. Par ailleurs, elle peut faciliter la discrimination d'espèces très proches morphologiquement comme les espèces du groupe Maculatus ou les espèces au sein du groupe Funestus (sous-groupes Aconitus, Culicifacies et Minimus). A noter que la taxonomie des complexes Annularis et Barbirostris n'est pas entièrement résolue et qu'il n'existe pas encore de technique de référence pour identifier les espèces présentes en Thaïlande. De par l'ampleur des collections, il n'a pas été possible d'être exhaustif dans la description de la biodiversité spécifique au sein des complexes d'espèces jumelles en présence. L'analyse a été réalisée sur un sous-échantillon des spécimens appartenant aux complexes Minimus et Dirus et au groupe Maculatus.

Les techniques utilisées en première intention pour l'identification moléculaire des espèces jumelles ont été adaptées d'après les travaux de Garros *et al.* et de Walton *et al.* (Walton *et al.*, 2007, Garros *et al.*, 2004, Walton *et al.*, 1999). Ces techniques de PCR conventionnelle en multiplex ciblent le gène ITS2 et produisent un fragment de taille variable en fonction de l'espèce. Les amorces publiées par Garros *et al.* permettent de discriminer les espèces jumelles du complexe Minimus (*An. minimus* (s.s.) et *An. harrisoni*) et trois espèces proches du groupe Funestus (*An. aconitus* (s.s.), *An. pampanai* et *An. varuna*) (Garros *et al.*, 2004). Les amorces publiées par Walton *et al.* permettent de discriminer cinq espèces jumelles du complexe Maculatus (*An. maculatus* (s.s.), *An. sawadwongporni*, *An. pseudowillmori*, *An. dravidicus* et *An. rampae*) (Walton *et al.*, 2007) et cinq espèces jumelles du complexe Dirus (*An. dirus* (s.s.), *An. scanloni*, *An. cracens*, *An. baimaii* et *An. nemophilous*) (Walton *et al.*, 1999). Les analyses ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 0,5 unité de Goldstar® Taq DNA polymérase (Eurogentec), 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 400 nM de chaque amorce et 4 µL d'extrait d'ADN. La PCR Minimus a été réalisée avec le protocole de thermocyclage suivant : activation initiale de la polymérase à 94°C pendant 2 min puis 40 cycles d'amplification à 94°C pendant 30 sec, 45°C pendant 30 sec et 72°C pendant 40 sec puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min. La PCR Maculatus a été réalisée avec le protocole de thermocyclage suivant : activation initiale de la polymérase à 94°C pendant 2 min puis 35 cycles d'amplification à 94°C pendant 60 sec, 55°C pendant 30 sec et 72°C pendant 30 sec puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 min. La PCR Dirus a été réalisée avec le protocole de thermocyclage suivant : activation initiale de la polymérase à 94°C pendant 2 min puis 35 cycles d'amplification à 94°C pendant 60 sec, 55°C pendant 15 sec et 72°C pendant 40 sec puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 min. La taille du produit de la PCR a été déterminée par une électrophorèse en gel d'agarose à 2%. En cas de résultat négatif avec la technique de première intention, une PCR en simplex ciblant le gène ITS2 avec des amorces universelles spécifiques du genre *Anopheles* a été réalisée d'après les travaux de Beebe *et al.* publiés en 1995 (Beebe and Saul, 1995). Les analyses ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 0,5 unité de Goldstar® Taq DNA polymérase (Eurogentec), 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 400 nM de chaque amorce et 4 µL d'extrait d'ADN. Le protocole de thermocyclage comprend une étape d'activation initiale de la polymérase à 94°C pendant 5 min puis 35 cycles d'amplification à 94°C pendant 15 sec, 51°C

pendant 15 sec et 72°C pendant 30 sec, puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min. Le produit de la réaction a été séquencé par une firme commerciale (MacroGen®, Seoul). L'espèce jumelle a été déterminée en analysant la séquence obtenue avec le programme BLAST (McWilliam et al., 2013b). Les amorces utilisées pour l'identification moléculaire des anophèles sont présentées dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4. Amorces utilisées pour les PCR d'espèces jumelles.**

PCR	Espèce	Nom	Séquence	Taille du produit (en paires de bases)
Minimus	Amorce universelle sens	ITS2A	5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3'	
	<i>An. minimus s.s.</i>	MIA	5'-CCCGTGCGACTTGACGA-3'	310
	<i>An. harrisoni</i>	MIC	5'-GTTTCATTTCAGCAACATCAGT-3'	180
	<i>An. aconitus</i>	ACO	5'-ACAGCGTGTACGTCCAGT-3'	200
	<i>An. pampanai</i>	PAM	5'-TGTACATCGGCCGGGGTA-3'	90
	<i>An. varuna</i>	VAR	5'-TTGACCACTTTCGACGCA-3'	260
Maculatus	Amorce universelle sens	5.8F	5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3'	
	<i>An. maculatus s.s.</i>	MAC	5'-CCCGTGCGACTTGACGA-3'	310
	<i>An. pseudowillmori</i>	PSEU	5'-GTTTCATTTCAGCAACATCAGT-3'	180
	<i>An. sawadwongporni</i>	SAW	5'-ACAGCGTGTACGTCCAGT-3'	200
	<i>An. rampae</i>	K	5'-TGTACATCGGCCGGGGTA-3'	90
	<i>An. dravidicus</i>	DRAV	5'-TTGACCACTTTCGACGCA-3'	260
Dirus	Amorce universelle sens	D-U	5'-CGCCGGGGCCGAGGTGG-3'	
	<i>An. dirus s.s. / An. scanloni</i>	D-AC	5'-CACAGCGACTCCACACG-3'	562/353
	<i>An. cracens</i>	D-B	5'-CGGGATATGGGTCCGCC-3'	514
	<i>An. baimaii</i>	D-D	5'-GCGCGGGACCGTCCGTT-3'	306
	<i>An. nemophilous</i>	D-F	5'-AACGGCGGTCCCTTTG-3'	223
ITS2	Amorce universelle sens	ITS2A	5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3'	
	Amorce universelle anti-sens	ITS2B	5'-ATGCTTAAATTYAGGGGGT-3'	300

## 5. Détection du plasmodium

Les techniques de détection de plasmodium utilisées dans cette étude ont fait l'objet d'un long travail de mise au point et d'optimisation afin de s'assurer des performances analytiques de la procédure de routine. Ce travail a été publié dans la revue Plos One (Chaumeau et al., 2016). Nous présenterons ici les matériels et méthodes utilisés, les résultats de cette étude comparative seront présentés dans le chapitre 1.

## a) Echantillons de référence

Dans cette étude, nous avons comparé la sensibilité des amorces aux faibles concentrations de parasite en fonction du stade parasitaire (stades sanguins, oocystes et sporozoïtes). Des échantillons non calibrés ont été obtenus à partir (i) du sang de patients infectés (stades sanguins), (ii) d'abdomens de moustiques infectés 7 jours après le repas infectant (oocystes) et (iii) de tête-thorax de moustiques infectés 15 jours après le repas infectant (sporozoïtes). Par ailleurs, des suspensions calibrées de sporozoïtes ont été utilisées pour mettre au point une courbe d'étalonnage permettant la quantification absolue du parasite et la détermination du seuil de détection de la technique. L'ADN des échantillons entomologiques a été extrait en utilisant le protocole CTAB décrit précédemment. L'ADN des échantillons sanguins a été extrait en utilisant le kit commercial DNEasy kits® (Qiagen). Toutes les expériences ont été répliquées pour *P. falciparum* et pour *P. vivax*. L'ensemble des procédures utilisées ont été décrites plus en détail par ailleurs (Chaumeau et al., 2016).

## b) Techniques de PCR en temps réel et choix des amorces

Cinq techniques (sept couples d'amorces) ont été sélectionnées pour cette étude comparative (**Tableau 5**). Les amorces publiées par Mangold *et al.* ciblent les gènes codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal, elles permettent de détecter et d'identifier les 4 espèces plasmodiales humaines sur la base de la température de fusion du produit de la PCR réalisée en simplex. La technique publiée par Bourgeois *et al.* est une PCR en simplex ciblant une région non codante de l'ADN mitochondrial conservée au sein du genre *Plasmodium*. Ces amorces ne permettent pas de discriminer les différentes espèces. Les amorces publiées par Cunha *et al.* ciblent le gène COX-III de *P. falciparum* et le gène COX-I de *P. vivax*. La température de fusion du produit de la PCR réalisée en duplex permet de différencier les deux espèces plasmodiales. Les amorces décrites par Ciceron *et al.* ciblent une région conservée des gènes codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal de plasmodium, cette PCR en simplex permet de détecter toutes les espèces plasmodiales humaines mais elle ne permet pas de les discriminer (Ciceron et al., 1999). Enfin, les amorces publiées par Perandin *et al.* ciblent une région variable des gènes codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal de *P. falciparum* et *P. vivax*. Cette PCR en duplex permet de discriminer les deux espèces (Perandin et al., 2004).

**Tableau 5. Résumé des amorces utilisées pour la détection moléculaire de plasmodium dans les moustiques.**

Technique (référence)	Amorce	Séquence	Cible	Espèce plasmodiale détectée
I (Bourgeois <i>et al.</i> , 2010) ‡	Forward	5'-TAGCCGACAAGGAATTTTGC-3'	séquence mitochondriale non codante	<i>P. spp.</i>
	Reverse	5'-CCTTGAATGGAGCACTGGAT-3'		
II (Cunha <i>et al.</i> , 2009) ‡	Pf1	5'-CCTGCATTAACATCATTATATGGTACATCT-3'	COX I	<i>P. falciparum</i>
	Pf2	5'-GATTAACATTCTTGATGAAGTAATGATAATACCTT-3'		
	Pv1	5'-AAGTGTTGTATGGGCTCATCATATG-3'	COX III	<i>P. vivax</i>
	Pv2	5'-CAAATGGAAATGAGCGATTACAT-3'		
III (Ciceron <i>et al.</i> , 1999)	Pssp1	5'-AGTTACGATI'AATAGGAGTAG-3'	18S ssuRNA	<i>P. spp.</i>
	Pssp2	5'-CCAAAGACTI'TGATTTCTCAT-3'		
IV (Mangold <i>et al.</i> , 2005) ‡	PL1473F18	5'-TAACGAACGAGATCT TAA-3'	18S ssuRNA	<i>P. spp.</i> *
	PL1679R18	5'-GTTCTCTAAGAAGCTTT-3'		
V (Perandin <i>et al.</i> , 2004)	FAL-F	5'-CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA-3'	18S ssuRNA	<i>P. falciparum</i>
	FAL-R	5'-TATTCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA-3'		
	VIV-F	5'-ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT-3'	18S ssuRNA	<i>P. vivax</i>
	VIV-R	5'-ATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC-3'		

\* la courbe de fusion permet de discriminer quatre espèces de Plasmodium (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) ;

‡ techniques utilisées pour les analyses de routine.

Un protocole standard de thermocyclage a été développé d'après les instructions du fabricant de la polymérase. Toutes les analyses ont été réalisées dans un volume réactionnel de 10 µL avec le mix commercial 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis Biodyne) et un thermocycleur CFX96-Touch (Biorad). Le même protocole de thermocyclage a été utilisé pour toutes les analyses : (i) activation de la polymérase pendant 15 min à 95°C, (ii) 45 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C pendant 15 sec, hybridation en mode gradient pendant 15 sec puis élongation à 72°C pendant 20 sec) et (iii) courbe de fusion (95°C pendant 15 sec, 68°C pendant 1 min, 80°C pendant 15 sec, 60°C pendant 15 sec, puis augmentation de 60°C à 90°C avec un incrément de 0.2°C par seconde). Pour chaque couple d'amorces, une analyse en mode gradient a été réalisée afin d'optimiser la température d'hybridation (52-62°C) ainsi que la concentration en amorces (200-350 nM) et en MgCl<sub>2</sub> (1.5-3.5 mM).

### **c) Dilution en série**

Des échantillons négatifs (sang, tête-thorax et abdomen d'anophèles) ont été extraits en suivant la même procédure que pour les échantillons positifs standards afin d'obtenir une matrice négative adéquate pour les dilutions en série. Les échantillons standards positifs ont été dilués en série au dixième afin de constituer des gammes de concentration décroissante d'ADN du parasite. L'utilisation d'une matrice d'ADN négative adaptée pour réaliser les dilutions est importante car cela influence l'efficacité, la sensibilité et la spécificité de la PCR.

### **d) Utilisation en routine**

Au vu des résultats de l'étude comparative, trois techniques ont été sélectionnées pour analyser les échantillons de routine. La technique utilisée en première intention cible les gènes codant pour la sous-unité 18S de la sous-unité de l'ARN ribosomal avec le couple d'amorces PL1473F18/PL1679R18 publié par Mangold *et al.* en 2005 (Mangold et al., 2005) et révélée en SYBRGreen. Le seuil de détection de la méthode utilisée en première intention est de 60 et 36 sporozoïtes par moustique pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement. La présence du plasmodium a été confirmée dans tous les échantillons positifs par une technique de seconde intention ciblant un gène différent : soit une PCR en simplex ciblant une séquence non-codante de l'ADN mitochondrial conservée au sein du genre *Plasmodium* avec les amorces de la qRT-PCR3 décrite par Bourgeois *et al.* en 2009 (Bourgeois et al., 2010) et révélée

en SYBRGreen, soit une PCR en simplex ciblant le gène COX-III de *P. falciparum* ou le gène COX-I de *P. vivax* avec les amorces publiées par Cunha *et al.* en 2009 (Cunha *et al.*, 2009) et révélée en SYBRGreen. Pour certains échantillons particulièrement douteux (*i.e.* réaction positive avec la technique de première intention mais négative avec les techniques de confirmation), le séquençage du produit de la PCR Mangold a été réalisé par une firme commerciale (Macrogen, Seoul). La positivité de l'échantillon et l'espèce plasmodiale ont ainsi été infirmées ou confirmées en analysant la séquence avec le programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990, Goujon *et al.*, 2010, McWilliam *et al.*, 2013a).

## **6. Suivi de la résistance à la deltaméthrine, à la perméthrine et au DDT**

### **a) Test phénotypique de sensibilité**

La sensibilité des anophèles à la deltaméthrine, à la perméthrine et au dichlorodiphényltétrachloroéthane (DDT) a été déterminée lors des enquêtes entomologiques réalisées en Août et Novembre 2014 et en Juillet 2015. Après chaque nuit de collection, les anophèles ont été identifiés vivants (afin de séparer les différentes espèces ou groupes d'espèces) puis mises en élevage. A la fin de chaque enquête, des tests cylindres standards ont été réalisés d'après le référentiel publié par l'O.M.S. (World Health Organization, 2016). Brièvement, les moustiques sont exposés pendant 1h à un papier imprégné de deltaméthrine (0,05%), de perméthrine (0,75%), de DDT (4%) ou d'huile de silicone (contrôle) puis gardés en observation pendant 24h. Le nombre de moustiques « *knocked-down* » (KD) est mesuré toutes les 5min pendant la période d'exposition afin de déterminer le temps nécessaire pour obtenir 50% de moustiques KD (TKD50) et la proportion de moustiques KD après 60 minutes d'exposition (KD%). Le taux de mortalité est déterminé à 24 heures après l'exposition à l'insecticide. Les tests ont été réalisés de manière indépendante pour chaque village, pour chaque enquête et pour chaque espèce d'anophèles.

### **b) Détection des mutations *kdr***

La technique utilisée pour la détection des mutations *kdr* a été adaptée d'après les travaux de Syafrudin *et al.* (Syafruddin *et al.*, 2010). Les amorces Ag-F *kdr* (5'-GACCATGATCTGCCAAGATGGAAT-3') et An-*kdr*-R2 (5'-GAGGATGAACCGAAATTG GAC-3') ont

été utilisées pour amplifier un fragment de 300 paires de bases flanquant la position 1014 du gène codant pour le canal sodium voltage-dépendant. Les analyses ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ L (47  $\mu$ L de mix et 3  $\mu$ L d'extrait d'ADN). Les conditions réactionnelles sont 1 unité de Tfi DNA polymérase (Invitrogen™, Carlsbad, Etats-Unis), 200  $\mu$ M de dNTPs mix (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), and 400  $\mu$ M de chaque amorce. Le protocole de thermocyclage utilisé pour la PCR consiste en une étape d'activation initiale de la polymérase à 94 °C pendant 5 min puis 30s à 45 °C, suivi de 29 cycles d'amplification (dénaturation à 94 °C pendant 30 s, hybridation à 50 °C pendant 30 s puis élongation à 72 °C pendant 1 min). Le produit de la réaction a été séquencé dans les deux sens par une compagnie privée (Macrogen©, Séoul, Corée). Chaque séquence a été vérifiée et nettoyée manuellement en utilisant le logiciel Bioedit version 7.1.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Une séquence consensus a été générée pour chaque spécimen en utilisant le programme CAPS3 puis alignée avec le programme Clustal Omega pour les alignements de séquences multiples (McWilliam et al., 2013b).

## **C. ANALYSE ET INTERPRETATION DES DONNEES**

### **1. Mise au point des techniques de PCR quantitative en temps réel pour la détection du parasite dans les échantillons entomologiques**

#### **a) Comparaison des performances aux faibles concentrations de parasite**

En PCR diagnostic (*i.e.* détection d'un agent pathogène chez un hôte infecté), les variations des performances s'observent surtout aux faibles concentrations de parasite (Sterkers et al., 2010). Aux faibles concentrations, la comparaison de différentes techniques est compliquée par la loi de Poisson. En effet, la distribution de la matrice d'ADN dans les tubes réactionnels ne suit plus une loi Normale mais une loi de Poisson. Par conséquent, la cible à amplifier n'est distribuée que dans une certaine proportion des tubes réactionnels et en quantité variable. La comparaison nécessite donc (i) de réaliser l'extraction d'ADN avant les dilutions en série et (ii) de répéter le nombre de réactions (Sterkers et al., 2010). Pour chaque gamme de dilution, un total de 12 réactions a été réalisé pour chaque concentration de parasite et pour chaque couple d'amorces. Un score est utilisé pour augmenter la puissance de l'analyse (Sterkers et al., 2010). Le score est défini comme le nombre de réactions positives

divisé par le nombre total de réactions effectuées aux faibles concentrations (*i.e.* concentrations pour lesquelles au moins un couple d'amorces n'obtient pas 12/12 réactions positives). Ce score, qui reflète la proportion de réactions positives aux faibles concentrations, a été calculé pour chaque gamme de dilution et pour chaque couple d'amorces. Les valeurs du score ont été comparées en utilisant un test du  $\chi^2$  ajusté avec la correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples et avec la correction de Yate lorsque les effectifs observés étaient inférieurs à 5.

## **b) Quantification absolue de la charge en sporozoïtes**

Les gammes de dilution obtenues à partir des suspensions calibrées de sporozoïtes ont été analysées en triplicat afin d'obtenir un total de 9 réactions par dilution. Pour chaque réaction positive, la valeur du « crossing-point » (CP) a été déterminée en utilisant l'algorithme de régression du logiciel CFX Biorad Manager version 3.01® (Biorad). L'ensemble des résultats a été importé dans une feuille de calcul Excel® (Microsoft). Les valeurs moyennes du CP ont été représentées en fonction du logarithme de la concentration de parasite. L'ordonnée à l'origine et la pente de la droite d'étalonnage ont été estimées par la méthode des moindres carrés sur la portion linéaire de la droite de régression ( $r > 0.990$ ). L'efficacité de la PCR a été calculée en utilisant la formule  $EFF = 10^{(-1/pente)} - 1$ . La reproductibilité et la répétabilité de l'analyse ont été mesurées en calculant l'écart-type inter-série et intra-série respectivement. La limite de détection a été définie comme la plus forte dilution pour laquelle  $\geq 50\%$  des réactions sont positives. La concentration de parasite a été exprimée en nombre d'équivalents génomiques de parasite par tube réactionnel. En considérant le protocole utilisé pour l'extraction, un équivalent génomique par tube réactionnel équivaut à 40 sporozoïtes par moustique.

## **2. Résistance aux insecticides**

Les taux de mortalité sont interprétés d'après les critères définis par l'O.M.S. (World Health Organization, 2016). La mortalité observée dans la population d'anophèles exposée à l'insecticide est corrigée par la formule de Abott lorsque la mortalité dans le tube contrôle est  $> 5\%$  (Abbott, 1987). Lorsque la mortalité du contrôle est  $> 20\%$ , le test est exclu de l'analyse. La population testée est dite sensible lorsque la mortalité est comprise entre 98-100% et

résistante lorsque la mortalité est <90%. Lorsque la mortalité est intermédiaire (90-97%), la résistance est dite « suspectée » et doit être confirmée par la mise en évidence de marqueurs moléculaires dans la population étudiée. A noter que l'interprétation formelle de ces résultats nécessite de phénotyper au moins 100 moustiques pour chaque test, ce qui n'est pas toujours possible en pratique. Par ailleurs, il n'existe pas encore de marqueurs moléculaires fiables de la résistance aux insecticides pour les anophèles collectés dans la zone d'étude. Le temps de KD50 a été déterminé par la méthode de régression log-probit décrite par Finney *et al.* (Finney, 1971) en utilisant le programme R version 3.3.2 (R Core Team, 2016). Le code utilisé pour déterminer le TKD50 et son intervalle de confiance a été adapté d'après les travaux de Johnson *et al.* (Johnson et al., 2013).

### 3. Définition et calcul des indicateurs entomologiques

Les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme mesurés dans cette étude sont le taux de piqûre humain (TPH), le taux de piqûre animal (TPA), l'index sporozoïtique (IS) et le taux d'inoculation entomologique (TIE). Les indicateurs entomologiques du comportement trophique sont l'index d'exophagie (IE) et l'index de zoophagie (IZ). Les formules utilisées pour le calcul de ces indicateurs sont résumées ci-dessous.

$$(1) TPH = \frac{\text{nb. de moustiques collectés}}{\text{nb. de personnes. nuit}}$$

$$(2) TPA = \frac{\text{nb. de moustiques collectés}}{\text{nb. d'animaux. nuit de collection}}$$

$$(3) IS = \frac{\text{nb. de moustiques positifs}}{\text{nb. de moustiques testés}}$$

$$(4) TIE = \frac{\text{nb. de moustiques positifs}}{\text{nb. de personnes. nuit} * (\text{nb. de moustiques testés} / \text{nb. de moustiques collectés})}$$

$$(5) IE = \frac{TPH \text{ à l'extérieur}}{TPH \text{ à l'intérieur} + TPH \text{ à l'extérieur}}$$

$$(6) IZ = \frac{TPA}{TPH + TPA}$$

Le TPH et le TPA sont calculés en faisant le ratio du nombre de spécimens collectés pendant un nombre défini d'hôtes.nuit de collection. Le TPH et le TPA sont un nombre de piqûres par hôte et par unité de temps (en général exprimé en nombre de piqûres/personne/mois ou de piqûres/vache/mois). C'est une mesure directe du contact hôte-vecteur dans un site donné. L'IS est la proportion d'anophèles infectants (*i.e.* qui ont des sporozoïtes de plasmodium dans leurs glandes salivaires et qui peuvent transmettre le paludisme lors d'un repas sanguin). Il est calculé en faisant le ratio du nombre de moustiques positifs en PCR sur le nombre total d'anophèles testés, il est généralement exprimé en nombre d'anophèles infectés pour mille anophèles testés. Le TIE est un nombre de piqûres infectantes reçues par personne et par unité de temps. Il est calculé en faisant le ratio du nombre d'anophèles infectants sur le nombre d'hommes.nuit de collection. Le nombre d'hommes.nuit de collection utilisé pour le calcul du TIE est ajusté en fonction de la proportion de spécimens collectés qui ont été testés en PCR. Par exemple, si 1000 anophèles sont collectés pendant 10 personnes.nuit de collection et que 1 spécimen est positif en PCR parmi 950 anophèles testés, le TPH est  $1000/10=100$  piqûres/personne/nuit, l'IS est  $1/950=1.05\%$  et le TIE est  $1/(10*950/1000)=0.10$  piqûre infectante/personne/nuit. L'IE est calculé en faisant le ratio du TPH mesuré à l'extérieur des habitations sur le TPH total (THP extérieur + TPH intérieur). L'IZ est calculé en faisant le ratio du TPA sur la somme du TPH et du TPA. Lorsque l'IE <0.4 ou >0.6, la population d'anophèles étudiée est qualifiée de principalement endophagique ou principalement exophagique respectivement. Lorsque le ZI <0.4 ou >0.6, la population d'anophèles étudiée est qualifiée de principalement anthropophagique ou principalement zoophagique respectivement. Lorsque l'IE ou le ZI sont compris entre 0.4 et 0.6, la population d'anophèles étudiée est qualifiée d'opportuniste. Les intervalles de confiance poissonniens à 95% ont été calculés pour les comptes de moustiques (TPH, TPA et TIE) en utilisant la méthode « exacte » du paquet *epitools* version 0.5-9 du logiciel R version 3.3.2. Les intervalles de confiance 95% binomiaux des proportions (IS, IE et IZ) ont été calculés avec la méthode « exacte » du paquet *binom* version 1.1-1.

## 4. Modélisation des indicateurs entomologiques

### a) Paramètres des modèles d'équations d'estimation généralisée

Les indicateurs entomologiques sont des données hiérarchisées (village, site, intérieur/extérieur) et longitudinales. Par ailleurs, les données présentent un excès de zéro et sont sur-dispersées. Nous avons choisi une approche de type équations d'estimation généralisée (EEG) afin d'estimer les paramètres marginaux de la régression linéaire mixte généralisée. Les analyses ont été réalisées avec le paquet *geeM* version 0.10.0 (McDaniel et al., 2013) du logiciel R version 3.3.2 (R Core Team, 2016). Le modèle a été paramétré de la manière suivante : fonction de liaison logarithmique, loi de probabilité binomiale négative, structure « échangeable » de la matrice de corrélation et une estimation « robuste » de la variance. Le paramètre  $\theta$  de la fonction de distribution binomiale négative a été estimé en utilisant la fonction *glm.nb* du paquet *MASS* version 7.3-47.

Afin de mieux comprendre les facteurs qui déterminent l'intensité de la transmission et afin d'expliquer l'impact de l'intervention, nous avons modélisé le TIE en fonction des variables environnementales (village et saison), des indicateurs clinico-épidémiologiques (prévalence et incidence) et de l'intervention (période et taux de couverture). Les mesures du TIE ont été agrégées à l'échelle du site de collection et de l'enquête entomologique. Seuls les spécimens des complexes *Minimus* et *Dirus* et du groupe *Maculatus* (les vecteurs primaires dans la zone) ont été inclus dans l'analyse. La prévalence, l'incidence et le taux de couverture ont été calculés dans un rayon de 100m autour de chaque site de collection. La prévalence a été déterminée tous les trois mois, l'incidence a été mesurée en continu au poste palu et le taux de couverture a été enregistré pendant chaque répétition du TdM. L'offset utilisé pour le TIE est le logarithme du nombre d'hommes.nuit de collection corrigé par un facteur égal à la proportion de moustiques collectés testés en PCR. Une analyse univariée a été réalisée en première intention afin de décrire l'association entre le TIE et chaque covariable d'intérêt. L'analyse multivariée a ensuite été réalisée en ne conservant que les variables significativement associées au TIE.

## **b) Les covariables**

### **(1) Saison**

Trois catégories ont été définies pour la variable saison : *saison des pluies* (mi-mai à mi-octobre), *saison froide* (mi-octobre à mi-février) et *saison chaude* (mi-février à mi-mai). Cette définition s'appuie sur les informations fournies par le département de météorologie thaïlandais (<https://www.tmd.go.th/en/>).

### **(2) Le taux de piqûre humain**

Le TPH est défini comme le nombre de moustiques capturés relatif à un nombre de personnes.nuit de collection. Lors des analyses univariées, le TPH a été introduit comme une variable catégorielle afin de vérifier la linéarité de la relation entre le TPH et le TIE. Ce découpage a permis de mettre en évidence un effet seuil à partir duquel le TPH est significativement associé à une augmentation du TIE. Les classes ayant un effet similaire sur la variable à expliquer ont été regroupées lors des analyses multivariées.

### **(3) La prévalence**

La prévalence de l'infection est définie comme le nombre de participants positifs en PCR divisé par le nombre de participants testés. La technique de détection utilisée en première intention ne permet pas d'identifier l'espèce plasmodiale. Celle-ci est déterminée dans un second temps par une technique moins sensible. Du fait des faibles charges parasitaires rencontrées chez les porteurs asymptomatiques et de la différence de sensibilité des deux techniques, il n'a pas été possible de déterminer l'espèce plasmodiale dans 16% des échantillons positifs. Pour ces échantillons, l'espèce a été imputée d'après le ratio Pf/Pv observé parmi les cas cliniques dans les trois mois précédents l'enquête de prévalence. En effet, la répartition des cas chez les porteurs asymptomatiques est très similaire à celle des cas cliniques (Imwong et al., 2015a). Nous avons attribué à chaque enquête entomologique la valeur de prévalence correspondant à l'enquête de prévalence la plus proche. L'enquête de prévalence qui reflète l'impact du traitement de masse sur la prévalence du portage sous-microscopique est l'enquête réalisée à M3 (KNH et TOT) et à M12 (HKT et TPN). Les enquêtes entomologiques potentiellement impactées par l'intervention (réalisées >15 jours après le

début et <45 jours après la fin du traitement de masse) ont *de facto* été associées à la prévalence déterminée à M3 (KNH et TOT) ou à M12 (HKT et TPN). Les seuils ont été fixés en prenant en compte la durée du cycle sporogonique de plasmodium chez le vecteur anophélien (15 jours) et la durée de l'EPPT de la pipéraquline (30 jours). Lors des analyses univariées, la prévalence a été introduite comme une variable catégorielle afin de vérifier la linéarité de la relation entre la prévalence et le TIE. Ce découpage a permis de mettre en évidence un effet seuil à partir duquel la prévalence est significativement associée à une augmentation du TIE. Les classes ayant un effet similaire ont été regroupées lors des analyses multivariées.

#### **(4) L'incidence**

L'incidence est définie comme le nombre de cas symptomatiques enregistrés au poste palu divisé par un nombre de personnes.temps donné (documenté par le suivi démographique). La période considérée pour le calcul de l'incidence est le mois précédant chaque enquête entomologique en tenant compte de la durée du cycle sporogonique du parasite chez le moustique (15 jours), soit J-45 à J-15 avant le début et la fin de l'enquête entomologique respectivement. Lors des analyses univariées, le taux d'incidence a été introduit comme une variable catégorielle afin de vérifier la linéarité de la relation entre l'incidence et le TIE.

#### **(5) La période**

L'intervention est introduite en définissant la variable période. Trois catégories de période ont été définies : *avant*, *pendant* et *après* le TdM. Les enquêtes réalisées avant et jusqu'à 15 jours après le début du TdM ont été attribuées à la catégorie *avant*. Les enquêtes réalisées >15 jours après le début du TdM et jusqu'à 45 jours après la fin du TdM ont été attribuées à la période *pendant*. Enfin les enquêtes réalisées >45 jours après la fin de du TdM ont été attribuées à la période *après*. Les seuils ont été définis en tenant compte de la durée du cycle sporogonique de plasmodium chez le vecteur anophélien (15 jours) et de la durée de l'EPPT de la pipéraquline (30 jours).

## **(6) Le taux de couverture du traitement de masse**

Un taux de couverture a été attribué à chaque enquête entomologique en tenant compte de la durée du cycle sporogonique de plasmodium chez le vecteur anophélien (15 jours) et de la durée de l'EPPT de la pipéraquline (30 jours). La couverture augmente progressivement entre le début et la fin de l'intervention (à M0, M1, M2 pour les villages A1-KNH et A2-TOT et à M9, M10 et M11 pour les villages B1-HKT et B2-TPN) puis elle est fixée à une valeur nulle une fois que l'EPPT de la pipéraquline s'estompe. Chaque participant peut recevoir le traitement 1, 2 ou 3 fois à un mois d'intervalle. Afin de mieux quantifier l'effet de l'EPPT de la pipéraquline sur l'impact de l'intervention, deux types de couverture ont été distingués : la couverture optimale (*i.e.* nombre de participants ayant reçu trois fois le traitement dihydroartémisinine-pipéraquline + primaquine à un mois d'intervalle / nombre de résidents) et la couverture sous-optimale (nombre de personnes ayant reçu au moins 1 fois le traitement complet dihydroartémisinine-pipéraquline + primaquine / nombre de résidents). La couverture sous-optimale reflète la proportion des personnes qui ont été guéries de l'infection palustre, la couverture optimale permet de mesurer l'effet additionnel de l'EPPT de la pipéraquline. Lors des analyses univariées, le taux de couverture a été introduit comme une variable catégorielle afin de vérifier la linéarité de la relation entre le taux de couverture et le TIE.

### III. CHAPITRE1. OPTIMISATION DES TECHNIQUES UTILISEES POUR LA DETECTION DE PLASMODIUM DANS LES ECHANTILLONS ENTOMOLOGIQUES

---

#### A. OPTIMISATION DES CONDITIONS REACTIONNELLES

Les conditions de la réaction (principalement la concentration des amorces et de  $MgCl_2$  ainsi que la température d'hybridation) ont un effet important sur la sensibilité et la spécificité de la PCR. L'optimisation de la PCR consiste à déterminer les conditions optimales en prenant en compte l'ensemble des interactions croisées entre les différents paramètres à tester. En pratique, cela revient à faire une analyse des valeurs du CP obtenues sur un échantillon positif de référence en faisant varier graduellement et simultanément tous les paramètres. Les conditions pour lesquelles la valeur du CP est la plus faible sont celles pour lesquelles l'efficacité de la réaction est maximale. Les conditions optimales de la réaction et l'efficacité correspondante (déterminée sur des gammes de sporozoïtes de *P. falciparum* et *P. vivax*) ont été mesurées pour chaque technique et sont présentées dans le **Tableau 6**. Les courbes d'amplification et de fusion obtenues avec chaque technique sont présentées dans la **Figure XI**. Dans les conditions optimales, l'efficacité de la réaction est >80% pour toutes les techniques. Trois techniques permettent de discriminer *P. falciparum* et *P. vivax*. A noter qu'une importante quantité de dimères d'amorces est co-amplifiée lors de la réaction de PCR avec la technique V. Celle-ci gêne la mesure de l'efficacité de la réaction et explique probablement la plus faible sensibilité obtenue avec cette méthode dans la suite des analyses.

**Tableau 6.** Conditions réactionnelles optimales de la PCR déterminées par une analyse en mode gradient.

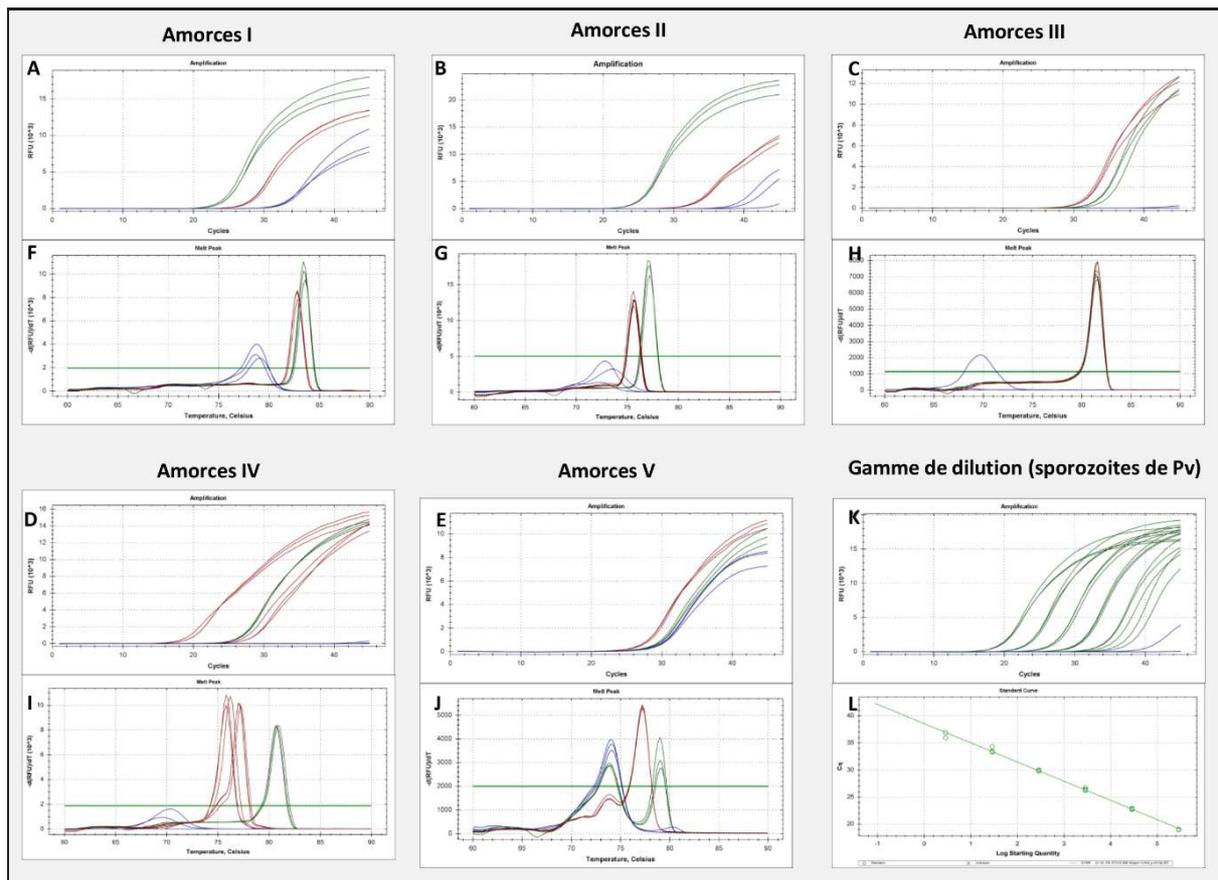
Technique	Température d'hybridation (°C)	Concentration de MgCl <sub>2</sub> (mM)	Concentration d'amorces(nM)	%EFF <sup>a</sup> (Pf)	%EFF <sup>a</sup> (Pv)
I	58	2.5	250 chaque	ND <sup>b</sup>	110
II	60	2.5	300 chaque	84	92
III	58	2.5	500 chaque	96	110
IV	54	2.5	250 chaque	97	101
V	60	2.5	400 chaque	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>

**ND**, non déterminé; **Pf**, *Plasmodium falciparum*; **Pv**, *Plasmodium vivax*; **EFF**, efficacité de la PCR.

<sup>a</sup> %**EFF**: efficacité (EFF) de la PCR calculée avec la formule  $EFF = 10^{(-1/pente)} - 1$  et exprimée en pourcentage. Une efficacité de 100% correspond à une pente de -3.32 et signifie que le nombre d'amplicons double après chaque cycle d'amplification. L'EFF a été calculée à partir des gammes de dilution de suspensions calibrées de sporozoïtes de *P. falciparum* et de *P. vivax*.

<sup>b</sup> du fait du manque d'échantillon, il n'a pas été possible de calculer l'EFF pour la technique I sur la gamme de *P. falciparum*.

<sup>c</sup> du fait de la présence de dimères d'amorces, il n'a pas été possible de calculer l'EFF pour la technique V.



**Figure XI. Courbes d'amplification et de fusion obtenues avec cinq techniques différentes de PCR quantitative en temps réel pour la détection de plasmodium.**  
**Panneaux A-J :** courbes d'amplification et de fusion obtenues sur des extraits d'ADN standard de sporozoïtes de *P. falciparum* (rouge) et de *P. vivax* (vert). **Panneaux K-L :** résultats obtenus sur une gamme de dilution du parasite et droite d'étalonnage correspondante.

## B. COMPARAISON DES PERFORMANCES AUX FAIBLES CONCENTRATIONS

La plupart des techniques moléculaires utilisées pour la détection de plasmodium dans des échantillons entomologiques ont été adaptées d'après les techniques mises au point pour la détection du parasite dans le sang humain. Cependant, les performances relatives ne sont pas nécessairement conservées lorsqu'il s'agit de détecter les stades sanguins du parasite et les formes intra-vectorielles (oocystes et/ou sporozoïtes). Nous avons réalisé des gammes de dilution d'ADN extrait à partir de trois types de prélèvements : (i) sang de patients infectés (stades sanguins), (ii) abdomen de moustiques infectés (oocystes) et (iii) tête-thorax abdomen de moustiques infectés (oocystes). L'analyse a été répétée 12 fois pour chaque concentration.

Un score a ainsi pu être calculé afin de comparer les différentes techniques. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7**. Comme attendu, la proportion de réactions positives était de 100% (12/12) pour tous les couples d'amorces aux concentrations les plus élevées. Aux faibles concentrations, une différence significative a été observée dans les valeurs du score. Concernant *P. falciparum*, les meilleurs scores ont été obtenus avec les techniques I, II et IV sur les gammes de sporozoïtes, d'oocystes et de stades sanguins respectivement. Pour *P. vivax*, les techniques I et II ont obtenu un score similaire et supérieur à celui des autres techniques sur les trois types d'échantillons. Le score obtenu avec la technique V était inférieur à celui des autres techniques pour toutes les gammes testées.

**Tableau 7.** Résultats de la comparaison des performances de différentes amorces aux faibles concentrations de parasite en fonction du type de prélèvement.

Echantillon de référence	Espèces	Technique	Valeur du paramètre à la dilution indiquée																				Score	
			ND		10-1		10-2		10-3		10-4		10-5		10-6		10-7		10-8		10-9			
			nb <sup>a</sup>	% <sup>a</sup>	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%								
Tête-thorax (sporozoïtes)	Pf	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	10/12	83	2/12	17	-	-	-	-	-	-	36/48	75
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	9/12	75	3/12	25	-	-	-	-	-	-	36/48	75
		III	12/12	100	12/12	100	11/12	92	11/12	92	8/12	67	3/12	25	0/12	0	-	-	-	-	-	-	22/48	46
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	4/12	33	1/12	8	-	-	-	-	-	-	25/48	52
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	-	-	12/48	25
	Pv	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	4/12	33	0/12	0	-	-	-	-	23/36	64
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	5/12	42	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	18/36	50
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	1/12	8	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	10/36	28
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	3/12	25	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	11/36	31
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	0/36	0
Abdomen (oocystes)	Pf	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	5/12	42	1/12	8	-	-	-	-	-	-	25/48	52
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	4/12	33	1/12	8	-	-	-	-	-	-	24/48	50
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	9/12	75	3/12	25	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	-	-	13/48	27
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	4/12	33	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	-	-	13/48	27
		V	12/12	100	12/12	100	10/12	83	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	-	-	0/48	0
	Pv	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	9/12	75	4/12	33	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	26/60	43
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	6/12	50	3/12	25	2/12	17	-	-	-	-	35/60	58
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	4/12	33	1/12	8	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	12/60	20
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	6/12	50	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	17/60	28
		V	12/12	100	11/12	92	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	0/60	0
Sang (stades sanguins)	Pf	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	10/12	83	3/12	25	0/12	0	-	-	-	-	25/48	52
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	2/12	17	1/12	8	-	-	-	-	26/48	54
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	6/12	50	3/12	25	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	9/48	19
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	2/12	17	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	11/48	23
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	10/12	83	1/12	8	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	1/48	2
	Pv	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	3/12	25	1/12	8	0/12	0	12/36	33
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	3/12	25	3/12	25	0/12	0	17/36	47
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	1/12	8	0/12	0	0/12	0	12/36	33
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	5/12	42	3/12	25	0/12	0	19/36	53
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/36	0

ND, non-dilué; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pv, *Plasmodium vivax*.

<sup>a</sup> nombre (nb) ou pourcentage (%) de réactions positives sur le nombre total de réactions effectuées.

<sup>b</sup> score ou proportions de réactions positives aux faibles concentrations de parasite (les cellules en gras indiquent les données utilisées pour calculer le score), la définition du score a été donnée dans la section Matériel et Méthodes; par exemple : la valeur maximum du score pour la gamme de dilution des sporozoïtes de *Plasmodium vivax* est 48 (12 à la dilution D, +12 à la dilution E, +12 à la dilution F et +12 à la dilution G), le score obtenu avec la technique I est 75% (36/48=(12+12+10+2)/48).

## C. VERIFICATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES

Les infections expérimentales d'anophèles ont également permis de produire des suspensions calibrées de sporozoïtes de *P. falciparum* et *P. vivax*. Trois suspensions de sporozoïtes de *P. vivax* et une suspension de sporozoïtes de *P. falciparum* ont ainsi été produites, contenant respectivement un total de 288000, 330750, 460600 et 360000 sporozoïtes. Les résultats des gammes de dilution obtenues à partir de ces échantillons calibrés sont résumés dans les **Tableaux 8 et 9**. L'efficacité de la réaction est >80% pour toutes les techniques ce qui confirme que les conditions réactionnelles sont optimales. Le domaine de linéarité varie de  $10^4$  à  $10^5$  en fonction de la technique. Par exemple, la technique IV, utilisée en première intention dans les analyses de routine, permet de quantifier des charges parasitaires allant de 6 à 60,000 et de 36 à 360000 sporozoïtes par moustique infecté pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement. Pour *P. falciparum*, la limite de détection varie entre 0.15 et 15 équivalents génomiques par prise d'essai soit 6 à 600 sporozoïtes par moustique en fonction de la technique. Pour *P. vivax*, elle varie entre 0.1 et 9 équivalents génomiques par prise d'essai, soit 3.6 à 360 sporozoïtes par moustique.

**Tableau 8. Résultats des gammes de dilution réalisées à partir de suspensions calibrées de sporozoïtes de *P. vivax*.**

Technique (%EFF and r <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Paramètre	Valeur à la concentration indiquée (en équivalents génomiques de <i>Plasmodium vivax</i> )							
		9,000	900	90	9	0.9	0.1	0.01	0.001
I (110% , 0.997)	Nb positifs (%) <sup>b</sup>	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	5/9 (56%)	0/9	0/9
	CP moyen	17.90	21.18	24.45	27.70	30.18	31.90	-	-
	Ecart-type intra-série <sup>c</sup>	0.10	0.16	0.17	0.16	0.42	0.23	-	-
	Ecart-type inter-série <sup>d</sup>	0.85	0.71	0.82	0.80	0.22	0.22	-	-
II (92% , 0.999)	Nb positifs (%)	9/9(100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	7/9 (78%)	1/9 (11%)	0/9
	CP moyen	19.66	23.40	27.04	30.37	34.23	37.18	-	-
	Ecart-type intra-série	0.10	0.10	0.16	0.18	0.75	1.36	-	-
	Ecart-type inter-série	1.08	0.83	0.92	0.84	0.97	1.91	-	-
III (110% , 0.991)	Nb positifs (%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	8/9 (89%)	3/9 (33%)	0/9	0/9
	CP moyen	24.94	28.10	30.53	33.55	37.78	37.56	-	-
	Ecart-type intra-série	0.39	0.99	0.35	0.62	2.19	0.35	-	-
	Ecart-type inter-série	1.31	1.88	0.95	0.66	0.99	0.56	-	-
IV (101%, 0.999)	Nb positifs (%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	7/9 (78%)	2/9 (22%)	1/9 (11%)	0/9
	CP moyen	21.05	24.68	28.02	31.20	34.24	35.86	35.83	-
	Ecart-type intra-série	0.15	0.09	0.26	0.27	0.21	-	-	-
	Ecart-type inter-série	0.94	1.02	0.78	0.52	0.55	1.52	-	-
V *	Nb positifs (%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	1/9 (11%)	0/9	0/9	0/9
	CP moyen	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ecart-type intra-série	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ecart-type inter-série	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> %EFF : efficacité (EFF) de la PCR calculée avec la formule  $EFF = 10^{(-1/pente)} - 1$  et exprimée en pourcentage. Une efficacité de 100% correspond à une pente de -3.32 et signifie que le nombre d'amplicons double après chaque cycle d'amplification. r<sup>2</sup>: coefficient de corrélation de Pearson ; la portion de la droite pour laquelle r<sup>2</sup>>0.990 correspond au domaine de linéarité de la méthode (en gras).

<sup>b</sup> **Nb. positifs (%)** : nombre de réactions positives sur le nombre total de réactions effectuées et pourcentage correspondant.

\* la co-amplification de dimères d'amorces invalide la valeur du CP et ne permet pas de déterminer les paramètres de la droite d'étalonnage.

**Tableau 9. Résultats des gammes de dilution réalisées à partir de suspensions calibrées de sporozoïtes de *P. falciparum*.**

Technique (%EFF and r <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Paramètre	Valeur à la concentration indiquée (en équivalents génomiques de <i>Plasmodium falciparum</i> )						
		1500	150	15	1.5	0.15	0.015	0.002
I (110% , 0.997)	Nb positifs (%) <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	CP moyen	-	-	-	-	-	-	-
	Ecart-type intra-série <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	Ecart-type inter-série <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-
II (92% , 0.999)	Nb positifs (%)	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>8/9 (89%)</b>	<b>2/9 (22%)</b>	0/9 (0%)
	CP moyen	<b>22.59</b>	<b>26.21</b>	<b>30.01</b>	<b>33.43</b>	<b>37.95</b>	<b>38.99</b>	-
	Ecart-type intra-série	<b>0.07</b>	<b>0.25</b>	<b>0.13</b>	<b>0.29</b>	<b>0.99</b>	-	-
	Ecart-type inter-série	<b>0.12</b>	<b>0.19</b>	<b>0.08</b>	<b>0.27</b>	<b>1.10</b>	<b>0.40</b>	-
III (110% , 0.991)	Nb positifs (%)	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>4/9 (44%)</b>	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	CP moyen	<b>25.69</b>	<b>28.67</b>	<b>32.02</b>	<b>35.98</b>	<b>37.08</b>	-	-
	Ecart-type intra-série	<b>0.24</b>	<b>0.08</b>	<b>0.42</b>	<b>1.05</b>	<b>0.61</b>	-	-
	Ecart-type inter-série	<b>0.06</b>	<b>0.17</b>	<b>0.14</b>	<b>0.38</b>	<b>1.23</b>	-	-
IV (101%, 0.999)	Nb positifs (%)	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>3/9 (33%)</b>	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	CP moyen	<b>22.60</b>	<b>25.94</b>	<b>29.35</b>	<b>33.70</b>	<b>35.73</b>	-	-
	Ecart-type intra-série	<b>0.12</b>	<b>0.06</b>	<b>0.36</b>	<b>1.10</b>	<b>1.24</b>	-	-
	Ecart-type inter-série	<b>0.09</b>	<b>0.14</b>	<b>0.11</b>	<b>0.34</b>	<b>1.22</b>	-	-
V *	Nb positifs (%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	CP moyen	-	-	-	-	-	-	-
	Ecart-type intra-série	-	-	-	-	-	-	-
	Ecart-type inter-série	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> %EFF : efficacité (EFF) de la PCR calculée avec la formule  $EFF = 10^{(-1/pente)} - 1$  et exprimée en pourcentage. Une efficacité de 100% correspond à une pente de -3.32 et signifie que le nombre d'amplicons double après chaque cycle d'amplification. r<sup>2</sup>: coefficient de corrélation de Pearson ; la portion de la droite pour laquelle r<sup>2</sup>>0.990 correspond au domaine de linéarité de la méthode (en gras).

<sup>b</sup> **Nb. positifs (%)** : nombre de réactions positives sur le nombre total de réactions effectuées et pourcentage correspondant.

\* du fait du manque d'échantillon, il n'a pas été possible de passer la gamme avec le couple d'amorce I.

\*\* la co-amplification de dimères d'amorces invalide la valeur du CP et ne permet pas de déterminer les paramètres de la droite d'étalonnage.

## IV. CHAPITRE 2. *BIOLOGIE ET ECOLOGIE DES ANOPHELES*

---

### A. BIODIVERSITE ET ABONDANCE DE L'ENTOMO-FAUNE ANOPHELIENNE

#### 1. Identification morphologique

L'abondance et la diversité des anophèles collectés en fonction de la méthode de capture sont présentées dans les **Tableaux 10 et 11**. L'identification morphologique a permis de distinguer 12 taxons (deux espèces *sensu stricto* et dix groupes ou complexes d'espèces). Les espèces le plus fréquemment collectées sur sujet humain sont *An. minimus (s.l.)* (66%), *An. maculatus (s.l.)* (11%) et *An. barbirostris (s.l.)* (10%). *Anopheles dirus (s.l.)* ne représente que 2% des anophèles collectés sur sujet humain. Les vecteurs primaires (*An. minimus (s.l.)*, *An. maculatus (s.l.)* et *An. dirus (s.l.)*) représentent 80% des spécimens collectés sur sujet humain. Lorsque les vecteurs secondaires sont pris en compte (*An. barbirostris (s.l.)*, *An. annularis (s.l.)* et *An. subpictus (s.l.)*), ce chiffre atteint 91 %. Sur appât animal, la répartition des espèces est différente. A noter que certains vecteurs sont fréquemment collectés sur appât animal : *An. minimus (s.l.)* (18%), *An. barbirostris (s.l.)* (15%), *An. maculatus (s.l.)* (8%).

**Tableau 10. Résultat des identifications morphologiques pour les captures sur sujet humain.**

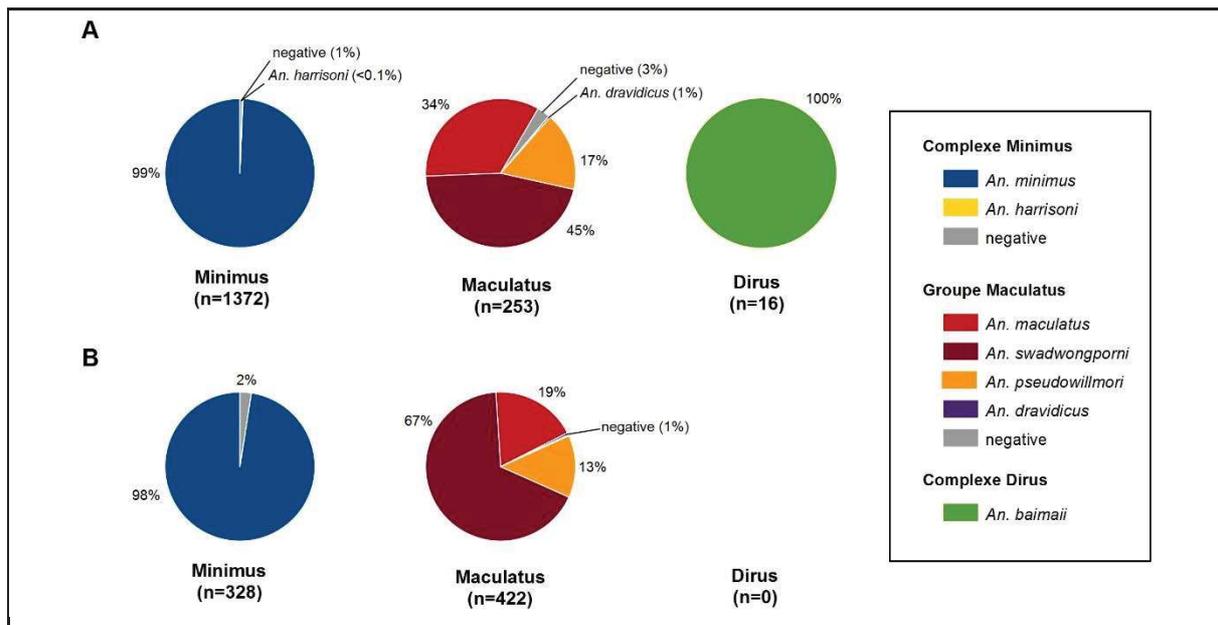
<b>Taxon</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
<i>An. minimus</i> (s.l.)	41795 (66,12)	66.12
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	7230 (11,44)	11.44
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	6107 (9,66)	19.66
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	2308 (3,65)	3.65
<i>An. tessellatus</i> (s.l.)	1439 (2,28)	2.28
<i>An. dirus</i> (s.l.)	1142 (1,81)	1.81
<i>An. annularis</i> (s.l.)	758 (1,20)	1.20
<i>An. aconitus</i> (s.l.)	298 (0,47)	0.47
<i>An. kochi</i> (s.s.)	293 (0,46)	0.46
<i>An. culicifacies</i> (s.l.)	235 (0,37)	0.37
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	234 (0,37)	0.37
<i>An. subpictus</i> (s.l.)	144 (0,23)	0.23
Non déterminé	1223 (1,93)	1.93
<b>Total</b>	<b>63206 (100)</b>	<b>100</b>

**Tableau 11. Résultat des identifications morphologiques pour les captures effectuées sur appât animal.**

<b>Taxon</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	15767	23,89
<i>An. minimus</i> (s.l.)	12177	18,45
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	9711	14,71
<i>An. subpictus</i> (s.l.)	7802	11,82
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	5307	8,04
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	3492	5,29
<i>An. culicifacies</i> (s.l.)	3387	5,13
<i>An. annularis</i> (s.l.)	1863	2,82
<i>An. kochi</i> (s.l.)	774	1,17
<i>An. tessellatus</i> (s.l.)	709	1,07
<i>An. aconitus</i> (s.l.)	169	0,25
<i>An. dirus</i> (s.l.)	53	0,08
Indéterminé	4800	7,27
<b>Total</b>	<b>66011</b>	<b>100</b>

## 2. Diversité spécifique au sein des complexes *Minimus* et *Dirus* et du groupe *Maculatus*

De par l'ampleur des collections, il n'a pas été possible d'être exhaustif dans la description des espèces au sein de chacun des taxons. L'analyse s'est donc portée en première intention sur les complexes *Minimus* et *Dirus* et sur le groupe *Maculatus*. L'identification moléculaire des espèces jumelles a été réalisée pour les spécimens collectés pendant la première enquête entomologique (saison des pluies 2013). Ces analyses ont été publiées par Kwansomboon *et al.* (Kwansomboon *et al.*, 2017). Au total, 1700 *An. minimus* (*s.l.*), 675 *An. maculatus* (*s.l.*) et 16 *An. dirus* (*s.l.*) ont été genotypés (**Figure XII**). Nous rapportons la présence de deux espèces au sein du complexe *Minimus* (*An. minimus* (*s.s.*) et *An. harrisoni*), quatre au sein du groupe *Maculatus* (*An. maculatus* (*s.s.*), *An. sawadwongporni*, *An. pseudowillmori* et *An. dravidicus*) et une parmi le complexe *Dirus* (*An. baimaii*). *Anopheles minimus* (*s.s.*) représente >99% des spécimens du complexe. La diversité spécifique au sein du groupe *Maculatus* est la plus importante. Les espèces les plus fréquentes sont *An. sawadwongporni* (45%), *An. maculatus* (*s.s.*) (34%) et *An. pseudowillmori* (17%). *Anopheles dravidicus* est rarement collecté (<1% du total). La répartition des espèces est différente sur sujet humain et animal (*p*-value < 0.00001, test d'homogénéité du  $\chi^2$ ) : *An. maculatus* (*s.s.*) est plus fréquemment collecté sur sujet humain que sur appât animal (34 vs 19% respectivement) contrairement à *An. sawadwongporni* qui est plus fréquent sur appât animal que sur sujet humain (67 vs 45% respectivement). *Anopheles baimaii* est la seule espèce qui a été détectée mais la taille de l'échantillon est faible (n=16).

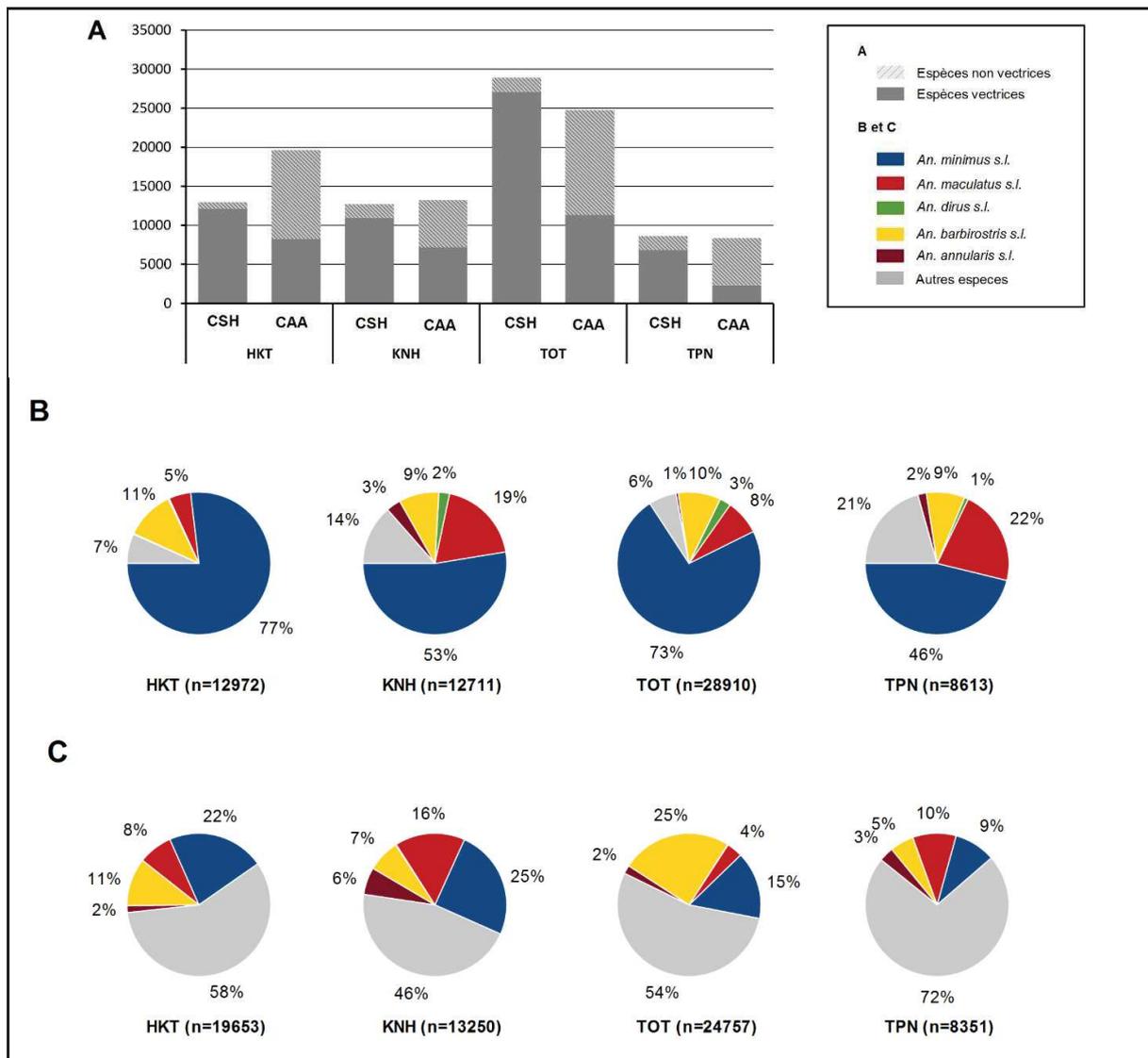


**Figure XII. Diversité spécifique au sein du groupe Maculatus et des complexes Minimus et Dirus lors de l'enquête de pré-intervention.**

Résultats des PCR d'espèces jumelles obtenus pendant la première enquête entomologique (saison des pluies 2013) sur les spécimens collectés par **(A)** capture sur sujet humain et **(B)** par capture sur appât animal.

### 3. Variations qualitatives et quantitatives

Le nombre total d'anophèles varie entre 16964 à TPN et 53667 à TOT. La proportion de vecteurs parmi les anophèles collectés sur sujet humain est supérieure à 80% dans tous les villages, mais la proportion relative des différentes espèces varie (de 46% à 76% pour *An. minimus s.l.* et de 5% à 22% pour *An. maculatus s.l.*) (**Figure XIII**). L'abondance des anophèles est multimodale, avec des pics observés pendant les mois d'Avril, Juillet et Novembre et un minimum en Janvier et Février, lorsque la température et la pluviosité diminuent fortement (**Figure XIV-XVII**). Avec un taux de piqûre de 304 piqûres/personne/mois, *An. minimus (s.l.)* est le vecteur le plus abondant suivi par *An. maculatus (s.l.)* (52 piqûres/personne/mois) et *An. barbirostris (s.l.)* (44 piqûres/personne/mois). *Anopheles minimus (s.l.)* est collecté abondamment toute l'année, c'est l'espèce majoritaire pendant la saison sèche. *Anopheles maculatus (s.l.)* est particulièrement abondant au début de la saison des pluies, pendant les mois de Juin et Juillet. *Anopheles dirus (s.l.)* est collecté *a minima*, principalement pendant la saison des pluies. *Anopheles barbirostris s.l.* et *An. annularis s.l.* représentent une part importante des anophèles collectés à la fin de la saison des pluies, d'Octobre à Décembre.



**Figure XIII. Abondance et diversité des anophèles en fonction du village et de la méthode de collection.**

**(A)** Nombre total d'anophèles collectés par capture sur sujet humain (CSH) et appât animal (CAA) en fonction du village, **(B)** abondance relative des espèces collectées par CSH et **(C)** par CAA.

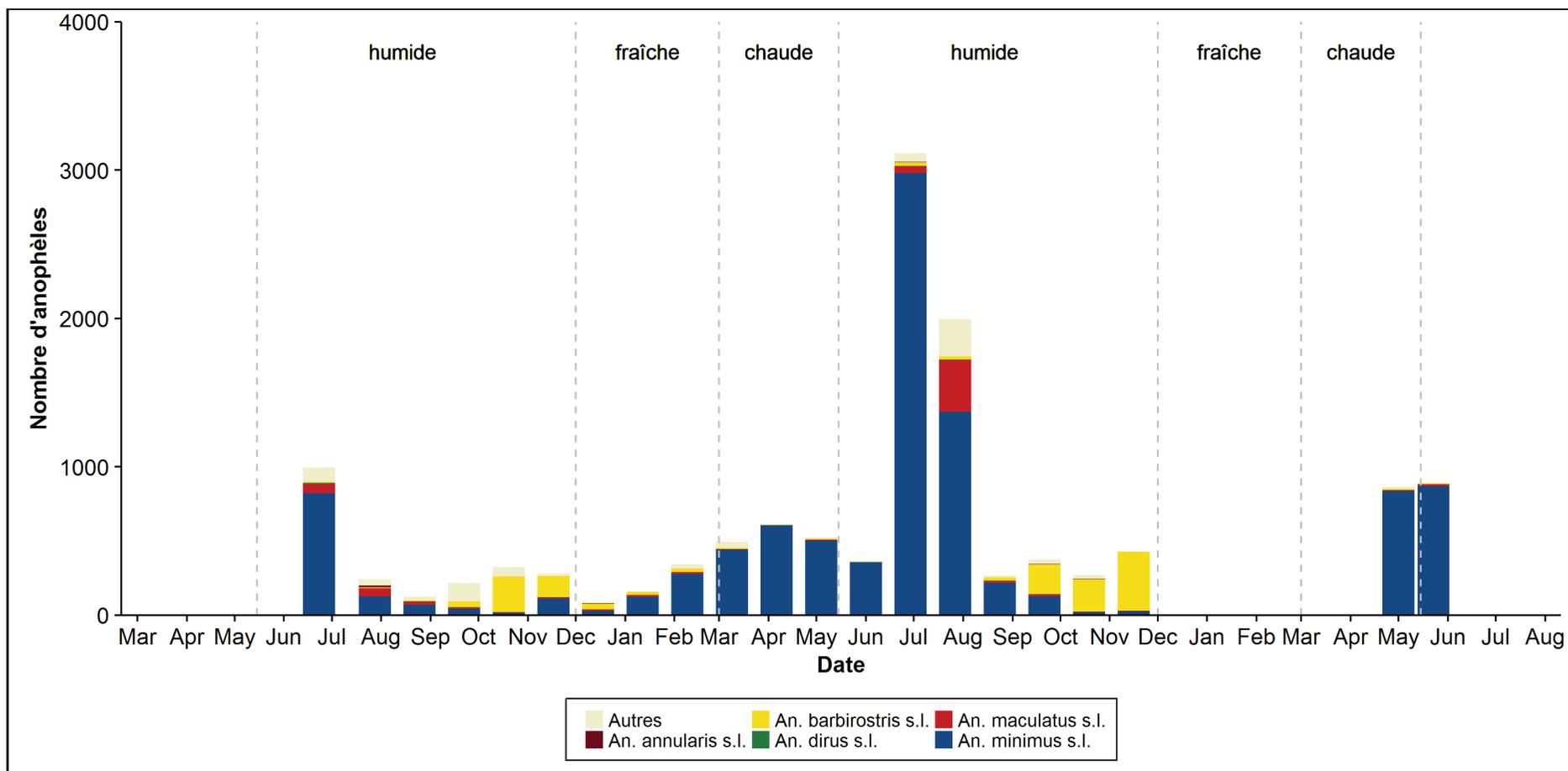


Figure XIV. Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode de capture sur sujet humain dans le village de HKT au cours de l'étude.

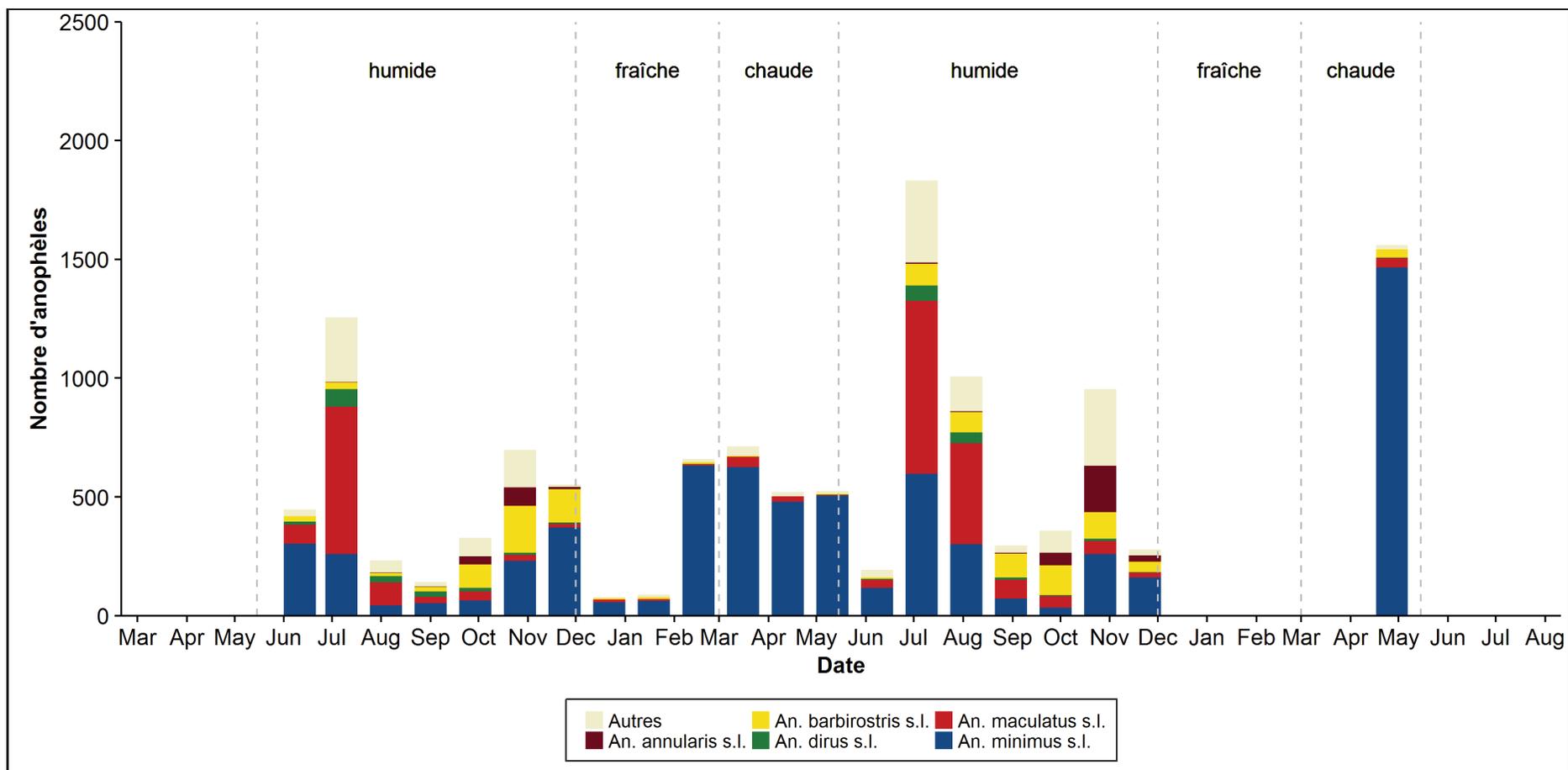


Figure XV. Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode de capture sur sujet humain dans le village de KNH au cours de l'étude.

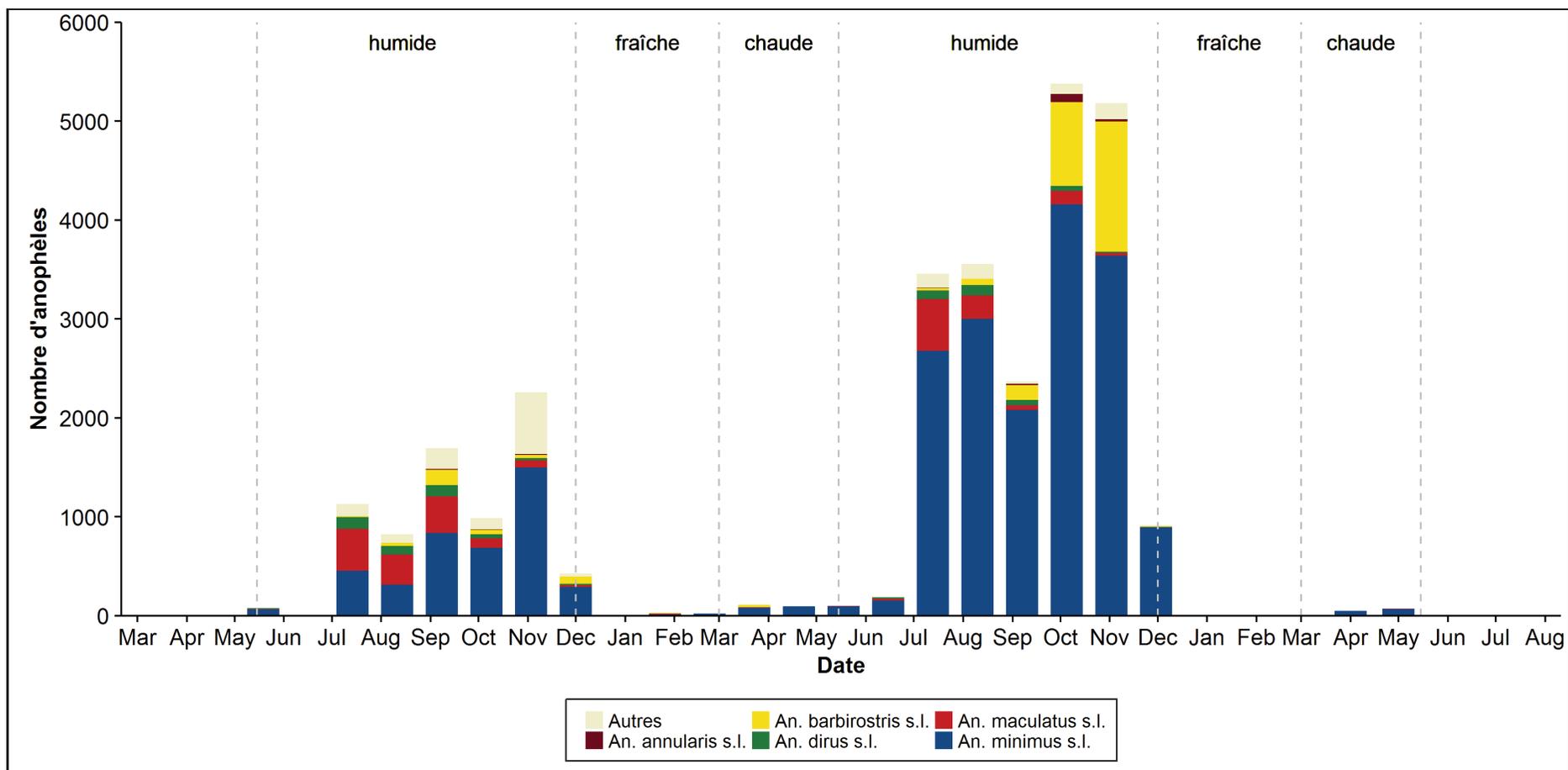


Figure XVI. Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode de capture sur sujet humain dans le village de TOT au cours de l'étude.

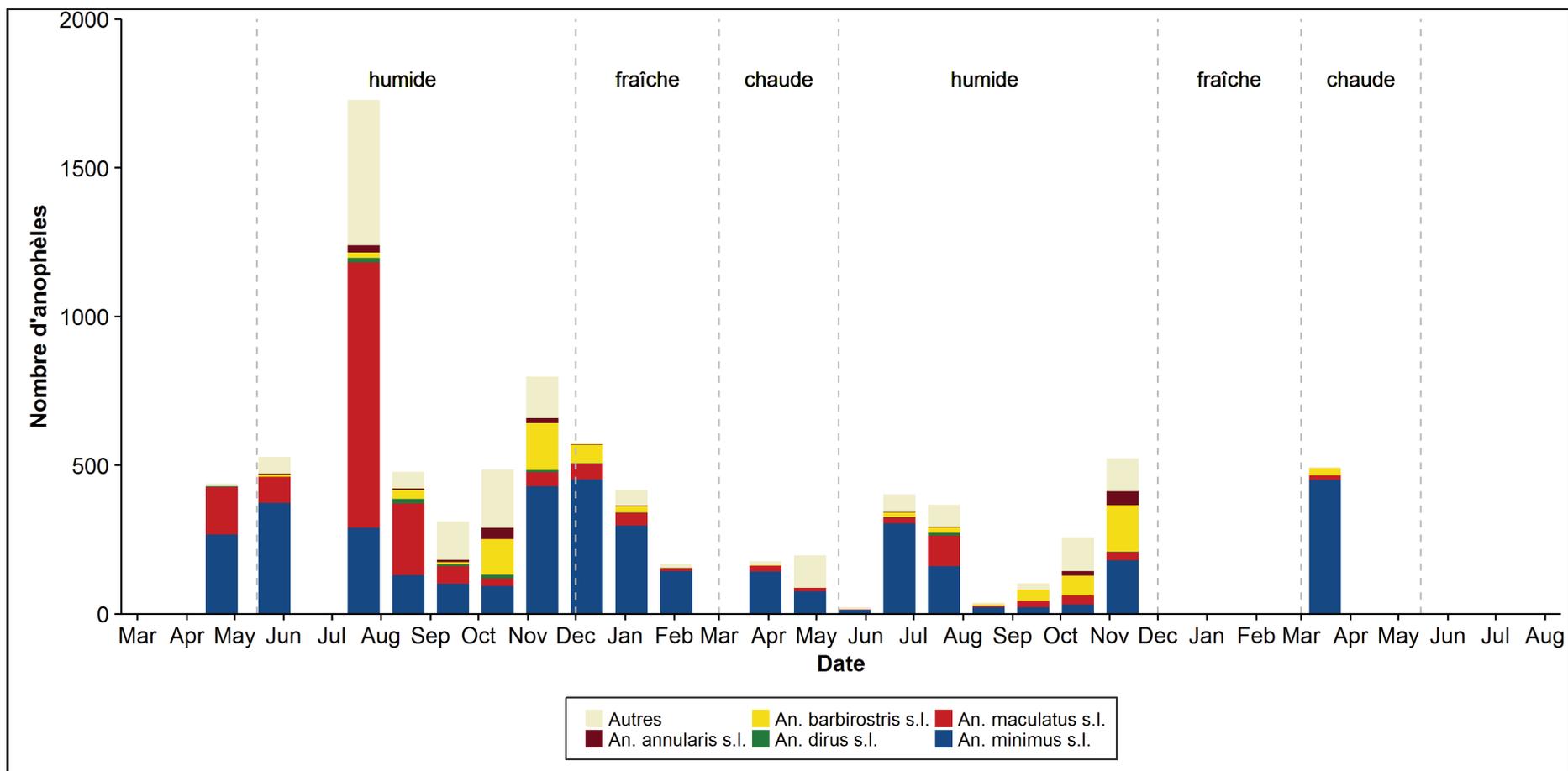
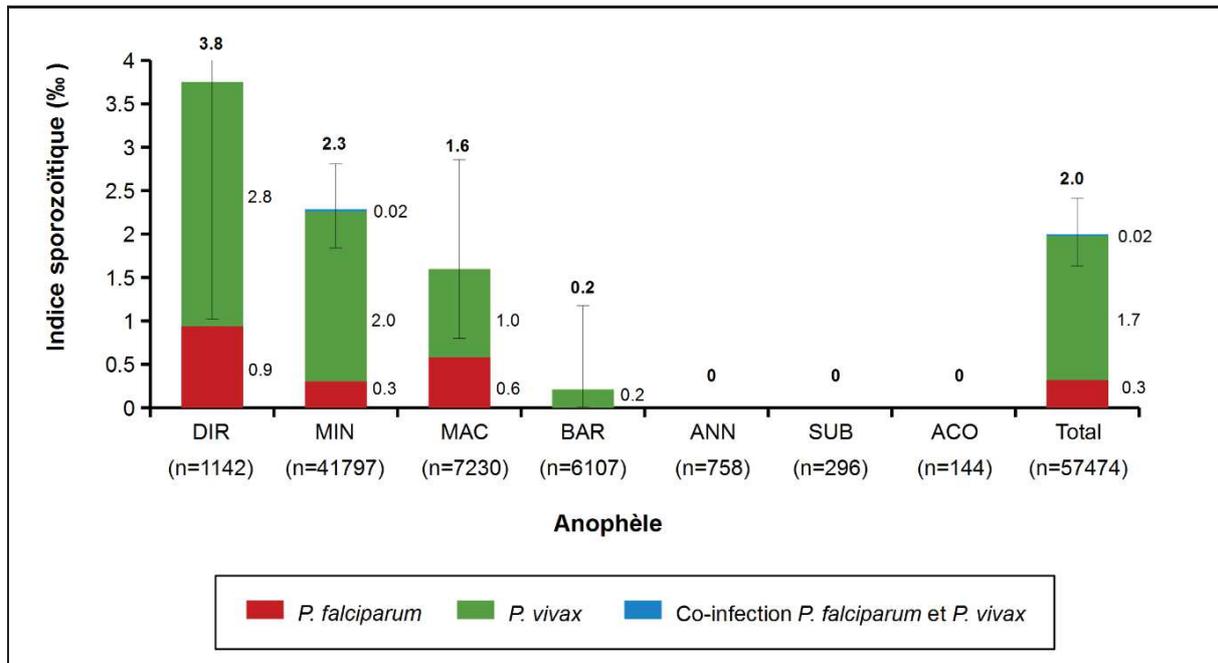


Figure XVII. Evolution de l'abondance et de la diversité des anophèles collectés par la méthode de capture sur sujet humain dans le village de TPN au cours de l'étude.

## B. TAUX D'INFECTION ET CHARGES PARASITAIRES DES VECTEURS

### 1. Taux d'infection

La recherche de plasmodium a été réalisée dans 92% des vecteurs primaires et secondaires collectés par CSH sur toute la période de l'étude (41797 *minimus*, 7230 *maculatus*, 1042 *dirus*, 6107 *barbirostris*, 758 *annularis*, 296 *subpictus* et 144 *aconitus*). La présence du parasite a été confirmée dans 106 spécimens (88 *P. vivax*, 17 *P. falciparum* et 1 co-infecté par *P. falciparum* et *P. vivax*) appartenant à quatre groupes d'anophèles : *An. minimus* (*s.l.*), *An. maculatus* (*s.l.*), *An. dirus* (*s.l.*) et *An. barbirostris* (*s.l.*). Le taux d'infection des vecteurs est de 2.0‰ (1.6-2.4). Le taux spécifique est de 0.3‰ (0.2-0.5) et 1.7‰ (1.3-2.1) pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement et le ratio Pf/Pv est de 0.20 (0.12-0.30). Le taux d'infection des quatre espèces vectrices varie entre 0.2‰ pour *An. barbirostris* (*s.l.*) (0.005-1.1) et 3.7‰ pour *An. dirus* (*s.l.*) (1.0-9.6). Les deux espèces de plasmodium ont été détectées dans *An. minimus* (*s.l.*), *An. maculatus* (*s.l.*) et *An. dirus* (*s.l.*) alors que seulement *P. vivax* a été retrouvé dans *An. barbirostris* (*s.l.*). Une co-infection par *P. falciparum* et *P. vivax* a été détectée dans un *An. minimus* (*s.l.*). Aucun spécimen des groupes *Annularis*, *Subpictus* et *Aconitus* n'a été retrouvé infecté par plasmodium mais le nombre d'individus capturés était relativement faible (**Figure XVIII**).



**Figure XVIII. Taux d'infection des vecteurs (exprimé en nombre d'anophèles infectés pour mille anophèles testés).**

Au total, 57474 vecteurs potentiels collectés entre 2013-2015 ont été testés (21 enquêtes par village soit un total de 4120 hommes.nuit de collection).

**DIR** : dirus, **MIN** : minimus, **MAC** : maculatus, **BAR** : barbirostris, **ANN** : annularis, **SUB** : subpictus, **ACO** : aconitus.

## 2. Charges parasitaires

Les résultats de la quantification sont présentés dans le **Tableau 12** et dans la **Figure XIX**. La quantification a été possible dans 91% des échantillons positifs (96/106) ; pour les 10 échantillons restants, la charge parasitaire était inférieure à la limite de quantification (mais supérieure à la limite de détection). Toutes espèces confondues, la moyenne géométrique de la charge parasitaire est de 103 sporozoïtes/moustique (57-171). Individuellement, la charge parasitaire varie entre 36 et 517518. Soixante pour cent des moustiques ont moins de 100 sporozoïtes. La moyenne géométrique des charges parasitaires est de 65 et 112 sporozoïtes/moustique pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement, sans différence significative entre les deux espèces de parasite ( $p= 0.7013$ , test de Wilcoxon avec correction de la continuité). La moyenne géométrique des charges parasitaires est 118 (69-208), 12 (4-30) et 794 (92-25241) sporozoïtes/moustique pour *An. minimus (s.l.)*, *An. maculatus (s.l.)* et *An. dirus (s.l.)*. La charge parasitaire semble moindre chez *An. maculatus (s.l.)* : le maximum

dans ce groupe est 73 sporozoïtes/moustique, mais la taille de l'échantillon est faible et limite la robustesse de l'analyse.

**Tableau 12. Statistiques descriptives des charges parasitaires détectées dans les échantillons de routine.**

Espèce de plasmodium	Paramètre	Valeur pour l'espèce d'anophèle indiquée				
		Minimus	Maculatus	Dirus	Barbirostris	Total
Pf	N	12	3	0	0	15
	Moy. géom.	80	28			65
	IC 95%	28-204	11-54			25-143
	minimum	12	15			12
	1 <sup>er</sup> quartile	21.5	18			18
	médiane	52	21			52
	3 <sup>ème</sup> quartile	169.75	47			99
	maximum	13002	73			13002
Pv	N	72	5	3	1	81
	Moy. géom.	127	7	794	33	112
	IC 95%	63-238	2-24	92-25241		61-207
	minimum	1	2	25		1
	1 <sup>er</sup> quartile	17.25	2	1479.5		15
	médiane	54	3	2934		51
	3 <sup>ème</sup> quartile	452.75	25	4884		443
	maximum	517518	64	6834		517518
Total	N	84	8	3	1	96
	Moy. géom.	118	12	794	33	103
	IC 95%	69-208	4-30	92-25241		57-171
	minimum	1	2	25		1
	1 <sup>er</sup> quartile	17.25	2.75	1479.5		15
	médiane	52	18	2934		51.5
	3 <sup>ème</sup> quartile	338.75	34.75	4884		273.25
	maximum	517518	73	6834		517518
a						

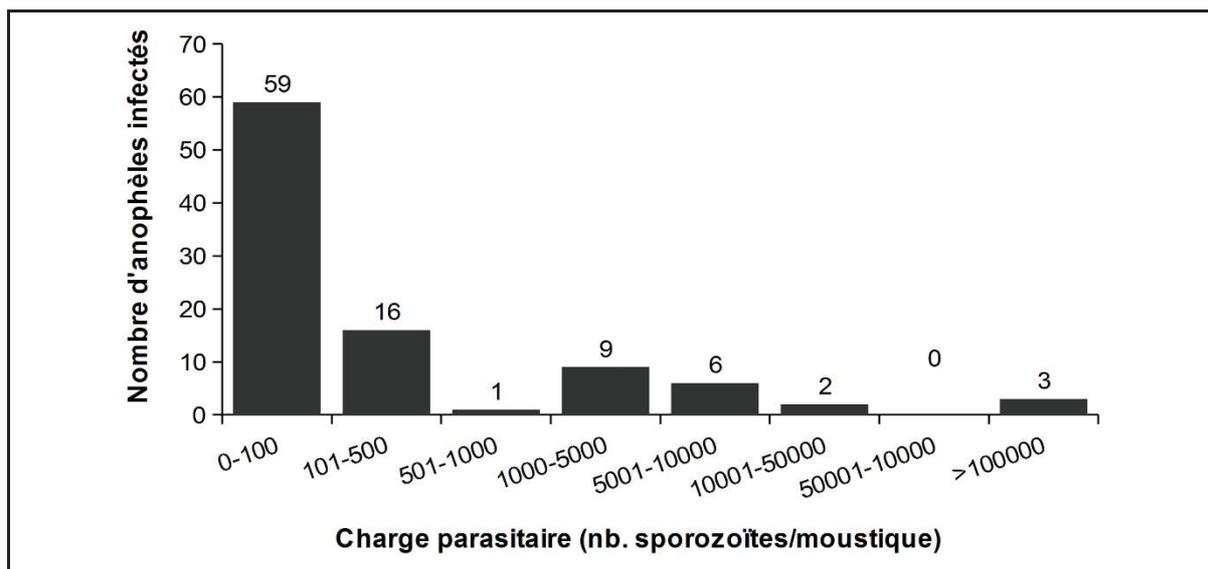


Figure XIX. Histogramme des charges parasitaires (stade sporozoïte).

### C. COMPORTEMENT TROPHIQUE

Les caractéristiques du comportement trophique des anophèles sont résumées dans le **Tableau 13**. Le profil d'activité nocturne des populations collectées sur sujet humain et appât animal est présenté dans les **Figures XX et XXI** respectivement. L'analyse a été réalisée à l'échelle du groupe ou du complexe d'espèces, à l'exception de *An. tessellatus* et *An. kochi* qui sont des espèces *sensu stricto*. A noter que *An. minimus s.s.* et *An. vagus* représentent >99% des spécimens du complexe Minimus et du groupe Subpictus respectivement (données non présentées). Pour les autres groupes et complexes, l'analyse a probablement été réalisée sur un mélange d'espèces jumelles.

**Tableau 13. Comportement trophique des différentes espèces, groupes ou complexes d'anophèles collectés pendant l'étude.**

Groupe	Valeur du paramètre pour le groupe					
	TPH	TPA	IE	IZ	TMC (AAH)	TMC (AAA)
<i>An. aconitus s.l.</i>	2.2 (1.9-2.4)	12 (11-14)	0.61 (0.55-0.67)	0.85 (0.83-0.87)	11:00 pm – 00:00 am	11:00 pm – 00:00 am
<i>An. annularis s.l.</i>	5.5 (5.1-5.9)	135 (129-142)	0.67 (0.63-0.7)	0.96 (0.96-0.96)	10:00 pm – 11:00 pm	11:00 pm – 00:00 am
<b><i>An. barbirostris s.l.</i></b>	<b>44 (43-46)</b>	<b>707 (693-721)</b>	<b>0.64 (0.62-0.65)</b>	<b>0.94 (0.94-0.94)</b>	<b>11:00 pm – 00:00 am</b>	<b>10:00 pm – 11:00 pm</b>
<i>An. culicifacies s.l.</i>	1.7 (1.5-1.9)	247 (238-255)	0.81 (0.76-0.86)	0.99 (0.99-0.99)	01:00 am – 02:00 am	00:00 am – 01:00 am
<b><i>An. dirus s.l.</i></b>	<b>8.3 (7.8-8.8)</b>	<b>3.9 (2.9-5.1)</b>	<b>0.43 (0.4-0.46)</b>	<b>0.32 (0.29-0.34)</b>	<b>11:00 pm – 00:00 am</b>	<b>11:00 pm – 00:00 am</b>
<i>An. hyrcanus s.l.</i>	16.8 (16.1-17.5)	1148 (1130-1166)	0.66 (0.64-0.68)	0.99 (0.98-0.99)	10:00 pm – 11:00 pm	11:00 pm – 00:00 am
<i>An. jamesii s.l.</i>	1.7 (1.5-1.9)	254 (249-263)	0.72 (0.66-0.77)	0.99 (0.99-0.99)	10:00 pm – 11:00 pm	01:00 am – 02:00 am
<i>An. kochi s.s.</i>	2.1 (1.9-2.4)	56 (52-60)	0.66 (0.6-0.72)	0.96 (0.96-0.97)	09:00 pm – 10:00 pm	10:00 pm – 11:00 pm
<b><i>An. maculatus s.l.</i></b>	<b>52 (51-54)</b>	<b>386 (376-397)</b>	<b>0.69 (0.68-0.7)</b>	<b>0.88 (0.88-0.88)</b>	<b>10:00 pm – 11:00 pm</b>	<b>00:00 am – 01:00 am</b>
<b><i>An. minimus s.l.</i></b>	<b>304 (301-307)</b>	<b>887 (871-903)</b>	<b>0.61 (0.6-0.61)</b>	<b>0.74 (0.74-0.75)</b>	<b>00:00 am – 01:00 am</b>	<b>00:00 am – 01:00 am</b>
<i>An. subpictus s.l.</i>	1.0 (0.9-1.2)	568 (555-581)	0.72 (0.64-0.79)	1 (1-1)	09:00 pm – 10:00 pm	10:00 pm – 11:00 pm
<i>An. tessellatus s.s.</i>	10.5 (9.9-11.0)	52 (48-56)	0.63 (0.6-0.65)	0.83 (0.82-0.84)	00:00 am – 01:00 am	00:00 am – 01:00 am
Non déterminé	8.91 (8.41-9.42)	350 (340-360)	0.65 (0.62-0.67)	0.98 (0.97-0.98)	00:00 am – 01:00 am	11:00 pm – 00:00 am

**CAA** : capture sur appât animal, **CSH** : capture sur sujet humain, **IE** : index d'exophagie, **IZ** : index de zoophagie, **TMC** : temps médian de collection, **TPA**: taux de piqûre animal, **TPH**: taux de piqûre humain. Les espèces vectrices identifiées dans cette étude sont indiquées en gras.

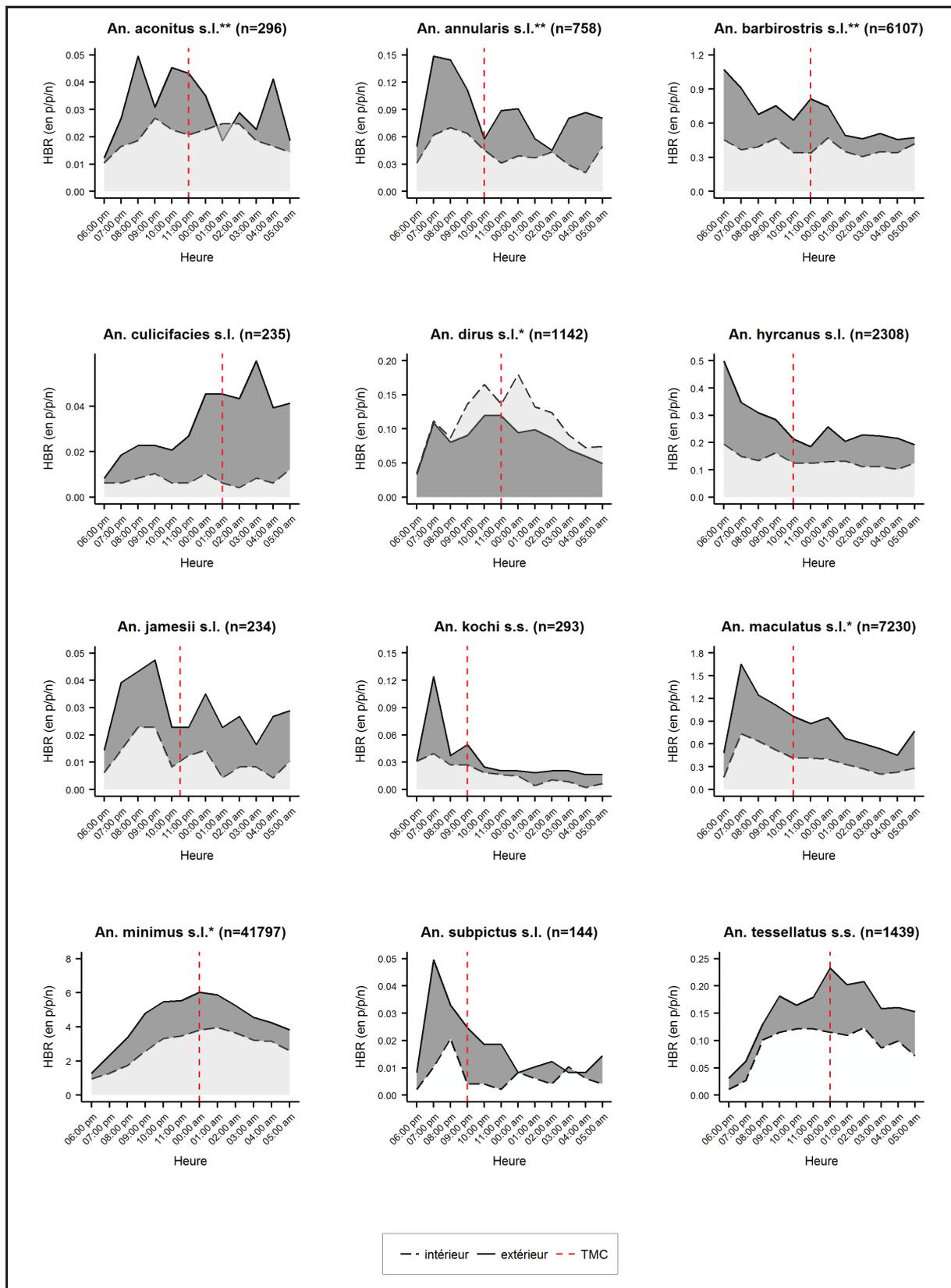


Figure XX. Profil d'activité nocturne des différents groupes, complexes ou espèces d'anophèles collectés sur sujet humain pendant l'étude.

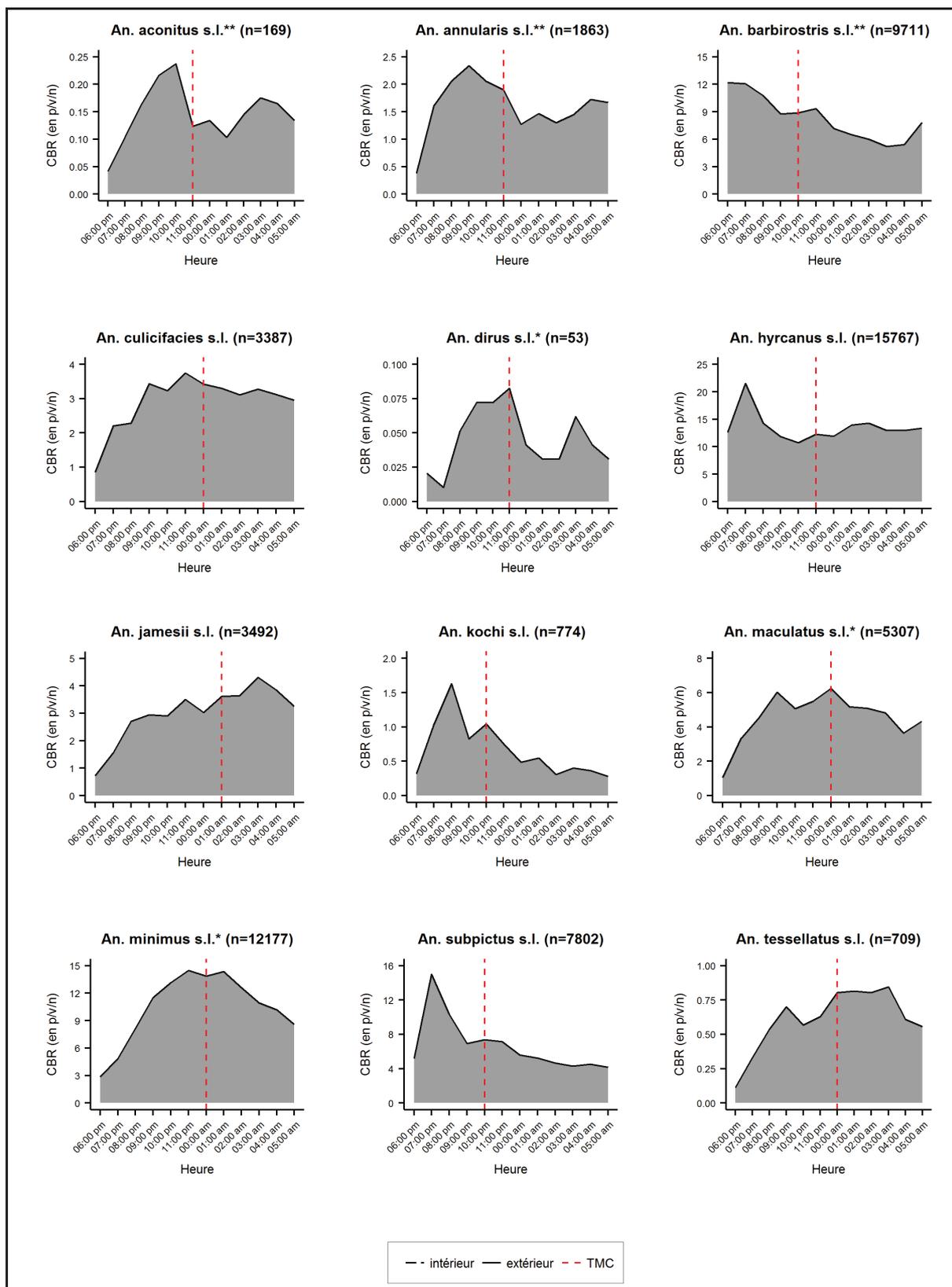


Figure XXI. Profil d'activité nocturne des différents groupes, complexes ou espèces d'anophèles collectés sur sujet animal pendant l'étude.

## 1. Les vecteurs primaires des complexes *Minimus* et *Dirus* et du groupe *Maculatus*

Le taux de piqûre des vecteurs primaires est en moyenne de 365 piqûres/personne/mois et 1276 piqûres/vache/mois. *Anopheles minimus* (s.l.) est le vecteur le plus abondant (TPH=304 piqûres/personne/mois) suivi de *An. maculatus* (s.l.) (TPH=52 piqûres/personne/mois) et *An. dirus* (s.l.) (TPH=8 piqûres/personne/mois). Toutes espèces confondues, les vecteurs primaires sont préférentiellement exophages (IE=0.62) et zoophagiques (IZ=0.77). *Anopheles dirus* (s.l.) est la seule espèce préférentiellement endophagique (IE=0.43) et anthropophagique (IZ=0.32). *Anopheles minimus* (s.l.) est préférentiellement exophagique (IE=0.61) et zoophagique (IZ=0.74). *Anopheles maculatus* (s.l.) est l'espèce la plus exophagique et zoophagique des vecteurs primaires (IE=0.69 et IZ=0.88). Seulement 23% des vecteurs primaires sont collectés à l'intérieur des habitations entre 21:00h et 05:00h. *Anopheles minimus* (s.l.) est la seule espèce dont l'activité augmente progressivement pour atteindre un maximum à minuit. *Anopheles maculatus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) ont un pic d'activité en fin d'après-midi (18:00h). Le temps médian de collection est 00:00h, 22:00h et 23:00h pour *An. minimus* (s.l.), *An. maculatus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) respectivement.

## 2. Les vecteurs secondaires des groupes *Aconitus*, *Annularis*, *Barbirostris* et *Subpictus*

Certaines espèces parmi les groupes *Aconitus*, *Annularis*, *Barbirostris* et *Subpictus* sont suspectées de jouer un rôle secondaire dans la transmission. Elles sont moins abondantes que les vecteurs primaires sur sujet humain (TPH=53 piqûres/personne/mois). *Anopheles barbirostris* (s.l.) est l'espèce la plus représentée (TPH=44 piqûres/personne/mois) suivi de *An. annularis* (s.l.) (TPH=5.5 piqûres/personnes/mois), *An. aconitus* (s.l.) (TPH=2.2 piqûres/personne/mois) et *An. subpictus* (s.l.) (TPH=1.0 piqûre/personne/mois). L'index de zoophagie est en moyenne de 0.96, il varie entre 0.85 et >0.99 pour *An. aconitus* (s.l.) et *An. subpictus* (s.l.) respectivement. L'index d'exophagie est en moyenne de 0.64 et varie entre 0.61 et 0.72 pour *An. aconitus* (s.l.) et *An. subpictus* (s.l.) respectivement. Seulement 22% des vecteurs secondaires sont collectés à l'intérieur des habitations entre 21:00h et 05:00h.

### 3. Les autres espèces peu abondantes et/ou très zoophagiques

Les autres espèces d'anophèles sont *An. culicifacies* (s.l.), *An. hyrcanus* (s.l.), *An. jamesii* (s.l.), *An. kochi* (s.s.) et *An. tessellatus* (s.s.). A l'exception de *An. tessellatus* (s.s.), ces espèces sont très zoophagiques (IZ=0.96-0.99). *Anopheles culicifacies* (s.l.) et *An. jamesii* (s.l.) sont particulièrement exophages (IE=0.81 et 0.72 respectivement). A noter que *An. hyrcanus* (s.l.) et *An. tessellatus* (s.s.) ont un TPH relativement élevé, de 16.8 et 10.5 piqûres/personne/mois respectivement.

## D. RESISTANCES AUX INSECTICIDES UTILISES POUR LA LUTTE ANTI-VECTORIELLE

Au total, 5896 anophèles collectés dans les villages ont été utilisés pour faire les tests de sensibilité : 1805, 1483 et 1202 spécimens ont été phénotypés pour leur sensibilité à la deltaméthrine, à la perméthrine et au DDT respectivement (1406 spécimens supplémentaires ont été utilisés pour les tubes contrôles). En moyenne, la mortalité dans les tubes contrôles a été de 8.4%. Seulement 3/46 tests ont été exclus des analyses car la mortalité du contrôle était >20% (91/5896 moustiques). La sensibilité de deux souches d'anophèles élevées au laboratoire a également été déterminée afin de contrôler la qualité des papiers imprégnés utilisés pour les tests.

Les résultats obtenus pour la deltaméthrine, la perméthrine et le DDT sont présentés dans les **Tableaux 14-16**. Concernant les souches de laboratoire, *An. minimus* (s.s.) est sensible à tous les insecticides et *An. scanloni* est résistant au DDT (mortalité de 84%). Des résistances ont été détectées dans les populations sauvages chez 5/9, 2/6 et 2/6 des espèces testées pour la deltaméthrine, la perméthrine et le DDT respectivement. *Anopheles maculatus* (s.l.) est résistant à la deltaméthrine (mortalité de 85%), une résistance suspectée à la perméthrine a également été détectée dans ce groupe (mortalité de 97%). Une résistance suspectée à la deltaméthrine a été détectée chez *An. minimus* (s.l.) (mortalité de 92%). Il n'a pas été possible de générer des données pour *An. dirus* (s.l.) du fait de la faible abondance de ce groupe. *Anopheles barbirostris* (s.l.) et *An. hyrcanus* (s.l.) sont particulièrement résistants aux trois insecticides testés (mortalité <85% et <60% respectivement). Dans les populations

sensibles, le TKD50 est <20 min pour la deltaméthrine, <25 min pour la perméthrine et <40min pour le DDT. Chez *An. hyrcanus* (*s.l.*), la diminution importante du KD (<35%) et l'allongement du TKD50 (>110min pour les pyréthroïdes et >80 min pour le DDT) ont permis de suspecter *a priori* l'implication de la mutation kdr. La mutation L1014S a été détectée à l'état homozygote et hétérozygote dans ce groupe (**Figure XXII**).

**Tableau 14. Résultats des tests de sensibilité effectués pour la deltaméthrine (0.05%).**

Espèce	Valeur de l'indicateur pour l'espèce indiquée				
	N	Mortalité (%)	KD (%)	TKD50 (min)	Sensibilité*
<i>An. scanloni</i> (souche de laboratoire)	50	100	100	19.6 (18.4–20.7)	S
<i>An. minimus</i> (s.s.) (souche de laboratoire)	50	100	100	10.4 (9.4–11.4)	S
<i>An. annularis</i> (s.l.)	40	100	100	14.4 (13.1–15.6)	S
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	504	72 (68–76)	85 (82–88)	30.5 (28.7–32.4)	<b>R</b>
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	172	33 (26–40)	27 (20–33)	131.3 (83–378.1)	<b>R</b>
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	111	87 (81–94)	97 (94–100)	14.0 (11.7–16.2)	<b>R</b>
<i>An. kochi</i>	43	98 (93–100)	100	14.6 (13–16)	S
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	280	85 (81–89)	89 (85–93)	18.8 (15.8–21.6)	<b>R</b>
<i>An. minimus</i> (s.l.)	370	92 (89–94)	99 (98–100)	15.4 (14.3–16.5)	SR
<i>An. tessellatus</i>	83	98 (94–100)	99 (96–100)	17.7 (16.6–18.8)	S
<i>An. subpictus</i> (s.l.)	148	75 (68–82)	95 (91–98)	21.3 (19–23.4)	<b>R</b>

\* d'après les seuils définis par l'OMS (World Health Organization, 2016). Les espèces résistantes sont représentées en gras.

**Tableau 15. Résultats des tests de sensibilité effectués pour la perméthrine (0.75%).**

Espèce	Valeur de l'indicateur pour l'espèce indiquée				
	N	Mortalité (%)	KD (%)	TKD50 (min)	Sensibilité*
<i>An. scanloni</i> (souche de laboratoire)	50	100	98 (94–100)	25.6 (24.2–27)	S
<i>An. minimus</i> (s.s.) (souche de laboratoire)	50	100	100	13.5 (11.5–15.3)	S
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	493	84 (81–88)	90 (88–93)	26.6 (25.8–27.5)	<b>R</b>
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	154	48 (40–56)	32 (24–39)	116.2 (83–212.1)	<b>R</b>
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	54	98 (95–100)	100	11.3 (10.3–12.2)	S
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	264	97 (95–99)	97 (95–99)	16.7 (15.6–17.8)	SR
<i>An. minimus</i> (s.l.)	340	98 (96–99)	99 (98–100)	15.0 (14.4–15.6)	S
<i>An. subpictus</i> (s.l.)	178	95 (92–98)	100	15.3 (14.3–16.3)	SR

\* d'après les seuils définis par l'OMS (World Health Organization, 2016). Les espèces résistantes sont représentées en gras.

**Tableau 16. Résultats des tests de sensibilité effectués pour le DDT (4%).**

Espèce	Valeur de l'indicateur pour l'espèce indiquée				
	N	Mortalité (%)	KD (%)	TKD50 (min)	Sensibilité*
<i>An. scanloni</i> (souche de laboratoire)	50	84 (74–94)	42 (28–56)	63.2 (59.8–69.7)	S
<i>An. minimus</i> (s.s.) (souche de laboratoire)	50	100	98 (94–100)	38.3 (36.9–39.7)	<b>R</b>
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	435	74 (70–78)	49 (45–54)	61.0 (59.1–63.2)	<b>R</b>
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	91	57 (47–67)	30 (20–39)	84.2 (70.9–112.1)	<b>R</b>
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	59	98 (95–100)	88 (80–96)	33.3 (31.3–35.2)	S
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	239	99 (97–100)	9 (94–99)	25.5 (23.4–27.4)	S
<i>An. minimus</i> (s.l.)	245	100	100	23.4 (21.8–24.9)	S
<i>An. subpictus</i> (s.l.)	133	97 (94–100)	91 (86–96)	35.3 (34–36.6)	SR

\* d'après les seuils définis par l'OMS (World Health Organization, 2016). Les espèces résistantes sont représentées en gras.



## E. LA TRANSMISSION RESIDUELLE

La distribution des piqûres infectantes en fonction du lieu et de l'heure est présentée dans la **Figure XXIII**. Globalement, 50% des piqûres infectantes a lieu à l'extérieur et 65% a lieu en dehors de la fenêtre de protection théorique des moustiquaires (21 :00 à 05 :00).

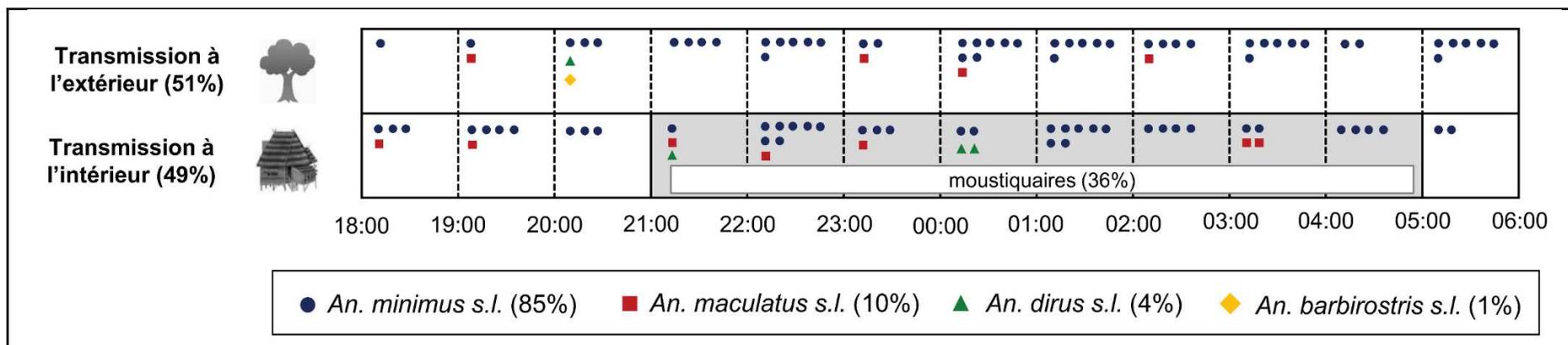


Figure XXIII. Distribution des piqûres infectantes en fonction de l'heure et du lieu de la collection.

# V. CHAPITRE 3. DYNAMIQUE ET MODALITES DES INDICATEURS ENTOMOLOGIQUES DE LA TRANSMISSION DU PALUDISME

## A. VALEURS MOYENNES ET DYNAMIQUE DES INDICATEURS ENTOMOLOGIQUES

Les valeurs moyennes des indicateurs entomologiques (TPH, IS et TIE) en fonction du village sont présentées dans le **Tableau 17**.

**Tableau 17. Résumé des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans les quatre villages de l'étude.**

Village	Valeur de l'indicateurs pour le village indiqué (IC95)				
	TPH (p/p/m)	IS-Pf (‰)*	IS-Pv (‰)*	TIE-Pf (pi/p/m)*	TIE-Pv (pi/p/m)*
HKT	313 (307-319)	0.5 (0.2-1.1)	3.8 (2.7-5.2)	0.15 (0.05-0.35)	1.2 (0.86-1.63)
KNH	269 (264-275)	0.5 (0.1-1.2)	3 (2-4.4)	0.12 (0.03-0.31)	0.82 (0.54-1.19)
TOT	691 (682-700)	0.3 (0.1-0.6)	0.7 (0.4-1.1)	0.18 (0.07-0.4)	0.46 (0.26-0.76)
TPN	178 (173-182)	0.5 (0.1-1.6)	1.1 (0.4-2.4)	0.1 (0.02-0.28)	0.19 (0.07-0.42)
<b>Total</b>	<b>365 (362-369)</b>	<b>0.4 (0.2-0.6)</b>	<b>1.9 (1.5-2.3)</b>	<b>0.14 (0.08-0.22)</b>	<b>0.68 (0.54-0.84)</b>

IS : index sporozoïtaire, p/p/m : piqûre/personne/mois, pi/p/m : piqûre infectante/personne/mois, Pf : *Plasmodium falciparum*, Pv : *Plasmodium vivax*, TIE : taux d'inoculation entomologique, TPH : taux de piqûre humain.

\* les valeurs moyennes d'IS et de TIE ont été mesurées sur toute la période de l'étude. Le taux d'infection des vecteurs et l'intensité de la transmission sont donc sous-estimés du fait de l'intervention. Les valeurs moyennes mesurées sur les enquêtes réalisées avant le TdM sont présentées en **Annexe 3**.

### 1. Le taux de piqûre humain

Le TPH moyen est de 365 piqûres/personne/mois (362-369). Concernant l'hétérogénéité spatiale, le TPH moyen calculé pendant toute la durée du suivi varie entre 178 et 691 piqûres/personne/mois à TPN et à TOT respectivement (**Tableau 17**). Le TPH est significativement différent en fonction du site de collection dans tous les villages (test de Friedman, p-value=0.0108 pour TPN et <0.001 pour HKT, KNH et TPN complété par le test de Dunn pour les comparaisons multiples) (**Figure XXIV**). Concernant la saisonnalité, le TPH moyen est de 143 (138-147), 238 (232-243) et 475 (470-479) piqûres/personne/mois pendant

la saison froide, la saison chaude et la saison des pluies respectivement. Le TPH est multimodal et passe par plusieurs maximums relatifs au cours de l'année (**Figures XXV-XXVIII**). Des pics d'exposition ont lieu pendant chaque saison à KNH et à TPN. A TOT, les pics ont lieu pendant la saison des pluies puis l'abondance des vecteurs diminue drastiquement pendant la saison froide et la saison chaude. A noter que les variations interannuelles sont également très marquées. A TPN, l'exposition aux vecteurs a été plus intense pendant la saison des pluies 2013 que pendant la saison des pluies 2014. Au contraire, des TPH exceptionnellement élevés ont été observés à TOT et à HKT pendant la saison des pluies 2014. Lorsque la moyenne est réalisée par enquête et par site de collection, le TPH varie entre 0 et 3090 piqûres/personne/mois à HKT, entre 12 et 1770 piqûres/personne/mois à KNH, entre 1 et 4113 piqûres/personne/mois à TOT et entre 0 et 1611 piqûres/personne/mois à TPN.

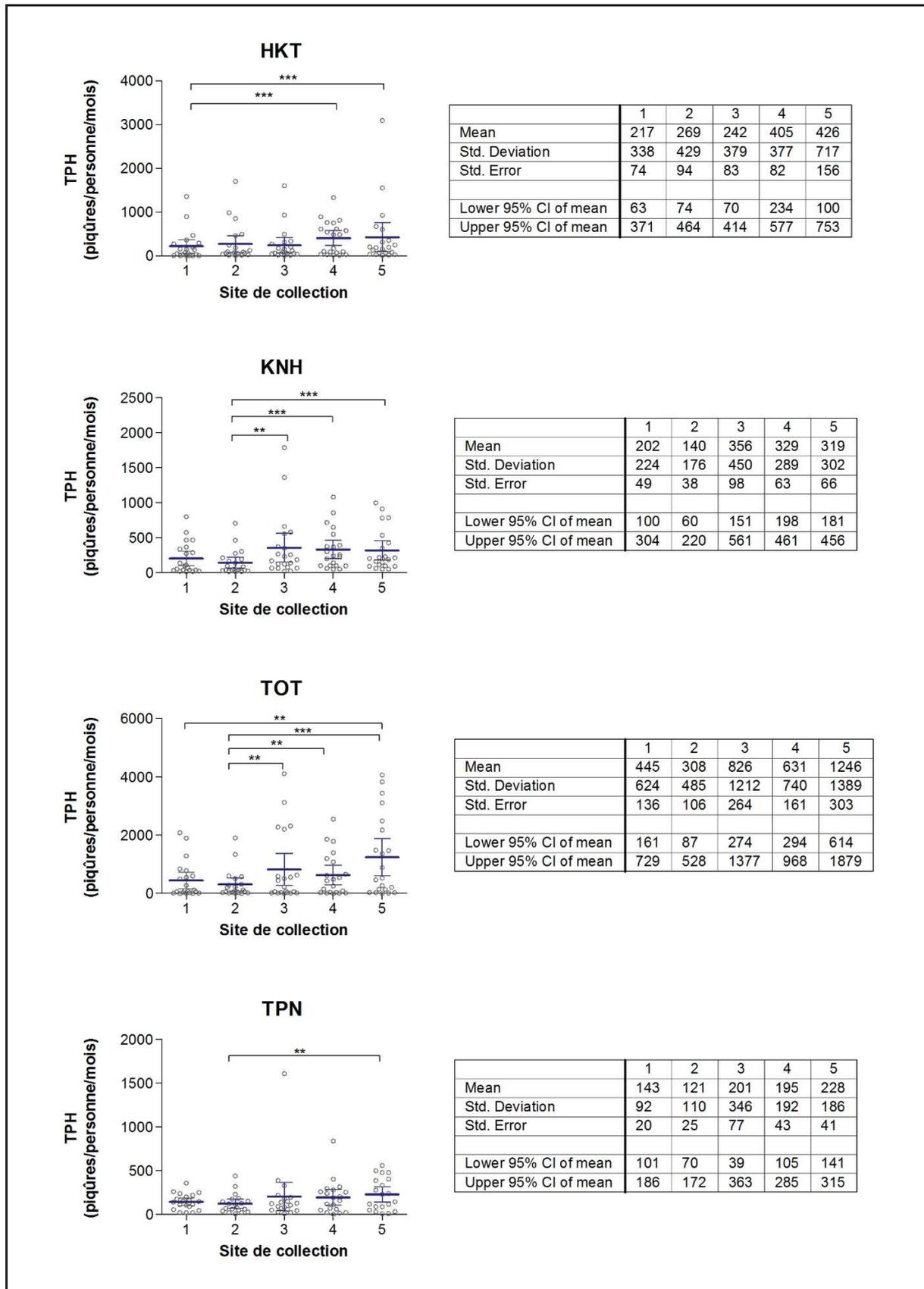


Figure XXIV. Hétérogénéité du taux de piqûre humaine (TPH) en fonction du site de collection.

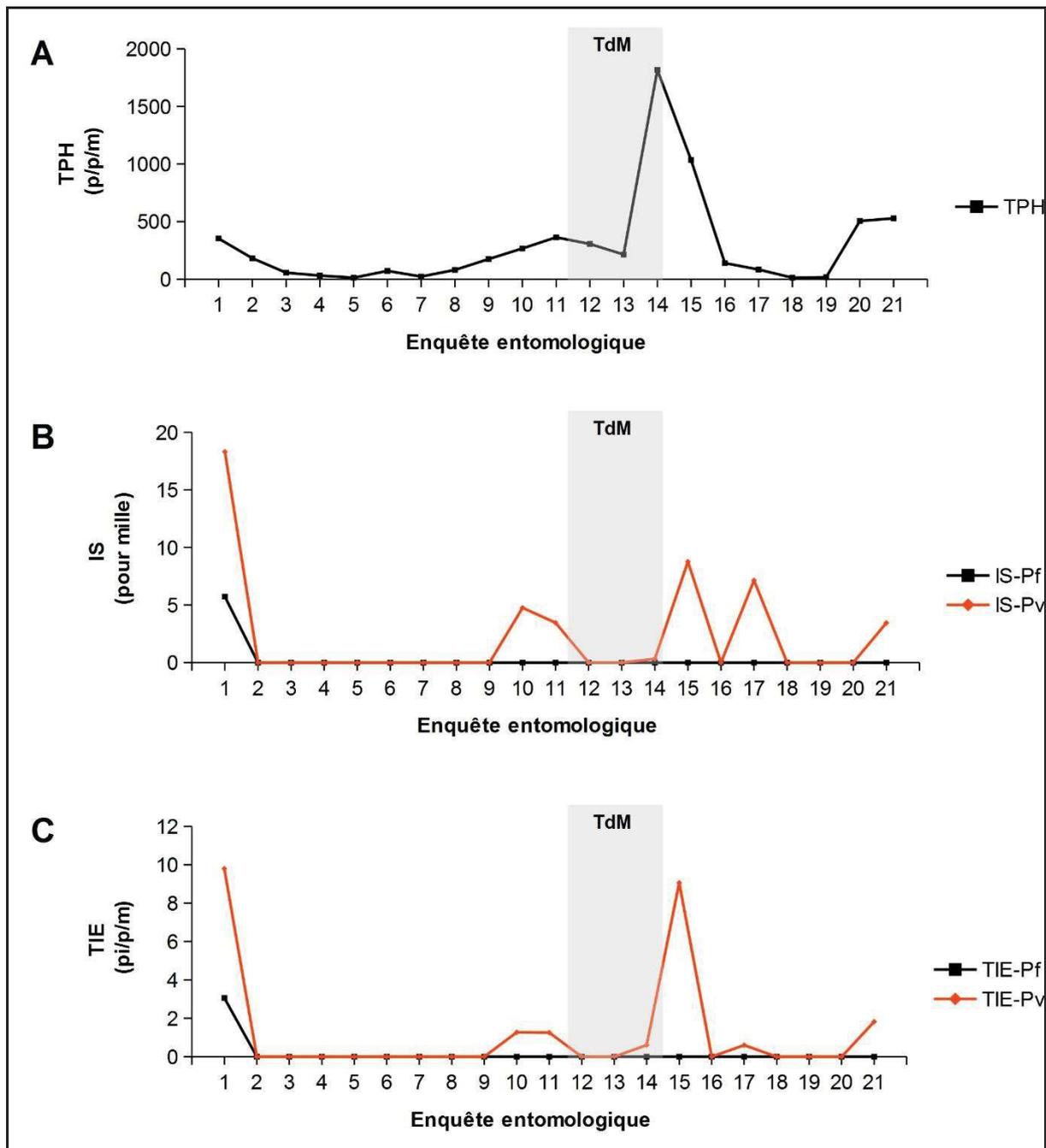


Figure XXV. Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de HKT pendant l'étude.

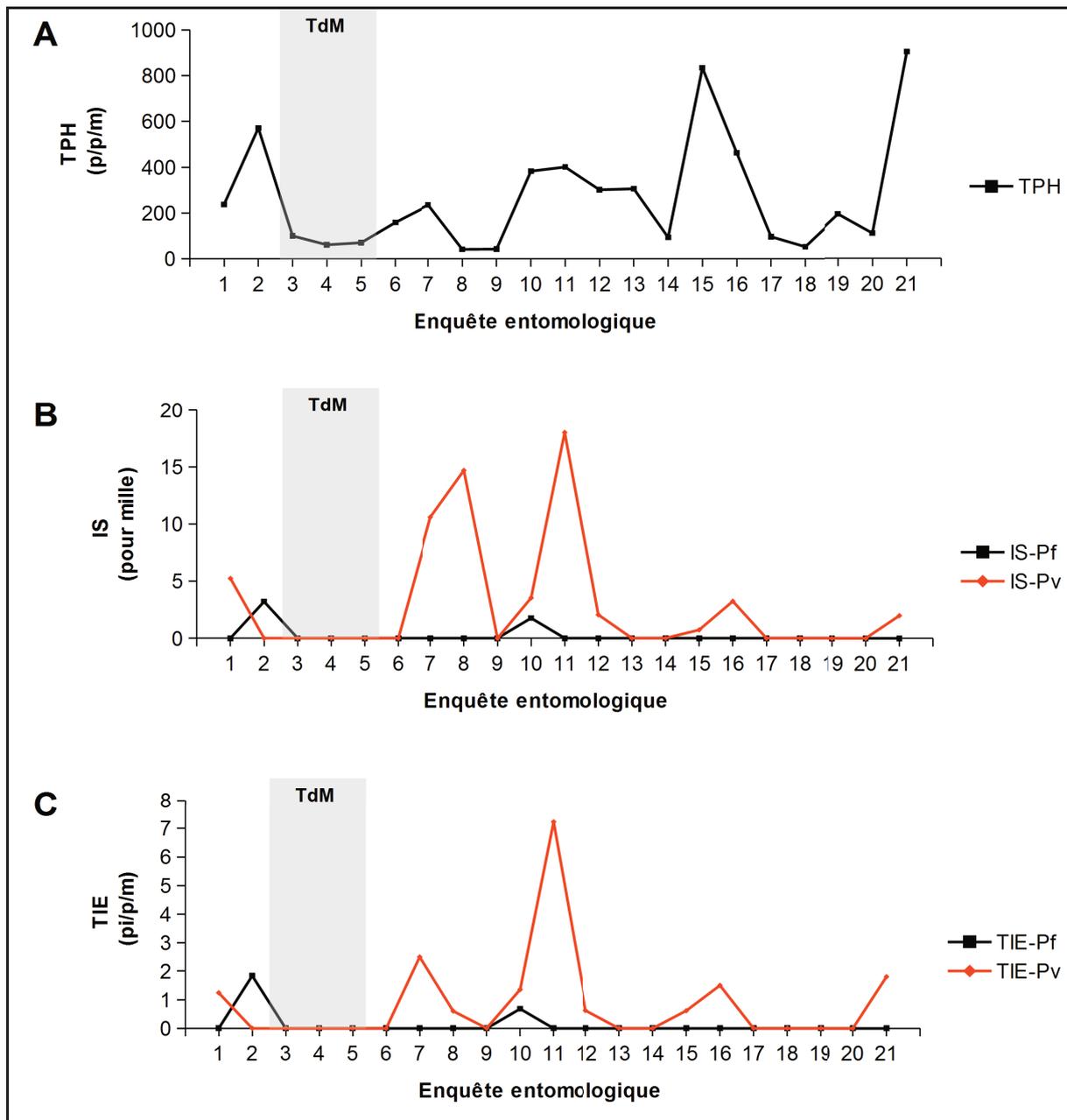


Figure XXVI. Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de KNH pendant l'étude.

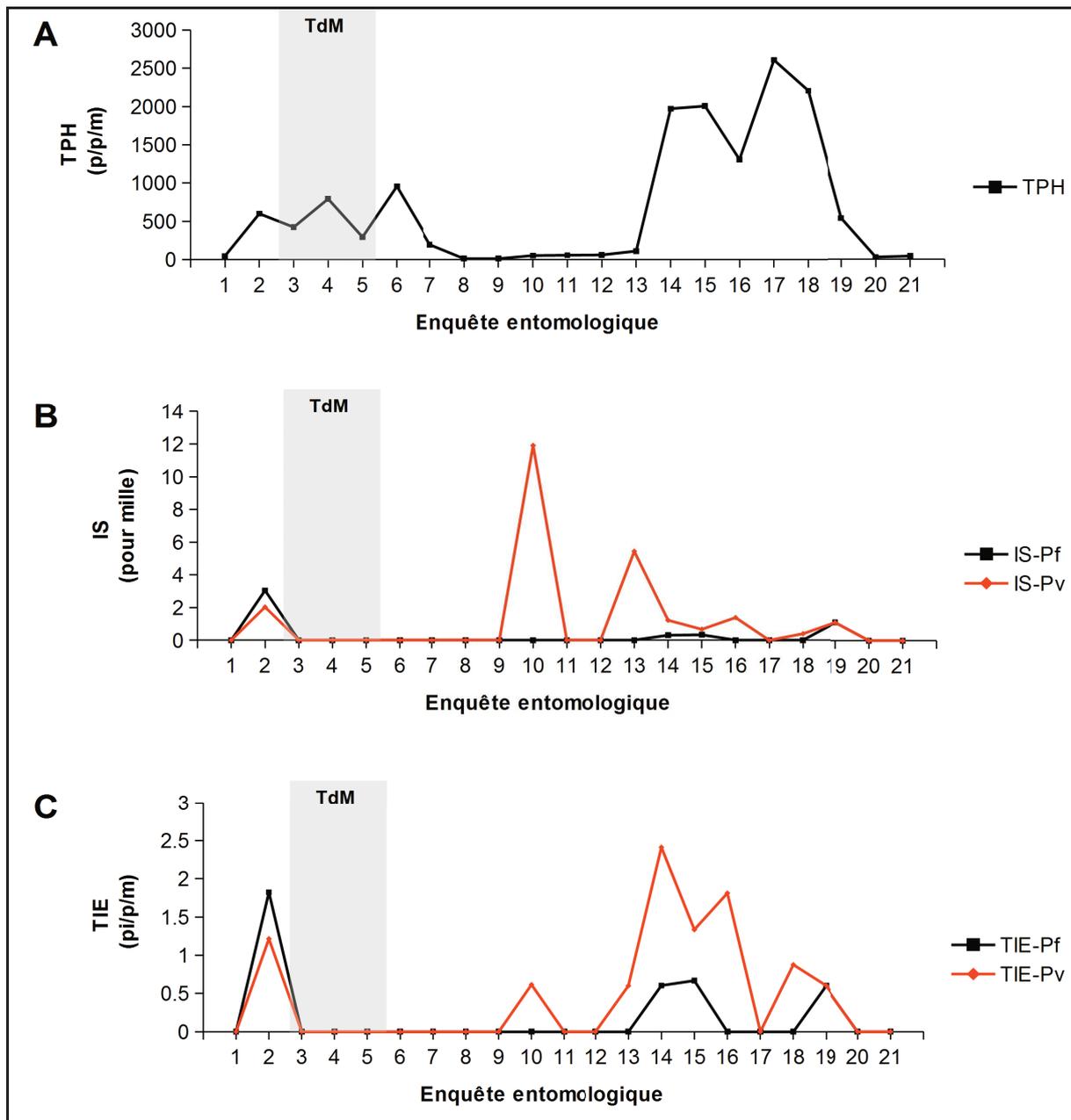


Figure XXVII. Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de TOT pendant l'étude.

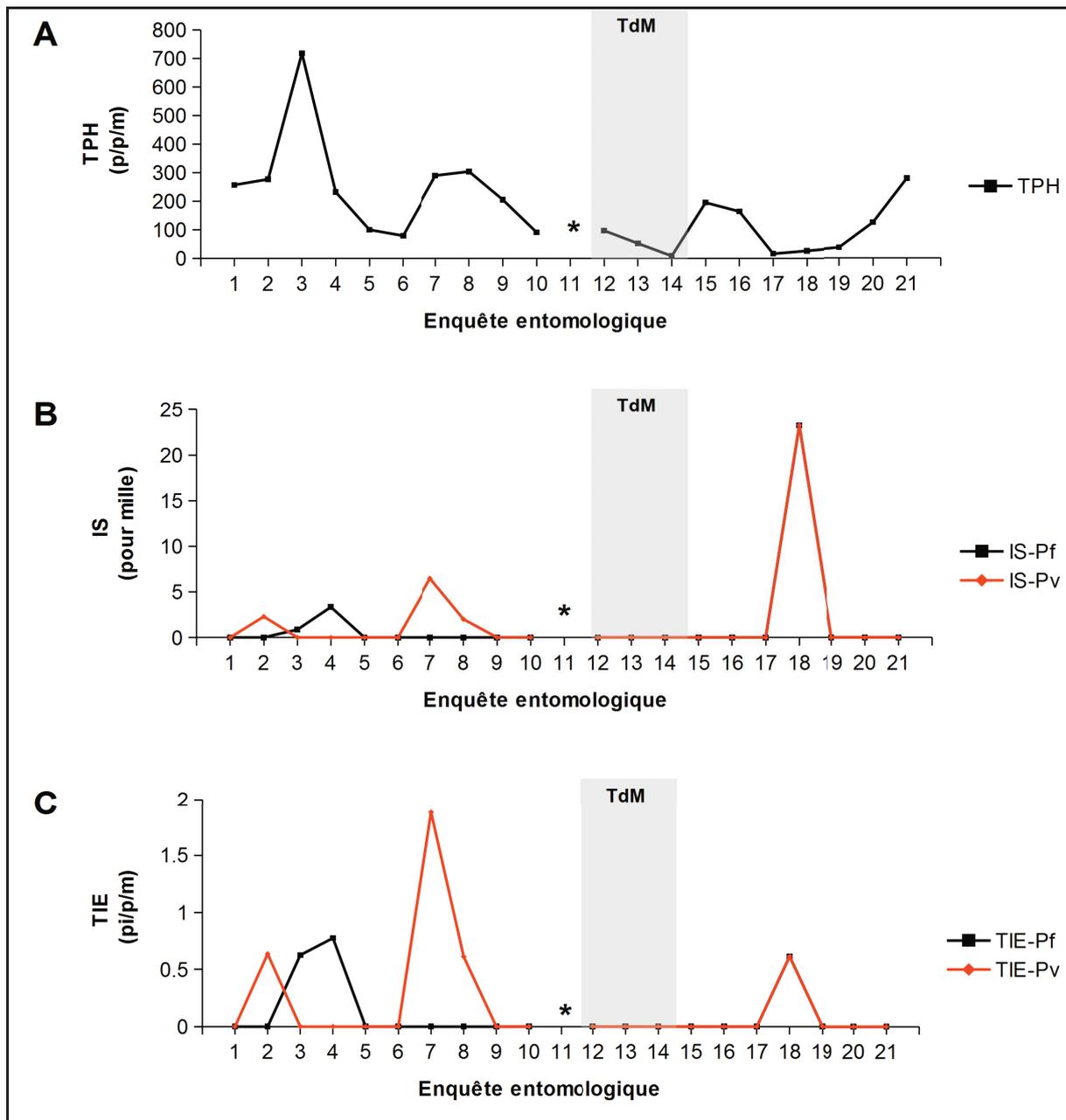


Figure XXVIII. Dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans le village de TPN pendant l'étude.

## 2. L'index sporozoïtaire

Pour *P. falciparum*, l'IS moyen est 0.4‰ (0.2-0.6). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents villages (**Tableau 17**). Il varie entre 0 et 14‰ lorsque les mesures sont agrégées par site et par enquête. Pour *P. vivax*, l'IS moyen est de 1.9‰ (1.5-2.3) et varie entre 0.7‰ (0.4-1.1) et 3.8‰ (2.7-5.2) à TOT et à HKT respectivement (**Tableau 17**). Lorsque les mesures sont agrégées par site et par enquête, l'IS de *P. vivax* varie entre 0 et 66‰.

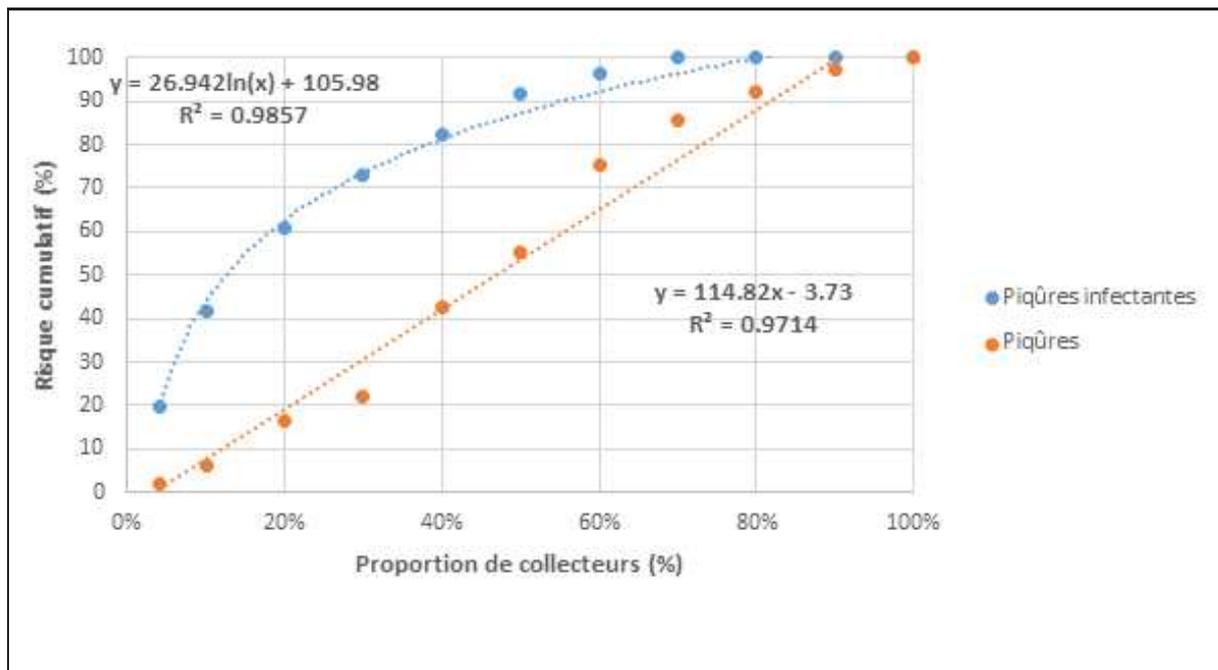
## 3. Le taux d'inoculation entomologique

Pour *P. falciparum*, le TIE moyen est de 0.14 (0.08-0.22) piqûres infectantes/personne/mois sans différence significative entre les villages (**Tableau 17**). Lorsque les mesures sont agrégées par site de collection et par enquête, le TIE de *P. falciparum* varie entre 0 et 3.1 piqûres infectantes/personne/mois. Pour *P. vivax*, le TIE moyen est de 0.68 (0.54-0.84) piqûres infectantes/personne/mois et varie entre 0.19 et 1.2 piqûres infectantes/personne/mois à TPN et à HKT respectivement (**Tableau 17**). Lorsque les mesures sont agrégées par site de collection et par enquête, le TIE de *P. vivax* varie entre 0 et 9.8 piqûres infectantes/personne/mois.

## B. HETEROGENEITE DE LA TRANSMISSION

Les données entomologiques présentées dans cette étude peuvent être considérées comme un suivi longitudinal d'une cohorte de 40 personnes suivies pendant deux ans. Pendant chaque nuit de capture, le TPH et le TIE ont été mesurés pour chaque individu. Au total, la cohorte a reçu 42651 piqûres et 84 piqûres infectantes pendant un total de 3520 hommes.nuit de collection (les enquêtes impactées par le TdM ont été exclues). Sous l'hypothèse d'une distribution homogène des piqûres et des piqûres infectantes dans la population, le nombre de piqûres reçu par chaque individu est identique et le risque cumulatif d'exposition augmente linéairement dans la population. Cela se traduit graphiquement par une droite d'équation  $y=x$  (i.e. 50% des individus reçoivent 50% des piqûres). Le TPH individuel théorique serait de 363 piqûres/personne/mois et le TIE individuel théorique de 0.72 piqûre infectante/personne/mois. Afin de mieux comprendre l'hétérogénéité du risque d'exposition

et la relation entre le TPH et le TIE, nous avons comparé la distribution des valeurs individuelles observées à celle des valeurs théoriques sous l'hypothèse d'une distribution homogène (**Figure XXIX**). L'analyse des valeurs observées montre que la distribution des piqûres (TPH) et des piqûres infectantes (TIE) n'est pas homogène dans la population. En effet, le risque cumulatif d'exposition aux piqûres et aux piqûres infectantes dans la population suit une distribution logarithmique. A l'échelle de l'individu, le TPH moyen varie entre 72 piqûres/personne/mois (63-83) et 1299 piqûres/personne/mois (1258-1340). Vingt pour cent des individus concentrent 60% des piqûres de vecteurs. Le TIE individuel varie entre 0 piqûre infectante/personne/mois (0-1.05) et 4.9 piqûres infectantes/personne/mois (2.8-7.8). Vingt pour cent des individus concentrent 60% des piqûres infectantes. A noter que 33% des individus n'ont reçu aucune piqûre infectante. Cela pose la question de savoir si les personnes les plus exposées aux piqûres de vecteurs sont les personnes qui reçoivent le plus de piqûres infectantes. La distribution des valeurs appariées de TPH et de TIE est présentée dans la **Figure XXIX**. Cette figure montre que l'hétérogénéité (distribution logarithmique) du TIE n'est pas expliquée par l'hétérogénéité du TPH. En effet, lorsque les valeurs sont appariées, le TPH suit une distribution aléatoire homogène (distribution linéaire d'équation  $y=x$ ).



**Figure XXIX. Hétérogénéité de la transmission et relation avec le contact homme-vecteur.**

Vingt pour cent des collecteurs concentrent 60% des piqûres infectantes. Cette distribution hétérogène des piqûres infectantes n'est pas expliquée par une hétérogénéité du taux de piqûre humain : lorsque les valeurs de TIE et de TPH sont appariées, le TPH cumulatif augmente de manière linéaire en suivant une droite d'équation  $y=x$  (20% des collecteurs reçoivent 20% des piqûres infectantes).

## C. FACTEURS DETERMINANT L'INTENSITE DE LA TRANSMISSION

Afin de mieux comprendre les facteurs qui déterminent l'intensité de la transmission, nous avons modélisé le TIE en fonction du village, de la saison, du TPH, de la prévalence de l'infection (déterminée par une technique « ultra-sensible ») et du taux d'incidence des accès palustres symptomatiques. Les résultats des analyses univariées sont présentés en **Annexe 4**. Le village, la saison, le TPH et la prévalence ont montré une association significative avec le TIE. Aucune association significative n'a été observée entre l'incidence des cas symptomatiques et le TIE. Les résultats des analyses multivariées sont présentés dans les **Tableaux 18 et 19** pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement. L'association entre le TIE et la prévalence de l'infection est le résultat le plus marquant de notre étude. Elle explique l'effet du TdM sur l'intensité de la transmission : lorsque le réservoir asymptomatique est éliminé, l'infektivité des vecteurs diminue fortement et rapidement ce qui se traduit par une

diminution du TIE (voir **Chapitre 4**). La relation entre le TIE et la prévalence n'est pas linéaire : le TIE augmente fortement lorsque la prévalence dépasse le seuil des 5%. Le deuxième facteur déterminant l'intensité de la transmission est le TPH. La relation entre le TPH et le TIE répond également à un effet seuil : l'association n'est pas significative pour les faibles valeurs de TPH puis elle augmente fortement lorsque le TPH dépasse 300 piqûres/personne/mois. Concernant l'effet de la saison, il est « absorbé » par l'introduction du TPH dans le modèle (l'association entre saison et TIE n'est plus significative lors des analyses multivariées).

**Tableau 18. Résultats du modèle de l'intensité de la transmission (TIE) en fonction des variables environnementales et parasitologiques pour *P. falciparum*.**

Variable	Catégorie	RR	IC95%	p-value
Village	TOT (référence)	1	-	-
	HKT	0.88	0.23 - 3.33	0.846
	KNH	0.84	0.21 - 3.37	0.801
	TPN	3.82	0.62 - 23.46	0.148
Prévalence (%)	0 – 5	1	-	-
	5 - 10	9.03	1.13 - 72.36	0.038
	> 10	7.66	1.44 - 40.76	0.017
TPH (nb. piqûres/personne/mois)	0 – 300 (référence)	1	-	-
	>300	17.16	5.11 - 57.57	<0.0001

IC : intervalle de confiance, RR : risque relatif, TPH : taux de piqûre humain.

**Tableau 19. Résultats du modèle de l'intensité de la transmission (TIE) en fonction des variables environnementales et parasitologiques pour *P. vivax*.**

Variable	Catégorie	RR	IC95%	p-value
Village	HKT (référence)	1	-	-
	KNH	0.71	0.25 - 2.05	0.526
	TOT	0.47	0.27 - 0.8	0.006
	TPN	0.61	0.26 - 1.43	0.255
Prévalence (%)	0 – 5 (référence)	1	-	-
	5 – 20	4.16	1.35 - 12.8	0.013
	> 20	4.91	1.46 - 16.6	0.010
TPH (nb. piqûres/personne/mois)	0 – 150 (référence)	1	-	-
	150 - 300	3.53	0.94 - 13.24	0.062
	> 300	21.86	7.24 - 66	<0.0001

IC : intervalle de confiance, RR : risque relatif, TPH : taux de piqûre humain.

## VI. CHAPITRE 4. *IMPACT DU TRAITEMENT DE MASSE SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME*

---

### A. EFFET DU TRAITEMENT SUR LE TAUX D'INOCULATION ENTOMOLOGIQUE

Globalement, le rapport Pf/Pv (dans la population anophélienne) a été divisé par 8.8 au cours de l'étude : il est passé de 0.62 (13/21) avant et pendant le TdM à 0.07 (5/68) après l'intervention (p-value<0.0001, test du  $\chi^2$ ). Les résultats des modèles de l'impact du TdM sur le TIE (intensité de la transmission) sont présentés dans les **Tableaux 20 et 21**. Pour *P. falciparum*, le TIE a fortement diminué pendant et après le TdM. Le risque relatif (ajusté sur la période de pré-intervention) est 0.21 pendant l'intervention (p-value=0.216) et 0.11 après l'intervention (p-value=0.069). Pour *P. vivax*, la dynamique est différente : l'intensité de la transmission a transitoirement diminué pendant l'intervention puis elle est revenue à ses valeurs initiales après l'intervention. En effet, le risque relatif (ajusté sur la période pré-intervention) est de 0.17 pendant l'intervention (p-value=0.031) et 0.88 après l'intervention (p-value=0.802). Il est intéressant de noter que les résultats présentés dans les **Tableaux 18 et 19** et dans les **Tableaux 20 et 21** sont très similaires. En effet les valeurs de prévalence sont contraintes par le TdM. Pour *P. vivax*, la prévalence est nulle ou très faible pendant le TdM et comprise entre 10 et 35 % en dehors de cette période. Pour *P. falciparum*, les valeurs élevées de prévalence sont surtout observées avant l'intervention (**Figure XXX**). Ces résultats permettent d'affirmer que l'effet de du TdM sur l'intensité de la transmission est indirect et médié par son effet sur la prévalence de l'infection. Lorsque le réservoir sous-microscopique est éliminé, l'intensité de la transmission diminue rapidement et fortement.

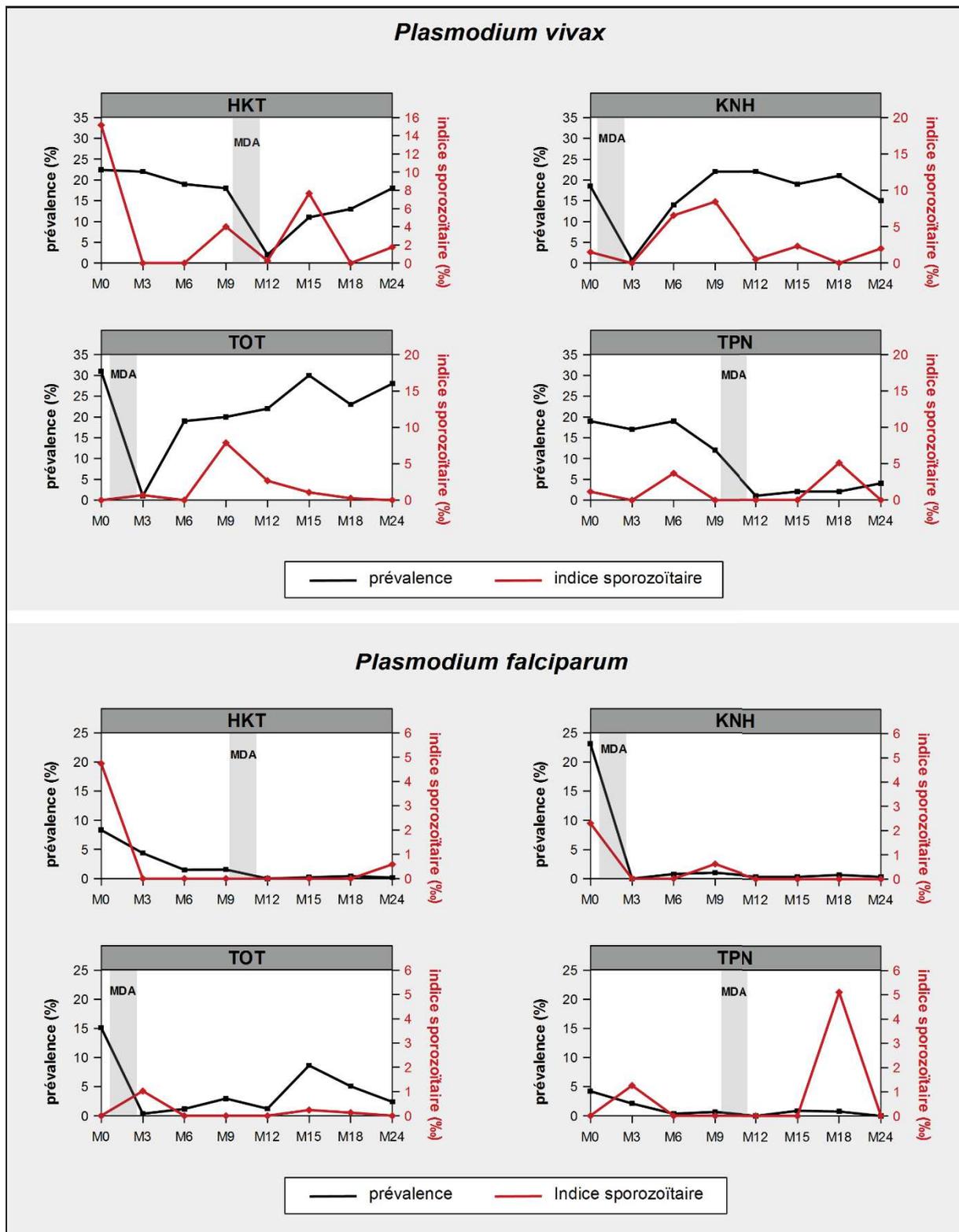


Figure XXX. Evolution de l'infectivité des vecteurs et de la prévalence sous-microscopique dans le contexte du TdM.

**Tableau 20. Résultats du modèle de l'intensité de la transmission en fonction du traitement de masse pour *P. falciparum*.**

Variable	Catégorie	RR	IC95%	p-value
Village	TOT (référence)	1	-	-
	HKT	0.28	0.06 - 1.26	0.097
	KNH	0.47	0.14 - 1.55	0.214
	TPN	0.47	0.04 - 5.82	0.556
Période	Avant (référence)	1	-	-
	Pendant	0.21	0.02 - 2.5	0.216
	Après	0.11	0.01 - 1.18	0.069
TPH (nb. piqûres/personne/mois)	0 – 300 (référence)	1	-	-
	>300	17.41	4.04 - 75.04	< 0.0001

IC : intervalle de confiance, RR : risque relatif, TPH : taux de piqûre humain.

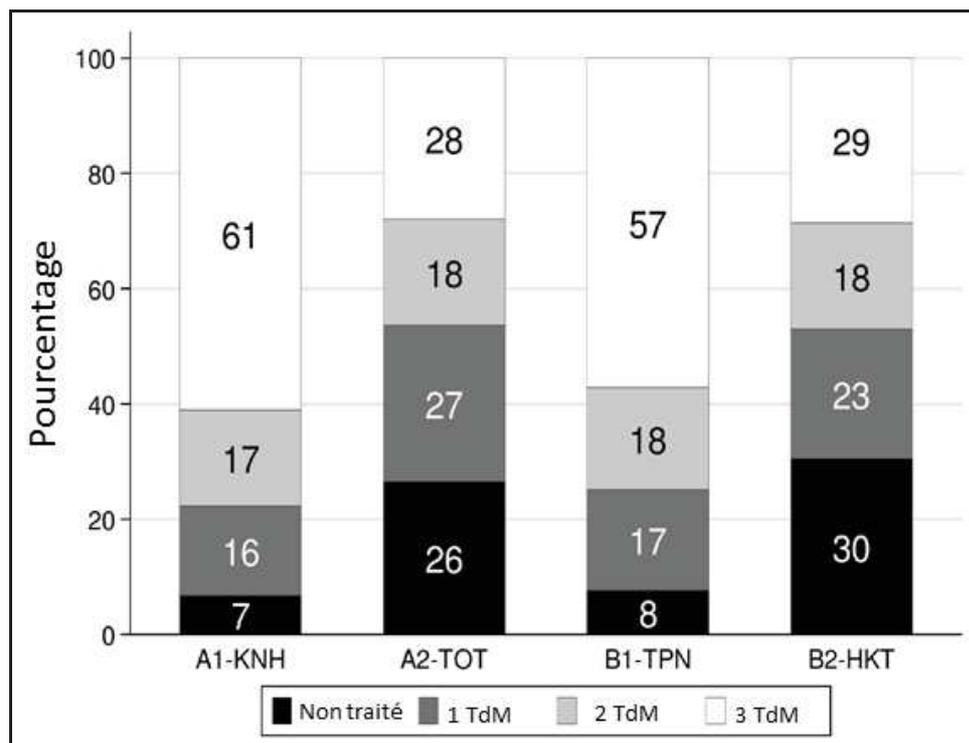
**Tableau 21. Résultats du modèle de l'intensité de la transmission en fonction du traitement de masse pour *P. vivax*.**

Variable	Catégorie	RR	IC95%	p-value
Village	HKT (référence)	1	-	-
	KNH	0.76	0.25 - 2.33	0.634
	TOT	0.48	0.2 - 1.14	0.097
	TPN	0.41	0.18 - 0.93	0.034
Période	Avant (référence)	1	-	-
	Pendant	0.17	0.04 - 0.85	0.031
	Après	0.88	0.33 - 2.33	0.802
TPH (nb. piqûres/personne/mois)	0 – 150 (référence)	1	-	-
	150 - 300	3.57	0.92 - 13.9	0.066
	> 300	23.76	8.09 - 69.83	< 0.0001

IC : intervalle de confiance, RR : risque relatif, TPH : taux de piqûre humain.

## **B. TAUX DE COUVERTURE ET EFFET PROPHYLACTIQUE POST-TRAITEMENT DE LA PIPERAQUINE**

Le taux de couverture du TdM a été globalement très élevé. A KNH et à TPN, >90% des résidents ont reçu au moins une fois le TdM. A HKT et à TOT, ce chiffre est de 70% et 74% respectivement. La proportion de participants qui a reçu 1 ou 2 fois le traitement est stable en fonction du village (16-27% des résidents ont reçu 1 fois le traitement et 17-18% des résidents ont reçu 2 fois le traitement). La proportion de participants qui a reçu 3 fois le traitement varie entre 28% et 61% à TOT et à KNH respectivement (**Figure XXXI**).



**Figure XXXI. Taux de couverture du TdM en fonction du village et du nombre de participations.**

Le TdM a été administré trois fois à un mois d'intervalle. Chaque participant peut recevoir une, deux ou trois fois le protocole thérapeutique complet dihydroartémisinine-pipéraquline + primaquine faible dose.

Il n'a pas été possible d'analyser quantitativement la contribution du taux de couverture et de l'EPPT de la pipéraquline à l'impact du TdM sur l'intensité de la transmission. En effet, la détection de moustiques infectés est exceptionnelle pendant le TdM (1/55 et 2/55 mesures pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement) et la couverture du TdM associée à ces mesures est systématiquement <80%. Le nombre d'évènement est donc trop faible pour pouvoir analyser plus en détail la relation entre le taux de couverture et le TIE.

### **C. TRANSMISSION DE P. FALCIPARUM APRES LE TRAITEMENT DE MASSE**

A l'exception du village de HKT, des moustiques infectés par *P. falciparum* ont été détectés dans les trois autres villages à distance du TdM ( $\geq 7$  mois après l'intervention). Dans les villages de TPN et KNH, cette détection est sporadique (1/1515 et 1/7389 moustiques testés respectivement). A TOT, une transmission pérenne de *P. falciparum* a été détectée

après l'intervention, en particulier pendant les enquêtes 14-19 (3/20739 moustiques testés). A noter qu'en l'absence de réservoir sous-microscopique en période post-intervention, la présence de moustiques infectés par *P. falciparum* est systématiquement associée à la présence de cas cliniques incidents dans la population (incidence >0). Cependant le nombre d'observations est très faible et ne permet pas de réaliser des analyses statistiques détaillées. Plusieurs facteurs expliquent la survenue d'une épidémie de *P. falciparum* en période post-intervention à TOT : le faible taux de couverture qui n'a pas permis d'éliminer entièrement le réservoir, le mauvais fonctionnement du poste palu (semaines d'inactivité et/ou mauvaise observance des habitants) et l'abondance exceptionnelle de vecteurs (**Tableau 22**).

**Tableau 22. Indicateurs de fonctionnement du poste palu en fonction du village pendant l'étude.**

Indicateur de fonctionnement du poste palu	Valeur pour le village indiqué			
	KNH	TOT	TPN	HKT
Nb. total de consultations (résidents)	575	770	513	1496
Nb. total de cas symptomatiques incidents de paludisme à <i>P. falciparum</i> diagnostiqués et traités (résidents)	6	89	9	8
Nb. total de cas symptomatiques incidents de paludisme à <i>P. vivax</i> diagnostiqués et traités (résidents)	81	139	47	191
Nb. total de consultations (visiteurs)	465	390	192	1242
Nb. total de cas symptomatiques incidents de paludisme à <i>P. falciparum</i> diagnostiqués et traités (visiteurs)	11	66	4	20
Nb. total de cas symptomatiques incidents de paludisme à <i>P. vivax</i> diagnostiqués et traités (visiteurs)	52	67	11	277
Nombre total de semaines d'inactivité du poste palu	6	17	5	4
Nombre moyen de consultations pour 100 habitants	3.2	2.0	2.0	3.8

## VII. DISCUSSION

---

### A. OBJECTIFS, PRINCIPAUX RESULTATS ET LIMITES DE CETTE ETUDE

Cette thèse s'inscrit dans une étude pilote visant à évaluer l'efficacité, la sécurité, la faisabilité et l'acceptabilité d'une intervention dont le but est d'éliminer *P. falciparum* et en particulier les souches résistantes à l'artémisinine. L'objectif primaire de ce travail était de mesurer l'impact du TdM sur les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme. Les objectifs secondaires visaient à mieux caractériser le contexte entomologique de la transmission du paludisme le long de la ZTTM.

Le résultat le plus marquant de cette étude est la forte corrélation observée entre l'infectivité des vecteurs et la prévalence de l'infection asymptomatique (généralement sous-microscopique). Lorsque le réservoir sous-microscopique de parasite est éliminé par le TdM, l'infectivité des vecteurs diminue drastiquement. Le TdM permet d'interrompre durablement le cycle de transmission de *P. falciparum* lorsque la couverture est suffisante. Par ailleurs nous confirmons l'importance de la transmission résiduelle et nous soulignons les limites des outils actuels de LAV (moustiquaires et pulvérisation intra-domiciliaire) pour contrôler des populations de vecteurs préférentiellement exophagiques et/ou zoophiliques. La détection de la résistance aux pyréthroïdes dans des populations sauvages de vecteurs constitue un obstacle supplémentaire pour leur contrôle.

La ZTTM est marquée par la guerre civile depuis plus de 30 ans. Cela rend l'accès aux communautés et aux sites d'études très compliqué. Très peu d'études entomologiques ont été réalisées dans la zone en particulier du côté birman de la frontière. Ce travail a été rendu possible du fait de la relation de confiance entre les communautés et le SMRU, qui est implanté dans la zone depuis les années 80. L'engagement et la participation active des membres de la communauté ont été indispensables au bon déroulement de cette étude. A ces difficultés contextuelles s'ajoutent des problématiques spécifiques à l'épidémiologie du paludisme. Dans cette zone de faible endémicité, la transmission est relativement faible, saisonnière et hétérogène, ce qui rend le monitoring des indicateurs entomologiques de la transmission particulièrement difficile. La principale limite de cette étude est le taux

d'infection des populations anophéliennes qui est en moyenne très faible (106 moustiques infectés / 57474 testés). Cela a nécessité (i) de mettre au point des techniques de détection sensibles et spécifiques et d'analyser un très grand nombre d'échantillons et (ii) de mettre en place un suivi longitudinal rapproché (cinq nuits de capture consécutives par mois sur 24 mois) dans un grand nombre de sites (six sites par village) afin de s'affranchir de l'hétérogénéité temporelle et spatiale et de collecter un nombre suffisant de moustiques. Une autre limite de cette étude est de ne pas avoir organisé de collections à l'extérieur du village (fermes, forêt). Cela aurait permis de documenter le contexte entomologique et de mesurer l'effet du TdM dans ces sites potentiels de transmission.

## **B. APPORT DE NOTRE ETUDE POUR COMPRENDRE L'EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME DANS LA ZONE**

### **1. Les systèmes vectoriels en présence du côté birman de la frontière**

#### **a) Les vecteurs impliqués dans la transmission**

La définition précise du statut vectoriel d'une espèce d'anophèles est difficile et repose sur la conjonction de différents arguments entomologiques et clinico-épidémiologiques. Plusieurs facteurs rendent la définition du statut vectoriel particulièrement difficile dans la zone : les complexes d'espèces jumelles, les faibles taux d'infections, les faibles charges parasitaires, l'hétérogénéité du risque d'exposition et les difficultés d'établir une corrélation entre les indicateurs entomologiques et clinico-épidémiologiques (Trung et al., 2004).

Nous rapportons la présence d'au moins 30 espèces d'anophèles appartenant à 12 groupes ou complexes d'espèces. Le vecteur dominant dans cette étude est *An. minimus* (s.l.) avec un TIE de 8.5 piqûres infectantes/personne/an. Cette espèce est abondante et entretient une transmission pérenne de *P. falciparum* et *P. vivax* tout au long de l'année. *Anopheles maculatus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) sont moins abondants que *An. minimus* (s.l.). Ils sont surtout collectés pendant la saison des pluies. Leur taux d'infection est similaire et ils sont compétents pour *P. falciparum* et *P. vivax*. Par conséquent, le TIE est de 1.0 (0.5-1.8) et 0.4 (0.1-1.0) piqûre infectante/personne/an pour *An. maculatus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) respectivement. Ces deux espèces sont responsables d'un pic de transmission pendant la saison des pluies. Somboon et

*al.* ont rapporté des résultats très similaires du côté thaïlandais de la frontière (Somboon et al., 1998, Somboon, 1993). A noter que le rôle de *An. dirus* (*s.l.*) est peut-être sous-estimé du fait des horaires et des sites de collection. Bien que son taux de piqûre soit relativement élevé, le taux d'infection de *An. barbirostris* (*s.l.*) est moindre. Cela s'explique probablement par le fort taux de zoophagie observé chez cette espèce qui limite le nombre de repas sanguins pris sur un hôte humain infectant et donc la probabilité de s'infecter avec plasmodium ou de transmettre le parasite (Cohuet et al., 2010). A noter que cette espèce n'a été retrouvée infectée que par *P. vivax*. Ce résultat est concordant avec la littérature existante (Somboon, 1993, Rattanarithikul et al., 2006, Sriwichai et al., 2016b, Saeung, 2012, Thongsahuan et al., 2011). Cependant la taille de l'échantillon est faible et ne permet pas d'exclure la possibilité que *An. barbirostris* (*s.l.*) soit compétent pour *P. falciparum* dans la zone. Aucun spécimen des groupes Annularis, Subpictus et Aconitus n'a été retrouvé infecté mais l'effectif testé est faible et ne permet pas d'exclure leur contribution à la transmission. Néanmoins, la faible abondance de ces espèces suggère que leur rôle vectoriel est moindre. Nous avons démontré que la transmission a lieu dans le village, cependant l'importance des sites hors du village (fermes, forêt) n'a pas été documentée et reste largement méconnue dans la zone.

## **b) Importance de la transmission « résiduelle »**

La transmission résiduelle est définie comme la transmission qui n'est pas prévenue par la couverture universelle avec des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action et/ou la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides (Killeen, 2014). La transmission résiduelle est déterminée par le comportement trophique des vecteurs notamment (i) l'évitement (naturel ou induit par les insecticides) du contact avec les surfaces traitées, (ii) la prise du repas sanguin à l'extérieur des habitations (exophagie), (iii) la prise du repas sanguin sur un hôte animal non-humain (zoophagie) et (iv) le repos à l'extérieur des habitations (exophilie). L'importance de la transmission résiduelle dans la zone d'étude est connue depuis longtemps (Nosten et al., 1987, Luxemburger et al., 1996, Dolan et al., 1993, Smithuis et al., 2013a, Smithuis et al., 2013b, Somboon, 1993, Durnez et al., 2013, Killeen, 2014). A noter que la transmission résiduelle a été particulièrement bien caractérisée par Somboon *et al.* (Somboon, 1993) dans un contexte épidémiologique très similaire (villages Karen du côté thaïlandais de la frontière).

Nous rapportons que seulement 36% des piqûres infectantes ont lieu à l'intérieur des habitations entre 21h et 05h. Or les vecteurs sont déjà actifs à 18h et/ou encore actifs à 06h. Par conséquent, la transmission s'étend probablement au-delà des heures de capture et l'importance de la transmission résiduelle est certainement sous-estimée. Ce résultat contraste avec les valeurs publiées par Somboon *et al.* (Somboon, 1993). Les auteurs ont estimé la part de l'exposition prévenue par l'usage des moustiquaires. Celle-ci était de 75% pour *An. minimus* (s.l.) et *An. dirus* (s.l.) et variait entre 38 et 60% pour *An. maculatus* (s.l.) en fonction du site de collection et de l'espèce jumelle. Les raisons qui expliquent ces différences ne sont pas évidentes. Cela illustre la difficulté liée à l'hétérogénéité du comportement des vecteurs en ASE et l'importance des études entomologiques pour caractériser le contexte de la transmission localement (Trung et al., 2005). A titre de comparaison, la même figure avec les vecteurs africains montre que les moustiquaires imprégnées préviennent plus de 90% des piqûres (Killeen, 2014). Les chiffres mentionnés dans ce paragraphe sont calculés en faisant l'assomption d'une couverture universelle, d'un usage systématique des moustiquaires par l'ensemble de la population et d'une efficacité optimale des moustiquaires (intégrité parfaite et absence de résistance aux insecticides). Tous ces facteurs diminuent probablement l'efficacité théorique (déjà très faible) des moustiquaires en conditions réelles d'utilisation (Noukpo et al., 2016, Churcher et al., 2016, Moore et al., 2008, Gryseels et al., 2015a). Ce résultat est particulièrement important et explique l'impact marginal des moustiquaires sur les indicateurs clinico-épidémiologiques du paludisme dans la zone d'étude (Carrara et al., 2013, Nosten et al., 2000, Dolan et al., 1993, Smithuis et al., 2013a, Smithuis et al., 2013b, Luxemburger et al., 1994, Somboon et al., 1995). Il doit être pris en compte par les instances décisionnelles qui définissent les stratégies d'élimination afin d'optimiser l'impact des programmes mis en œuvre (Drake et al., 2015).

Le taux de zoophagie est également une caractéristique importante de la transmission résiduelle dans la zone. En effet, c'est un déterminant majeur de la capacité vectorielle (Ayala and Coluzzi, 2005, Cohuet et al., 2010) et de l'impact des stratégies de lutte anti-vectorielle (Waite et al., 2017). Dans cette étude, le seul vecteur véritablement anthropophagique est *An. dirus* (s.l.). *Anopheles minimus* (s.l.) est « opportuniste » et ne semble pas avoir de préférence dans le choix de l'hôte. *Anopheles maculatus* (s.l.) et *An. barbirostris* (s.l.) sont préférentiellement zoophagiques. Ces résultats sont concordants avec la littérature (Somboon,

1993, Sinka et al., 2011, Muenworn et al., 2009, Tainchum et al., 2014, Tananchai et al., 2012, Tisgratog et al., 2012). Le comportement trophique des vecteurs est influencé par des facteurs environnementaux, en particulier par la présence/absence de bétail, la taille des troupeaux et leur proximité avec les populations humaines (Stone et al., 2016, Sinka et al., 2011, Trung et al., 2005). Dans cette étude, il n'a pas été possible de caractériser précisément les facteurs environnementaux qui déterminent l'abondance et le comportement des vecteurs (faible nombre de villages et difficulté de collecter ces données). Par ailleurs, la structure précise des populations collectées sur sujet humain et appât animal n'est pas connue. Plus d'études sont nécessaires pour caractériser ces interactions complexes et optimiser les méthodes de LAV. A noter que Somboon *et al.* ont démontré que certaines espèces très zoophiliques sont compétentes pour plasmodium (Somboon, 1993). En l'absence de bétail (ou lorsque celui-ci devient inaccessible), ces espèces pourraient également contribuer à la transmission. Enfin, nous insistons sur le fait que le caractère opportuniste des vecteurs dans le choix de leur hôte est probablement un facteur important pour expliquer leur réfraction à l'effet des moustiquaires imprégnées (lorsque l'hôte humain est protégé, les vecteurs sont probablement déviés vers le bétail et ne sont pas affectés significativement par les moustiquaires). Cela explique l'absence d'effet des moustiquaires sur les populations anophéliennes (TPH, taux de parité et longévité des vecteurs) observé par Somboon *et al.* (Somboon, 1993, Somboon et al., 1995).

### **c) Intensité et dynamique de la transmission**

Dans cette étude, les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme ont été mesurés à l'intérieur de quatre villages *hotspots* dans le contexte d'une intervention (diagnostic et traitement précoce des cas symptomatiques, traitement de masse et moustiquaires imprégnées). Cette étude peut être analysée comme une cohorte de 40 personnes suivies pendant 2 ans pour laquelle le contexte entomologique a été documenté individuellement pendant 105 nuits.

Lorsque les valeurs moyennes des indicateurs entomologiques sont considérées, l'exposition aux piqûres de vecteurs est élevée (365 piqûres /personne/mois) et les taux d'infection des vecteurs sont très faibles (0.4‰ et 1.9‰ pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement). Les valeurs de TIE correspondantes sont intermédiaires, de 0.14 piqûre

infectante/personne/mois (1.68 piqûre infectante/personne/an) et de 0.68 piqûre infectante/personne/mois (8.16 piqûres infectantes/personne/an) pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement. Toutefois, ces valeurs moyennes masquent une hétérogénéité importante. Lorsqu'il est calculé par enquête et par site de collection, le TIE varie entre 0 et 3.1 piqûres infectantes/personne/mois pour *P. falciparum* et entre 0 et 9.8 piqûres infectantes/personne/mois pour *P. vivax*. A l'échelle de l'individu, 20% des personnes concentrent 60% des piqûres infectantes et le TIE moyen varie entre 0 et 58 piqûres infectantes/personne/an. Les résultats obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux qui étaient attendus (<1 piqûre infectante/personne/an pour *P. falciparum*) (Imwong et al., 2011). Ces résultats sont concordants avec le fait que ces villages sont des *hotspots* (forte prévalence de l'infection asymptomatique) : l'intensité de la transmission justifie d'un degré de prémunition suffisant pour que l'infection soit asymptomatique. L'hétérogénéité de la transmission est également un élément important car elle favorise le développement de l'immunité chez les personnes les plus exposées.

Sur le plan des limitations, les valeurs moyennes des taux d'infection et de l'intensité de la transmission ont été sous-estimés pour deux raisons : d'une part du fait des performances analytiques de la technique de détection utilisée en première intention et d'autre part du fait de l'intervention. Concernant la détection du parasite, la sensibilité de la technique de PCR utilisée est de 60 et 36 sporozoïtes par moustique pour *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement. Au-delà de cette limite, la distribution de la matrice d'ADN dans les tubes réactionnels est plus aléatoire et le résultat de l'analyse peut être faussement négatif (un moustique faiblement infecté peut sortir 0/3, 1/3 ou 2/3 en PCR). De plus, l'intervention a diminué le taux d'infection des vecteurs (en particulier pour *P. falciparum* car pour *P. vivax*, l'effet est transitoire), les valeurs moyennes d'IS et de TIE présentées dans cette étude sont donc inférieures à la situation basale, en l'absence d'intervention (Kwansomboon et al., 2017). A noter que l'utilisation de plusieurs méthodes de confirmation a permis d'assurer la spécificité du signal. Par ailleurs, d'importantes précautions ont été prises pour limiter le risque de contamination. Nous pensons donc que les taux d'infection n'ont pas été surestimés.

## 2. Contribution du réservoir sous-microscopique à la transmission

La contribution des porteurs asymptomatiques à la transmission et ses implications en matière d'élimination du paludisme sont discutées depuis des décennies (Yekutiél, 1960, Bousema et al., 2014, Lin et al., 2014, von Seidlein, 2014). En zone de forte transmission, le degré de prémunition est important. Environ 95% des infections sont asymptomatiques avec des niveaux de parasitémie élevés et contribuent de manière importante à la transmission (Yekutiél, 1960). Schneider *et al.* ont montré dans une étude longitudinale réalisée au Kenya, que les porteurs asymptomatiques et symptomatiques contribuent de manière équivalente à la transmission (Schneider et al., 2007). Dans une étude longitudinale réalisée sur une cohorte de 130 personnes représentatives de la population générale et asymptomatiques au Burkina Fasso, les auteurs ont montré que les porteurs sous-microscopiques représentent 28% du réservoir et 17% de la transmission (Ouedraogo et al., 2016, Ouédraogo et al., 2016).

En zone de faible endémicité, 85% des personnes qui ont une parasitémie au-dessus du seuil de détection de la microscopie sont symptomatiques (Yekutiél, 1960). La mise en évidence de porteurs asymptomatiques infectés avec des niveaux de parasitémie très faibles (souvent sous-microscopiques) est un cadre nosologique beaucoup plus récent (Hamad et al., 2000). La contribution relative du réservoir sous-microscopique par rapport aux cas symptomatiques n'est toujours pas tranchée (Lin et al., 2014). La relation entre les taux d'infection, la densité de l'infection et la gamétocytémie suit une relation sigmoïde : lorsque la gamétocytémie diminue, le taux d'infection des vecteurs et le nombre d'oocystes diminuent également (Jeffery and Eyles, 1955). Les porteurs symptomatiques ont donc un risque accru de transmettre le parasite au moustique par rapport aux porteurs sous-microscopiques. En revanche, les porteurs asymptomatiques sont plus nombreux que les personnes symptomatiques et la durée de l'infection est beaucoup plus longue (Imwong et al., 2015a, Imwong et al., 2015b, Ashley and White, 2014).

Les données obtenues en zone de faible transmission contrastent avec celles de l'Afrique mais la plupart des études sont limitées par leur caractère transversal ou par le manque de contrôle adapté. Au Cambodge, Lin *et al.* ont réalisé une mesure transversale de l'infectivité de 119 patients faisant un accès palustre simple à *P. falciparum*. Ils ont documenté une forte hétérogénéité des taux d'infection et des charges parasitaires dans les moustiques en fonction de la gamétocytémie. Cependant ils n'ont pas étudié l'infectivité des porteurs

asymptomatiques (Lin et al., 2015). Kiattibutr *et al.* ont étudié l'infectivité des porteurs asymptomatiques et symptomatiques de *P. vivax* en Thaïlande. Lors d'une mesure transversale, ils ont montré que 85% des patients symptomatiques sont infectants et que le taux d'infection est de 50% chez les moustiques. Au contraire, la proportion de patients asymptomatiques infectants était très faible (Kiattibutr et al., 2016). Dans une autre étude réalisée en Thaïlande, Coleman *et al.* ont montré que la proportion de personnes infectantes parmi les sujets asymptomatiques microscopiques est de 10% et que le taux d'infection des moustiques est de 45% (sans différence entre *P. falciparum* et *P. vivax* et sans différence entre les gamétocytemies patentes *versus* absence de gamétocytes sur le frottis sanguin). En parallèle ils ont montré que 1.2% de la population négative en microscopie est infectante et que le taux d'infection des vecteurs par cette population est de 3%. La limite majeure de cette étude est l'absence de techniques moléculaires pour confirmer l'infection sous-microscopique chez les patients négatifs en microscopie. Cette limite ne permet pas de mesurer spécifiquement l'infectivité du réservoir asymptomatique sous-microscopique (Coleman et al., 2004). Dans une étude réalisée en Colombie, Alves *et al.* ont montré que la proportion de moustiques qui s'infectent sur les porteurs asymptomatiques sous-microscopiques et sur les porteurs symptomatiques est de 1.2 et 22% respectivement (Alves et al., 2005). Les auteurs ont également montré que le nombre d'oocystes est en moyenne de 1 et 20 oocystes/tube digestif chez les moustiques infectés à partir des porteurs sous-microscopiques et symptomatiques respectivement.

Plus d'études sont nécessaires pour mesurer de manière longitudinale la transmissibilité du parasite chez les porteurs symptomatiques et asymptomatiques (Barnes and White, 2005). De plus, la relation entre l'infection asymptomatique et symptomatique complique la relation avec la transmission. En effet, l'histoire naturelle de l'infection asymptomatique sous-microscopique est mal connue et plus d'études longitudinales sont nécessaires pour décrire l'évolution des formes asymptomatiques dans le temps. Imwong *et al.* ont observé que la répartition des espèces plasmodiales, des marqueurs de résistance et de la distribution des cas dans la population (âge, sexe) est très similaire dans les populations asymptomatiques et symptomatiques, ce qui suggère un lien direct entre ces deux cadres nosologiques (Imwong et al., 2015a).

Dans notre étude, une forte corrélation a été observée entre le taux d'infectivité des vecteurs et la prévalence de l'infection sous-microscopique. Elle apporte une preuve supplémentaire pour montrer que le réservoir sous-microscopique doit être éliminé afin d'interrompre rapidement le cycle de transmission. Cependant, cette association n'est pas suffisante pour quantifier la contribution relative de la prévalence de l'infection asymptomatique (généralement sous-microscopique) et des cas incidents à la transmission homme-vecteur du parasite. Pour cela, il sera nécessaire de mesurer la transmissibilité du parasite lors de l'infection sous-microscopique de manière longitudinale, de décrire l'histoire naturelle de l'infection sous-microscopique (en particulier l'évolution vers les formes symptomatiques) et de réaliser un travail de modélisation mathématique plus poussé.

### **3. Déterminants entomologiques des résistances médicamenteuses**

Le développement des résistances médicamenteuses s'effectue en deux phases discrètes : l'émergence d'un clone du parasite *de novo* résistant et sa dissémination lorsque les parasites résiduels sont exposés à des concentrations sous-thérapeutiques du médicament, donnant ainsi un avantage sélectif pour la transmission au vecteur (White, 1999). L'émergence de parasites *de novo* résistant a lieu principalement chez l'hôte humain pendant la phase sanguine de l'infection. Plusieurs facteurs sont particulièrement importants notamment la pharmacologie des médicaments antipaludiques, l'immunité de l'hôte et des facteurs parasitologiques (White et al., 2009). La dissémination des résistances a fait l'objet d'une revue par Barnes et White (Barnes and White, 2005) mais les études de modélisation sont plus rares (Pongtavornpinyo et al., 2008). Les facteurs entomologiques sont particulièrement importants pendant la phase de dissémination mais ils sont peu documentés. Dans ce paragraphe, nous allons identifier des pistes de réflexion pour l'entomologie.

Le rôle de l'intensité de la transmission dans la dynamique des résistances a fait l'objet de plusieurs publications (Pongtavornpinyo et al., 2008, Talisuna et al., 2007, Artzy-Randrup et al., 2010). En zone de forte transmission, la majorité de la transmission a lieu par les porteurs asymptomatiques qui ne sont pas exposés aux traitements (94% des infections) (Pongtavornpinyo et al., 2008, Yekutiél, 1960). Le facteur déterminant pour la dissémination

des résistances est la proportion de la population qui a une concentration résiduelle sub-thérapeutique de médicaments. En zone de faible transmission, le degré de prémunition diminue : 85% des infections sont symptomatiques et généralement traitées (Yekutieli, 1960, Pongtavornpinyo et al., 2008). La proportion des cas symptomatiques qui sont traités est le principal facteur qui détermine la dissémination des résistances (Pongtavornpinyo et al., 2008). D'une manière générale, les modèles et les observations épidémiologiques convergent et s'accordent sur le fait que la dissémination des souches résistantes est plus rapide en zone de faible transmission (Pongtavornpinyo et al., 2008). En zone de faible transmission, une proportion plus importante des infections transmissibles est traitée et le degré de prémunition est moindre, ce qui augmente la probabilité d'échecs thérapeutiques.

Une spécificité du développement de plasmodium dans le vecteur anophélien par rapport à l'hôte vertébré est l'étape de reproduction sexuée qui permet des échanges génétiques entre différents clones par un mécanisme de recombinaison chromosomique pendant la méiose, soit homologue (Su et al., 1999, Samarakoon et al., 2011, Freitas-Junior et al., 2000), soit hétérologue (Hinterberg et al., 1994, Freitas-Junior et al., 2000). Ce mécanisme est essentiel pour assurer le bon déroulement de la ségrégation chromosomique pendant la méiose. Il permet aussi de générer de la diversité génétique en mélangeant les haplotypes et d'homogénéiser les allèles par un mécanisme de conversion génique (San Filippo et al., 2008, Chen et al., 2007). La recombinaison de différents génotypes nécessite la rencontre entre différents clones pendant la méiose. Cela est favorisé par la diversité clonale intra-hôte (Nair et al., 2014, Anderson et al., 2000) et par des facteurs entomologiques. Sur le plan entomologique, plusieurs éléments sont à considérer. Premièrement, lorsque la charge parasitaire est élevée (nombreux oocystes), cela favorise la probabilité de recombinaison entre différents clones. Dans notre étude, la majorité des échantillons ont une charge parasitaire très faible qui correspond à 1-2 oocystes. Seulement 5% des échantillons positifs ont une charge parasitaire élevée >10000 parasites (nombreux oocystes). Cette observation est concordante avec d'autres études réalisées dans la zone qui ont montré par microscopie que le nombre médian d'oocystes dans les populations sauvages d'anophèles est de 3-5 et qu'une minorité d'échantillons ont un nombre élevé d'oocystes (Sidavong et al., 2004, Rahman et al., 1993). Par ailleurs, nos données suggèrent des différences entre les vecteurs. Pour *An. dirus* (s.l.), la charge semble supérieure (mais la taille de l'échantillon est faible). Au

contraire, la charge parasitaire semble plus faible chez *An. maculatus* (s.l.) que chez les autres espèces vectrices. Nous suspectons que les charges parasitaires élevées reflètent probablement un repas infectant pris sur un hôte symptomatique. Plus d'études sont nécessaires afin de caractériser les modalités de la reproduction sexuée du parasite ainsi que la contribution des échanges génétiques entre différents clones pour comprendre l'évolution du paludisme dans la zone.

Un autre aspect de la biologie des vecteurs qui pourrait favoriser la rencontre de différents clones pendant la méiose est le phénomène des repas sanguins multiples au cours d'un même cycle gonotrophique. Le phénomène est connu depuis longtemps lorsqu'il s'agit de deux types d'hôtes différents (ex. homme et bétail). Des méthodes plus sophistiquées sont nécessaires pour documenter ce phénomène lorsqu'il s'agit de repas sanguins multiples pris sur le même type d'hôtes (ex. humain-humain). A notre connaissance, les premiers à avoir mentionné ce phénomène sont Boreham *et al.* en 1973 (Boreham and Garrett-Jones, 1973) avant de le démontrer formellement en 1979. Les auteurs ont utilisé le phénotypage de l'haptoglobine comme marqueur polymorphique permettant de distinguer le sang de deux hôtes humains différents dans un moustique (Boreham *et al.*, 1979). Depuis, d'autres études ont été réalisées et ce phénomène a été observé chez plusieurs genres de moustiques et chez plusieurs espèces d'anophèles (peu de données sont issues d'ASE). Les repas sanguins multiples ont peut-être un rôle important pour expliquer la fréquence de recombinaison entre un parasite résistant importé et des souches locales sensibles, favorisant ainsi la dispersion des résistances.

L'apport de l'entomologie pour comprendre la dynamique de l'émergence et de la dissémination des résistances médicamenteuses chez *P. falciparum* est donc majeur. Ce champ de l'épidémiologie du paludisme a été très peu étudié. Plus d'études sont nécessaires pour caractériser ces mécanismes.

## **C. IMPACT DE L'INTERVENTION SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME**

L'intervention mise en œuvre dans cette étude pilote pour éliminer et interrompre la transmission des souches de *P. falciparum* résistantes aux artémisinines a consisté à (i) diagnostiquer et traiter précocement les cas symptomatiques incidents (DTP), (ii) administrer

un traitement de masse à l'ensemble de la communauté (TdM) et (iii) saturer la couverture en moustiquaires imprégnées à longue durée d'action. La mise en place d'une surveillance entomologique a permis de monitorer l'infectivité des vecteurs et l'intensité de la transmission dans le contexte de l'intervention.

## **1. Le traitement de masse**

### **a) Accélérateur de l'élimination**

Nous avons démontré que le TdM diminue fortement et rapidement l'infectivité des vecteurs (IS) et donc l'intensité de la transmission (TIE). Pour *P. falciparum*, l'impact du TdM sur la transmission perdure après l'intervention. Pour *P. vivax*, il est transitoire : les indicateurs entomologiques de la transmission retrouvent rapidement leurs valeurs initiales lorsque l'EPPT de pipéraquline disparaît. L'impact de l'intervention sur *P. falciparum* est également reflété par la mesure du rapport Pf/Pv dans la population anophélienne. Il est passé de 0.62 (13/21) avant et pendant le TdM à 0.07 (5/68) après le TdM. Malgré le caractère pilote de l'étude et le faible nombre de villages inclus, des différences ont été mises en évidence. Le taux de couverture du TdM et le bon fonctionnement du poste palu sont des facteurs essentiels à la réussite de l'intervention. Cela montre l'importance de l'engagement communautaire. Une abondance importante de vecteurs en période post-élimination a également été associée à un risque accru d'épidémie lorsque le taux de couverture du TdM et le fonctionnement du poste palu sont médiocres (cas du village de TOT).

### **b) Considérations pharmacologiques**

Le protocole thérapeutique utilisé dans le protocole Mahidol-Oxford du TdM repose sur l'association du traitement combiné dihydroartémisinine-pipéraquline et de la primaquine en dose unique à faible posologie. Plusieurs considérations pharmacologiques sont à prendre en compte pour expliquer l'effet du TdM sur la transmission. Outre l'efficacité intrinsèque du traitement sur les souches résistantes du parasite (prérequis indispensable), l'impact du TdM s'explique par deux propriétés du traitement : l'effet sur les gamétocytes et l'effet prophylactique post-traitement (EPPT). Nous avons vu en introduction que le traitement combiné dihydroartémisinine-pipéraquline est le seul CTA épargné par les résistances médicamenteuses à la molécule partenaire dans la zone. Le taux de guérison de 100% a été

confirmé dans cette étude (Landier et al., 2017). L'effet des CTA et de la primaquine à faible dose sur les gamétocytes et la transmissibilité de *P. falciparum* a été détaillé en introduction. L'importance de l'EPPT dans le cadre du TdM et de l'interruption de la transmission a été suggéré par des travaux de modélisation (Gerardin et al., 2015). Dans le cas du protocole Mahidol-Oxford, les participants reçoivent le TdM trois fois à un mois d'intervalle afin de prévenir toute réinfection pendant trois mois dans la population cible. Etant donnée la durée de vie du moustique (3-4 semaines au laboratoire et 10-15 jours dans la nature), cela permet d'interrompre le contact parasite-vecteur pendant 3-9 générations et donc d'interrompre le cycle de transmission. Cependant, les résultats présentés dans cette étude n'ont pas permis de mesurer la contribution de l'EPPT de la pipéraquline à l'interruption de la transmission. L'effet transitoire sur *P. vivax* était attendu car le TdM ne permet pas d'éliminer les hypnozoïtes qui sont responsables de rechutes dès lors que la concentration sanguine de la pipéraquline diminue (30 jours après le traitement). Il renforce l'idée que le TdM est efficace pour interrompre la transmission de *P. falciparum*.

### **c) Résistances médicamenteuses**

Des travaux récents réalisés dans la zone d'étude ont montré que le TdM n'était pas associé à une aggravation des résistances médicamenteuses (Malaria Elimination Task Force, 2017). Au contraire, la proportion de parasites ayant une mutation du marqueur kelch13 de la résistance à l'artémisinine a légèrement diminuée et aucune résistance à la pipéraquline n'a été détectée (Malaria Elimination Task Force, 2017, Landier et al., 2017). Cela était prévisible du fait de la faible charge parasitaire dans les porteurs asymptomatiques et du taux d'efficacité de 100% du CTA utilisé (White, 2017). Sur le long terme, la diminution de l'incidence du paludisme diminue également ce risque car les porteurs symptomatiques sont la principale source de parasites *de novo* résistants (White, 2017, White et al., 2009).

## **2. Le poste palu**

Une originalité majeure du protocole Mahidol-Oxford d'EMC est le concept de poste palu (dispensaire animé par des agents de santé publique communautaires). Le rôle du malaria poste est de permettre un accès « universel » au DTP afin de traiter les cas symptomatiques incidents. Du fait du faible nombre de villages inclus dans cette étude pilote, de la conception

de l'étude et du faible taux d'infection pour *P. falciparum*, il n'a pas été possible de décomposer l'effet du poste palu de celui du TdM. A noter que dans l'étude de Nosten *et al.*, l'accès au DTP et l'introduction d'une CTA efficace en première ligne de traitement se sont traduits par une diminution rapide du taux d'infection des vecteurs dans le camp de réfugiés de Maela (Nosten *et al.*, 2000). La mise en place d'un poste palu ne semble pas suffisante dans ces villages *hotspots* (où la prévalence de l'infection asymptomatique est élevée). En effet, des moustiques infectés par *P. falciparum* ont été détectés pendant les 9 premiers mois de l'étude dans les villages du groupe B (qui n'avaient pas encore reçu le TdM). Cette observation montre que le seul recours au DTP ne permet pas d'interrompre rapidement le cycle de transmission de *P. falciparum* lorsque la prévalence de l'infection asymptomatique est élevée. Cela a été confirmé en modélisant l'incidence clinique du paludisme en fonction du temps d'ouverture du poste palu dans une quarantaine de villages *hotspots* : l'interruption de la transmission avec le DTP seul prendrait 42 semaines (Malaria Elimination Task Force, 2017). Dans le contexte de l'élimination (urgence), le TdM est donc un outil indispensable pour éliminer rapidement *P. falciparum* avant l'aggravation des résistances médicamenteuses. Le poste palu est particulièrement important après le TdM afin de maintenir la transmission à un niveau nul. En effet, le TdM est une intervention ponctuelle dont l'effet n'est pas rémanent dans le temps. Le parasite peut être réintroduit après le TdM et la transmission peut repartir sous forme d'épidémie. A noter que le réseau de poste palu est aussi un outil indispensable pour monitorer l'effet de l'intervention et savoir où le parasite a été éliminé (dans le cadre de la mise à grande échelle du programme d'élimination).

### **3. Les moustiquaires**

Enfin, l'effet des moustiquaires a probablement été marginal dans cette étude du fait de l'importance de la transmission résiduelle dans la zone. Les données accumulées pendant ces trente dernières années (Dolan *et al.*, 1993, Smithuis *et al.*, 2013a, Smithuis *et al.*, 2013b, Luxemburger *et al.*, 1994, Nosten *et al.*, 2000, Somboon, 1993, Somboon *et al.*, 1995, Somboon *et al.*, 1998, Killeen, 2014) et celles qui sont présentées dans cette étude montrent clairement que les stratégies actuelles ne sont pas suffisantes dans cette zone où la transmission « résiduelle » représente plus de 65% du total des piqûres infectantes.

## **D. PERSPECTIVES ET PISTES DE REFLEXION POUR LA SUITE DU PROGRAMME D'ELIMINATION**

### **1. La mise en œuvre d'une surveillance à grande échelle pour documenter l'élimination**

Une limite des études entomologiques destinées à monitorer la transmission du paludisme est le caractère laborieux de l'analyse des échantillons collectés. A titre d'exemple, le suivi longitudinal de quatre villages dans cette étude aura consisté à collecter plus de 500000 moustiques, de conditionner individuellement et d'identifier 129217 anophèles, de couper en deux et d'extraire l'ADN de 57474 spécimens, de réaliser plus de 12000 qPCR de plasmodium, 2391 PCR d'espèces jumelles et 90 tests phénotypiques de sensibilité aux insecticides (7302 spécimens phénotypés). L'ensemble de cette étude a nécessité quatre ans de travail. Depuis la mise à grande échelle du programme d'élimination, le TdM a été administré dans une trentaine de villages *hotspots* et un poste palu a été mis en place dans plus de 1200 villages (Malaria Elimination Task Force, 2017). La mise en place d'une surveillance à grande échelle est limitée par l'absence de techniques d'analyse à haut-débit et par la nécessité de multiplier les points de collection du fait de l'hétérogénéité de la transmission dans la zone. Les pistes de recherche incluent le développement de pièges pour permettre de collecter un grand nombre de vecteurs et multiplier le nombre de points de collection (Hiscox et al., 2016, Govella et al., 2016, Hawkes et al., 2017, Matowo et al., 2013, Matowo et al., 2016, Sithiprasasna et al., 2004). Cependant, cette approche est très compliquée du fait des difficultés logistiques dans la zone (villages difficiles d'accès, pas d'électricité). Les autres pistes sont d'optimiser encore les techniques de détection pour les rendre plus sensibles, spécifiques et moins laborieuses. La mise au point de nouvelles techniques de PCR ciblant une séquence répétée un très grand nombre de fois (Hofmann et al., 2015) ou l'analyse des échantillons par MALDI-TOF (Laroche et al., 2017) sont des approches intéressantes. Concernant les espèces jumelles et l'identification des vecteurs en général, la technologie de MALDI-TOF est également très intéressante (Dieme et al., 2014, Laroche et al., 2017, Nebbak et al., 2017). Le développement de nouvelles techniques de PCR en particulier des approches multiplexes en temps réel permettraient également d'augmenter le débit de l'analyse. Enfin, le monitoring à grande échelle de la résistance aux insecticides

nécessiterait d'identifier des marqueurs moléculaires afin de s'affranchir des tests phénotypiques. En effet, ces tests sont lourds à mettre en œuvre et nécessitent de conserver des spécimens vivants, ce qui est souvent impossible dans la zone du fait des difficultés d'accéder aux sites de collection.

## **2. La lutte anti-vectorielle et le contrôle de la transmission résiduelle**

### **a) La place de la LAV dans le contexte de l'élimination**

Avant de se pencher plus en détails sur les stratégies envisageables, il est important de définir la place de la LAV dans le programme d'élimination. Dans le cadre de l'élimination de *P. falciparum*, le développement d'outils complémentaires permettant de contrôler efficacement la transmission résiduelle serait intéressant dans deux cas : (i) pour potentialiser l'effet des stratégies éliminant le réservoir sous-microscopique (en ciblant à la fois l'infectivité des vecteurs et le contact homme-vecteur) et (ii) pour contrôler les épidémies post-élimination en cas de réintroduction du parasite. Dans la période de post-élimination, il sera important de définir à partir de quand les investissements en matière de la lutte anti-vectorielle pourront-être relâchés. En effet, un aspect central de l'élimination est la maintenance du réseau de surveillance et d'accès universel au DTP (postes palu). L'apport de l'entomologie est majeur dans ce cadre afin d'orienter l'allocation des ressources financières par les programmes nationaux.

### **b) Les difficultés d'évaluer la LAV dans la zone**

En zone de faible transmission (et en période de post-élimination), l'évaluation de l'impact de la LAV sur la transmission est particulièrement difficile car les taux d'infections et les indicateurs clinico-épidémiologiques (prévalence et incidence) sont souvent nuls ou à des valeurs très faibles. A noter que dans le cas de *P. vivax*, l'évaluation est encore plus compliquée car la majorité des cas sont des rechutes (réactivation des hypnozoïtes) et ne sont pas liés à de nouvelles piqûres infectantes. Dans la zone, les seuls indicateurs disponibles sont donc entomologiques ou sérologiques. Sur le plan entomologique, il est possible de mesurer le contact homme-vecteur, la capacité vectorielle. Sur le plan sérologique, le marqueur SG6-P1 permet de mesurer l'exposition aux piqûres d'anophèles (Remoue et al., 2006, Cornélie et al.,

2007, Poinsignon et al., 2008, Poinsignon et al., 2009). Initialement développé en Afrique, ce marqueur a été validé sur *An. gambiae* (Poinsignon et al., 2008, Poinsignon et al., 2009) et *An. funestus* (Poinsignon et al., 2010). Ce marqueur a fait l'objet d'études plus récentes en zone de faible transmission notamment en Afrique (Poinsignon et al., 2009, Sagna et al., 2013), en Amérique du Sud (Londono-Renteria et al., 2015) et plus récemment le long de la ZTTM (Ya-Umpham et al., 2017). La réponse immunitaire à médiation humorale contre le peptide SG6-P1 est labile. Elle permet de mesurer des variations d'exposition lors du suivi longitudinal d'une cohorte. Ce marqueur a été utilisé pour évaluer des stratégies de LAV (Drame et al., 2010, Brosseau et al., 2012, Drame et al., 2013, Noukpo et al., 2016). Les limites sont la proportion importante de non-répondeurs, la variabilité de la mesure entre différents individus et le phénomène de désensibilisation (*i.e.* disparition des anticorps à la suite d'une exposition intense et prolongée) (Ya-Umpham et al., 2017). Plus d'études sont nécessaires afin de mieux caractériser la réponse et éventuellement rechercher des marqueurs spécifiques d'espèces.

### **c) Les stratégies**

Certains vecteurs sont fréquemment collectés sur appât animal, en particulier *An. maculatus* (*s.l.*), *An. minimus* (*s.l.*) et *An. barbirostris* (*s.l.*). La mise en place d'interventions ciblant les vecteurs zoophagiques permettrait de diminuer la densité et la longévité des vecteurs (et donc la capacité vectorielle). Dans un travail de modélisation, Waite *et al.* ont montré l'importance de cibler les vecteurs zoophiles pour diminuer la transmission en zone de faible endémicité (Waite et al., 2017). Plusieurs stratégies sont envisageables : application topique d'insecticides (Franco et al., 2014, Chaccour and Killeen, 2016), traitement par des endectocides (tels que l'ivermectine) (Poche et al., 2015, Franco et al., 2014, Chaccour and Killeen, 2016) et l'utilisation de moustiquaires ouvertes imprégnées d'insecticide (Maia et al., 2012). Cependant, le risque de dévier des espèces habituellement zoophagiques vers l'hôte humain pourrait entraîner un effet délétère de zoopotentialisation (Chaccour and Killeen, 2016, Donnelly et al., 2015). Dans ce cadre, les insecticides non irritants et non répulsifs sont intéressants (*ex.* carbamates, organophosphates). Ils pourraient constituer une alternative aux pyrethroïdes en zone de résistance.

Sur le plan de la protection personnelle, plusieurs outils sont disponibles notamment les répulsifs cutanés ainsi que les hamacs et vêtements imprégnés d'insecticide. Concernant les répulsifs cutanés, la recherche de composés de synthèse a commencé dès les années 1930 et depuis plusieurs familles chimiques ont été identifiées (Paluch et al., 2010). Des substances d'origine naturelle sont également utilisées (ex. le tanaka) (Maia and Moore, 2011, Lindsay et al., 1998). Plusieurs études de phase II ont rapporté un effet important des molécules telles que le diethyl-toluamide (DEET) ou la picaridine (Costantini et al., 2004, Van Roey et al., 2014). Sur la ZTTM, Lindsay *et al.* ont rapporté un effet prometteur contre les piqûres de *An. minimus* (*s.l.*) et *An. maculatus* (*s.l.*) (Lindsay et al., 1998). A noter que dans une autre étude, les auteurs ont rapporté un fort niveau de résistance comportementale chez *An. barbirostris* (*s.l.*) (Van Roey et al., 2014). Malheureusement, les études échouent à démontrer l'effet des répulsifs cutanés sur les indicateurs clinico-épidémiologiques lors des études de phase III (Lindsay et al., 1998, Sluydts et al., 2016). De plus, les répulsifs sont responsables d'effets secondaires et leur mésusage peut entraîner des intoxications parfois sévères (Webb and Hess, 2016, Heng et al., 2017). L'utilisation réelle et l'acceptabilité sont également une limite importante de cette stratégie (Gryseels et al., 2015b, Sluydts et al., 2016). Une utilisation alternative des répulsifs est leur diffusion spatiale, passive ou active (Achee et al., 2012). Des pyrethroïdes fluorés à faible tension de vapeur ont été utilisés mais plus d'études sont nécessaires pour évaluer cet outil relativement nouveau (Sangoro et al., 2014, Charlwood et al., 2016, Maia et al., 2016, Ponlawat et al., 2016, Kawada et al., 2005, Syafruddin et al., 2014). Concernant les hamacs imprégnés, ils sont souvent bien acceptés par les populations locales en particulier lorsque les personnes doivent séjourner à l'extérieur des villages (ferme, forêt) (Moore et al., 2008, Sochantha et al., 2010, Grietens et al., 2012). Cependant ces outils présentent les mêmes limites que les moustiquaires imprégnées en ne protégeant pas de l'exposition diurne. Concernant les vêtements, les résultats sont souvent contradictoires et l'évaluation est particulièrement compliquée (Banks et al., 2014). Cette stratégie est probablement limitée par son efficacité et son acceptabilité en condition réelle d'utilisation.

Les habitats larvaires sont fractionnés, très divers et souvent peu accessibles dans la zone (Kankaew et al., 2005, Sinka et al., 2011). Pour ces raisons, la gestion environnementale et la lutte anti-larvaire est compliquée. L'utilisation de granules de Bti serait l'approche de première intention du fait de sa faible toxicité sur les organismes non ciblés. Enfin, l'utilisation

de pièges avec des appâts sucrés toxiques a également été proposée par certains auteurs mais plus d'études sont nécessaires pour documenter leur efficacité et leur faisabilité sur la ZTTM (Beier et al., 2012, Muller and Schlein, 2008, Muller et al., 2010, Qualls et al., 2014, Qualls et al., 2015, Revay et al., 2015, Zhu et al., 2015).

#### **d) Les résistances aux insecticides**

Ce travail a permis de détecter des résistances aux pyrethroïdes chez plusieurs espèces d'anophèles dans la zone, en particulier chez des espèces vectrices. La résistance à la deltaméthrine semble plus fréquente que la résistance à la perméthrine. Nous avons également mis en évidence la mutation *kdr* (L1014S) chez *An. hyrcanus* (s.l.). Les limites de cette étude sont la faible taille de l'échantillon lorsque les tests sont considérés individuellement et la problématique des espèces jumelles (certains tests ont été réalisés sur un mélange d'espèces). Plus de données sont nécessaires afin de caractériser la sensibilité des anophèles vis-à-vis d'autres classes d'insecticides, de décrire les bases génétiques de la résistance ainsi que les principales sources de sélection (agriculture vs santé publique), ces éléments ayant fait l'objet de peu d'études dans la zone.

### **3. Apport de l'entomologie pour l'élimination de Plasmodium vivax**

La problématique du paludisme à *P. vivax* a été présentée en introduction. Nous avons vu que ce parasite est un fardeau considérable pour les populations exposées. Ce cadre nosologique du paludisme a longtemps été négligé car les conséquences indirectes et différées sont difficiles à mesurer (Douglas et al., 2014). Nous avons également décrit les particularités biologiques qui rendent ce parasite particulièrement résistant aux interventions de lutte. Dans ce paragraphe, nous développerons deux axes de recherche pour l'entomologie : le rôle de la lutte anti-vectorielle en l'absence de traitement curatif court et l'apport des modèles d'hypnozoïtes *in vitro* pour la recherche de nouveaux traitements curatifs.

Les hypnozoïtes de *P. vivax* sont particulièrement résistants aux médicaments antipaludiques et ne sont pas éliminés par les thérapeutiques de première intention (Price and Nosten, 2014). Le seul traitement radical disponible à ce jour est un protocole de 14 jours

par la primaquine (John et al., 2012). Aux doses utilisées, la primaquine peut provoquer une hémolyse chez les sujets déficients en G6PD (White, 1996), une enzyme impliquée dans la régulation du métabolisme oxydo-réductif des globules rouges (Cappellini and Fiorelli, 2008). Le déficit en G6PD est fréquent en zone d'endémie en particulier chez les personnes les plus à risque. Le long de la ZTTM, 13% de la population est déficiente et 90% des sujets déficients portent la mutation Mahidol (Bancone et al., 2014). Deux stratégies sont envisagées pour mettre en œuvre le traitement curatif à grande échelle : (i) la mise au point de tests de dépistage de la déficience en G6PD utilisables dans les villages (Domingo et al., 2013, von Seidlein et al., 2013) et (ii) le développement de nouveaux schémas thérapeutiques permettant d'administrer la primaquine même aux sujets déficients (Watson et al., 2017). Dans tous les cas, l'utilisation de la primaquine reposera sur un protocole thérapeutique long. Le traitement de l'ensemble d'une population nécessitera une fenêtre de temps plus large que dans le cas de *P. falciparum*. Dans ce contexte, la prévention de la réinfection sera un élément important étant donné que les valeurs de TIE sont de 10 piqûres/personne/an soit environ 1 piqûre infectante/personne/mois. L'interruption du contact homme-vecteur sera sans doute un élément déterminant si des stratégies efficaces de LAV sont mises au point. Cela pourra faire l'objet d'essais cliniques visant à évaluer la plus-value de la LAV dans le contexte du TdM pour l'élimination de *P. vivax*. Enfin, des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'intérêt de la tafénoquine, une molécule proche de la primaquine qui permet d'éliminer les hypnozoïtes avec une dose unique. Cependant, cette molécule ne bénéficie pas encore d'une autorisation de mise sur le marché et peut provoquer des hémolyses chez certaines catégories de patients déficients en G6PD (Price and Nosten, 2014).

Enfin, la recherche de nouvelles molécules pour le traitement curatif de *P. vivax* nécessite de développer des modèles *in vitro*. Cela nécessite (i) de cultiver des hépatocytes primaires et (ii) de réaliser des infections expérimentales d'anophèles avec *P. vivax* pour produire des sporozoïtes, ce qui est très difficile sur le plan technique. A noter que *P. vivax* ne se cultive pas *in vitro* ce qui nécessite d'avoir accès à des échantillons infectants (en pratique cela revient à travailler en zone d'endémie au plus près des patients infectés). L'apport de l'entomologie est donc majeur dans ce cadre, c'est même un prérequis indispensable.

## VIII. TRAVAUX ISSUS DE CETTE ETUDE

---

### A. ARTICLES

**Chaumeau, V.**, C. Andolina, B. Fustec, N. Tuikue Ndam, C. Brengues, S. Herder, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten and V. Corbel (2016). "Comparison of the Performances of Five Primer Sets for the Detection and Quantification of Plasmodium in Anopheline Vectors by Real-Time PCR." PLoS One **11**(7): e0159160.

**Chaumeau, V.**, D. Cerqueira, J. Zadrozny, P. Kittiphanakun, C. Andolina, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten and V. Corbel (2017). "Insecticide resistance in malaria vectors along the Thailand-Myanmar border." Parasit Vectors **10**(1): 165.

Kwansomboon, N., **V. Chaumeau**, P. Kittiphanakun, D. Cerqueira, V. Corbel and T. Chareonviriyaphap (2017). "Vector bionomics and malaria transmission along the Thailand-Myanmar border: a baseline entomological survey." J Vector Ecol **42**(1): 84-93.

Landier, J., L. Kajeewiwa, M. Thwin, D. Parker, **V. Chaumeau**, J. Wiladphaingern, M. Imwong, O. Miotto, K. Patumrat, J. Duanguppama, D. Cerqueira, B. Malleret, L. Rénia, S. Nosten, L. von Seidlein, S. Proux, V. Corbel, J. Simpson, A. Dondorp, N. White, F. Nosten (2017). "Safety and effectiveness of mass drug administrations to accelerate the elimination of artemisinin-resistant falciparum malaria: a pilot cluster-randomised controlled trial in Eastern Myanmar." Wellcome Open Res **2**(81).

### B. POSTERS

Chaumeau V., P. Phatharakokordbun, N. Kwansomboon, C. Montazeau, B. Fustec, S. Metaane, C. Andolina, P. Ya- Umphan, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, V. Corbel. "**Impact of Mass Drug Administration on the entomological indexes of malaria transmission along the Thai-Myanmar border.**" *American Society of Tropical Medicine and Hygiene 64th Annual Meeting*, October 25-29, 2015, Philadelphia, USA.

### C. COMMUNICATIONS ORALES

Chaumeau, V., B. Fustec, A. Sumanrote, C. Brengues, C. Andolina, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten, V. Corbel. "**Resistance of malaria vectors to Public Health**

**insecticides along the Thai-Myanmar Border.”** *Annual Thailand Research Found meeting*, 24th August 2016, Bangkok, Thailand.

Chaumeau, V., P. Phatharakokordbun, N. Kwansomboon, C. Montazeau, B. Fustec, S. Metaane, C. Andolina, P. Ya-Umphap, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, V. Corbel. **“Impact of Targeted Malaria Treatment on the transmission of Plasmodium falciparum along the Thai-Myanmar border.”** *Joint International Tropical Medicine Meeting 2015*, 2-4 December 2015, Bangkok, Thailand.

Chaumeau, V., P. Phatharakokordbun, N. Kwansomboon, C. Montazeau, B. Fustec, S. Metaane, C. Andolina, P. Ya-Umphap, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, V. Corbel. **“Impact of Targeted Malaria Treatment on the transmission of Plasmodium falciparum along the Thai-Myanmar border.”** *Annual Thailand Research Found meeting*, 24th August 2015, Bangkok, Thailand.

Chaumeau, V., N. Kwansomboon, C. Montazeau, B. Fustec, C. Andolina, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten, V. Corbel. **“Dynamic of malaria transmission along the Thai-Myanmar border in a context of Targeted Chemo Elimination.”** *12th International Meeting Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases*, 11-13 December, 2014, Bangkok, Thailand.

Chaumeau, V., N. Kwansomboon, C. Montazeau, B. Fustec, C. Andolina, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten, V. Corbel. **“Dynamic of malaria transmission along the Thai-Myanmar border in a context of Targeted Chemo Elimination.”** *Annual Thailand Research Found meeting*, 24th August 2014, Bangkok, Thailand.

## **D. MANUSCRITS EN COURS DE PREPARATION**

Chaumeau, V., xxx, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten and V. Corbel (2016). "Entomological aspects of malaria transmission on the Thai-Myanmar border."

Chaumeau, V., xxx, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten and V. Corbel (2016). "Impact of mass drug administration on the intensity of malaria transmission in relation to submicroscopic infection: results from a pilot study in Kayin state (Myanmar)."

RESEARCH ARTICLE

# Comparison of the Performances of Five Primer Sets for the Detection and Quantification of *Plasmodium* in Anopheline Vectors by *Real-Time* PCR

V. Chaumeau<sup>1,2,3\*</sup>, C. Andolina<sup>4</sup>, B. Fustec<sup>2,3</sup>, N. Tuikue Ndam<sup>5,6</sup>, C. Brengues<sup>2</sup>, S. Herder<sup>7,8</sup>, D. Cerqueira<sup>3,4</sup>, T. Chareonviriyaphap<sup>9</sup>, F. Nosten<sup>4,10</sup>, V. Corbel<sup>2,3,9\*</sup>



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Chaumeau V, Andolina C, Fustec B, Tuikue Ndam N, Brengues C, Herder S, et al. (2016) Comparison of the Performances of Five Primer Sets for the Detection and Quantification of *Plasmodium* in Anopheline Vectors by *Real-Time* PCR. PLoS ONE 11(7): e0159160. doi:10.1371/journal.pone.0159160

**Editor:** Kristin Michel, Kansas State University, UNITED STATES

**Received:** March 24, 2016

**Accepted:** June 28, 2016

**Published:** July 21, 2016

**Copyright:** © 2016 Chaumeau et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by The Global Fund Thailand (THA-M-DDC) through the MAEL research programme. This work was partially supported by the Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Institute for Advanced Studies, Kasetsart University under the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand. Victor Chaumeau received a PhD

**1** Centre hospitalier universitaire de Montpellier, Montpellier, France, **2** Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France, **3** Centre for Advanced Studies for Agriculture and Food, Institute of Advanced Studies, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, **4** Shoklo Malaria Research Unit, Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Mae Sot, Thailand, **5** Institut de Recherche pour le développement, UMR216, Mère et enfant face aux infections tropicales, Paris, France, **6** Communauté d'Universités et d'Établissements Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Paris, France, **7** UMR Intertryp, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France, **8** Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, **9** Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, **10** Centre for Tropical Medicine and Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

\* [victor.chaumeau@ird.fr](mailto:victor.chaumeau@ird.fr) (V. Chaumeau); [vincent.corbel@ird.fr](mailto:vincent.corbel@ird.fr) (V. Corbel)

## Abstract

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) has made a significant improvement for the detection of *Plasmodium* in anopheline vectors. A wide variety of primers has been used in different assays, mostly adapted from molecular diagnosis of malaria in human. However, such an adaptation can impact the sensitivity of the PCR. Therefore we compared the sensitivity of five primer sets with different molecular targets on blood stages, sporozoites and oocysts standards of *Plasmodium falciparum* (Pf) and *P. vivax* (Pv). Dilution series of standard DNA were used to discriminate between methods at low concentrations of parasite and to generate standard curves suitable for the absolute quantification of *Plasmodium* sporozoites. Our results showed that the best primers to detect blood stages were not necessarily the best ones to detect sporozoites. Absolute detection threshold of our qPCR assay varied between 3.6 and 360 Pv sporozoites and between 6 and 600 Pf sporozoites per mosquito according to the primer set used in the reaction mix. In this paper, we discuss the general performance of each primer set and highlight the need to use efficient detection methods for transmission studies.

scholarship by the Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier (CHRU Montpellier). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Malaria is a vector-borne disease transmitted to human through the bite of a female *Anopheles* infected with *Plasmodium*. Five species are responsible for malaria in human, namely *Plasmodium falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv), *P. ovale* (Po), *P. malariae* (Pm) and *P. knowlesi* (Pk) [1, 2]. Inaccurate detection of *Plasmodium* in the vector (either false negative or false positive reaction) can have considerable consequences on the estimation of the intensity of malaria transmission and then bias the understanding of malaria epidemiology [3–6]. In the context of deployment of global effort towards malaria control and elimination, it is of primary importance to use reliable diagnostic tools for the detection of *Plasmodium* in anopheline vectors.

In routine practice, three methods are used to detect *Plasmodium* in the vectors: microscopic observation of dissected salivary glands [7, 8], enzyme linked immuno-sorbent assays targeting the circumsporozoite protein (ELISA-CSP) [7, 9–15] and polymerase chain reaction (PCR) [7, 10, 15–20]. Compared to other methods, PCR has significantly improved the sensitivity and the specificity of the detection and allowed for an accurate identification of the plasmodial species [3, 6, 21, 22]. The assay sensitivity and specificity depend on a variety of factors interacting together such as the conditions of the PCR (essentially the hybridization temperature for primers annealing, and the MgCl<sub>2</sub>, primers and DNA polymerase concentrations), the DNA target, the primers and the matrix of the reaction [23]. Therefore, quantitative real-time PCR (qPCR) is not necessarily more sensitive than conventional PCR (cvPCR), ELISA-CSP or microscopy [23]. However, it is commonly admitted that qPCR technology is a progress regarding its ability to quantify the number of PCR DNA target (hence the amount of parasite in a biological sample), reduce the labour load and limit the risk of contamination [23, 24].

Most of the literature available on the molecular detection of *Plasmodium* in mosquitoes has been adapted from assays that were developed for the diagnosis of malaria parasites in humans [19, 20, 25–29]. However the sensitivity and specificity of an assay developed on blood samples may vary when applied to malaria vectors because of non-specific amplifications generating false positive [28, 29] and/or inhibition of the PCR due to inhibitory components that may remain in the DNA template after the extraction step [28–30]. Moreover, differences in the composition of the matrix can affect the efficiency of the PCR and impact on the detection threshold [23, 31].

In this study we compared the performances of a qPCR assay optimised for five primer sets selected from the literature [32–36] because (i) they proved to be efficient to detect human malaria parasites and (ii) they amplify different PCR DNA targets of the nuclear (18S ssuRNA genes) or mitochondrial (COX I, COX III, other non-coding sequence) genome. Dilution series of standard DNA extracts (Pf and Pv sporozoites, oocysts and blood stages) were used to assess detection limits of the different methods and to produce standard curves for the absolute quantification of sporozoites in malaria vectors.

This work aims at providing recommendations on the most efficient molecular technique to use for the detection and quantification of *Plasmodium* in anopheline vectors.

## Material & Methods

### Standard samples of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

**Blood stages.** Blood samples were collected from patients attending the Shoklo Malaria Research Unit (SMRU) clinics with a clinical episode of Pf or Pv malaria. DNA was extracted using the DNEasy kits® (Qiagen) according to the manufacturer's instructions for human blood (100µl of blood was extracted and eluted in 100µl of elution buffer such a way as 1µl of DNA extract corresponded to 1µl of blood).

**Heads/thoraxes (containing sporozoites) and abdomens (containing oocysts) from experimentally infected *Anopheles*.** Batches of *Anopheles cracens* reared at the SMRU were experimentally infected by membrane feeding as previously described [37]. Fifteen days after the infective blood meal, infected specimens were killed by freezing and cut in two parts in order to separate the head/thorax (containing putatively sporozoites) from the abdomen (containing putatively oocysts). The samples were crushed in 200µl of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) solution 2% (TrisHCl pH = 8, 20mM; EDTA 10mM; NaCl, 1.4 mM; N-cetyl-N,N,N,-trimethyl ammonium bromide 2%) with a TissueLyser II® (Qiagen). The samples were warmed at 65°C for 5 minutes and 200µl of chloroform were added. The organic phase was collected and DNA was precipitated with 200µl of isopropanol. After centrifugation at 20,000 g for 15 minutes, the pellet was washed with 70% ethanol and suspended in 40 µl of PCR water.

**Calibrated suspension of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* sporozoites.** The salivary glands of 100 infected mosquitoes were pooled and crushed in a 1.5 ml tube (Eppendorf) containing 50 µl of RPMI® medium (Sigma) and the concentration of the suspension was estimated by inverted microscopy using a KOVA slide [37]. Three different vials of Pv sporozoites were produced and contained 288,000, 330,750 and 460,600 parasites respectively (mean of 360,000 sporozoites per vial). One vial of Pf sporozoites was produced and contained 60,000 parasites. DNA was extracted with the CTAB protocol as described previously.

### qrtPCR assay and primers

Five primer sets suitable for the detection of *Plasmodium* were selected from the literature [32–35, 38] and adapted to qrtPCR technology using universal-thermocycling protocol and intercalating dye as a detection method. The sequences of the primers are presented in the Table 1 and were produced by BioDesign (Thailand). All experiments were performed on a CFX-96® (Biorad) machine; reactions were conducted in 9µl of EVAGreen qPCR Mix Plus® (Euromedex); 1µl of DNA template was used in a total reaction volume of 10µl; the same thermocycling

**Table 1. Sequences of the primers used in the study and corresponding references.**

Primer set	Ref.	Name	Sequence	PCR DNA target	Target species
I	[33]	Forward	5'-TAGCCGACAAGGAATTTTGC-3'	ncMS	Pssp
		Reverse	5'-CCTTGAATGGAGCACTGGAT-3'		
II	[34]	Pf1	5'-CCTGCATTAACATCATTATATGGTACATCT-3'	COX I	Pf
		Pf2	5'-GATTAACATTCTTGATGAAGTAATGATAATACCTT-3'		
		Pv1	5'-AAGTGTGTGTATGGGCTCATCATATG-3'	COX III	Pv
		Pv2	5'-CAAAATGGAAATGAGCGATTACAT-3'		
III	[36]	Pssp1	5'-AGTTACGATTAATAGGAGTAG-3'	18S ssuRNA genes	Pssp
		Pssp2	5'-CCAAAGACTTGTATTCTCAT-3'		
IV	[32]	PL1473F18	5'-TAACGAACGAGATCT TAA-3'	18S ssuRNA genes	Pssp *
		PL1679R18	5'-GTTCTCTAAGAAGCTTT-3'		
V	[35]	FAL-F	5'-CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA-3'	18S ssuRNA genes	Pf
		FAL-R	5'-TATTCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA-3'		
		VIV-F	5'-ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT-3'	18S ssuRNA genes	Pv
		VIV-R	5'-ATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC-3'		

**Ref.**, reference; **ncMS**, non-coding mitochondrial sequence; **COX**, cyto-oxygenase; **Pf**, *Plasmodium falciparum*; **Pssp**, *Plasmodium spp.*; **Pv**, *Plasmodium vivax*.

\* identification of the plasmodial species is possible through the melt-curve analysis of the PCR product.

doi:10.1371/journal.pone.0159160.t001

protocol was applied to all primer sets (95°C for 15 minutes followed by 45 amplification cycles at 95°C for 15 seconds, appropriate annealing temperature for 15 seconds and 72°C for 20 seconds); characterisation of the PCR product was performed using the melt curve analysis of the amplicons (95°C for 15 seconds, 68°C for 1 minute, 80°C for 15 seconds, 60°C for 15 seconds, then 60°C to 90°C with an increment of 0.2°C per second). The primer set II was used in duplex with the primers Pf1, Pf2, Pv1 and Pv2 in the same reaction mix. The primer set V was used in duplex with the primers VIV-F, VIV-R, FAL-F and FAL-R in the same reaction mix (the primers OVA-F and OVA-R were not included in the reaction mix). The optimal hybridization temperature for primers annealing and the concentrations of primers and MgCl<sub>2</sub> were determined in a single cross-experiment for each primer set using the gradient mode of the machine. Appropriate positive (*Plasmodium* DNA) and negative controls (water) were included in each experiment. As we used the same amplification protocol, combined with an optimization of the reaction conditions, the primer set, the primer concentration and the annealing temperature were the only factor affecting the sensitivity of the PCR.

### Serial dilution assays

DNA extracts from uninfected samples were pooled in order to obtain a homogeneous negative 1X DNA matrix from *Anopheles* abdomen or head/thorax and human blood. Ten-fold dilutions series of standard DNA extracts of *Plasmodium* (according to the preliminary CP) were done in the appropriate matrix. Each vial was aliquoted and stored at -20°C during one month (duration of the study) in order to avoid multiple defrosting.

### Data analysis

**Scoring system to assess the proportion of positive reactions at low concentrations of parasite.** Dilution series from head/thorax (containing sporozoites), abdomen (containing oocysts) and blood (containing blood stages) were tested twice (6 reactions in each experiment) yielding 12 PCR results per dilution. In order to facilitate the comparison of different primers, we used a scoring system as described by Sterkers *et al.* [39]. The score consisted of calculating a ratio of the number of positive reactions to the total number of reactions performed at low parasitic concentrations (*i.e.* dilutions at which at least one primer sets yielded < 12 positive reactions). This score, reflecting the “proportion of positive reactions for low concentrations of parasite”, was calculated for each serial dilution experiment and for each primers set. The score values were compared using pairwise Chi-square test adjusted with Bonferroni’s correction for multiple comparisons and Yate’s correction when observed frequencies were less than five.

**Absolute quantification of sporozoites using calibrated standards.** Serial dilutions of DNA extracts from calibrated sporozoites standards were tested in triplicate yielding 9 PCR results per dilution. Crossing-point (CP) values were determined using the regression algorithm of the analysis software of the PCR device (CFX Biorad Manager version 3.0®, Biorad) and used to elaborate the standard curves. The best fit-line and the subsequent values of the slope and y-intercept were obtained using least-square analysis of the linear portion of each curve (Pearson’s coefficient  $r^2 > 0.990$ ). The PCR efficiency (EFF) was calculated from the formula  $EFF = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ . Accuracy and repeatability of the measure were estimated using intra- and inter-assay standard deviation (SD). The limit of detection (LOD) was defined as the highest dilution with  $\geq 50\%$  of positive reactions (*i.e.* amplification of the PCR DNA target). Concentrations were expressed in number of *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* genome (Pfg or Pvg) equivalents per reaction tube. Considering our protocol, one genome equivalent per reaction tube corresponds to 40 sporozoites per mosquito prior to DNA extraction.

## Ethics approval

The protocol for blood collection and analysis has been approved by the Oxford Tropical Research Ethics Committee (1015–13, dated 29 Apr 2013). All participants provided their written consent to participate in this study. This consent procedure was approved by the ethics committee.

## Results

### Optimal conditions for the PCR

Typical amplification and melt curves obtained with Pf and Pv standards are illustrated in the Fig 1, panels A to J. All primer sets accurately amplified positive Pf and Pv samples and three of them were able to identify the species of *Plasmodium* (primer sets II, IV and V).

The reaction conditions (essentially the hybridization temperature for primers annealing and the concentration of MgCl<sub>2</sub> and primers) have a great influence on the sensitivity and specificity of the PCR assay. It was therefore essential to optimize the reaction conditions and to determine the efficiency of the PCR before comparing the different primers. The optimal conditions of the reaction (adapted to the CFX-96 device) and the corresponding efficiency are presented in the Table 2. The efficiency was >80% and <110% for the primer sets I, II, III and IV hence reflecting a good optimisation of the reaction conditions. A lot of primer-dimers was however detected with the primer set V (Fig 1, panel J), thus it was not possible to determine the efficiency of the reaction.

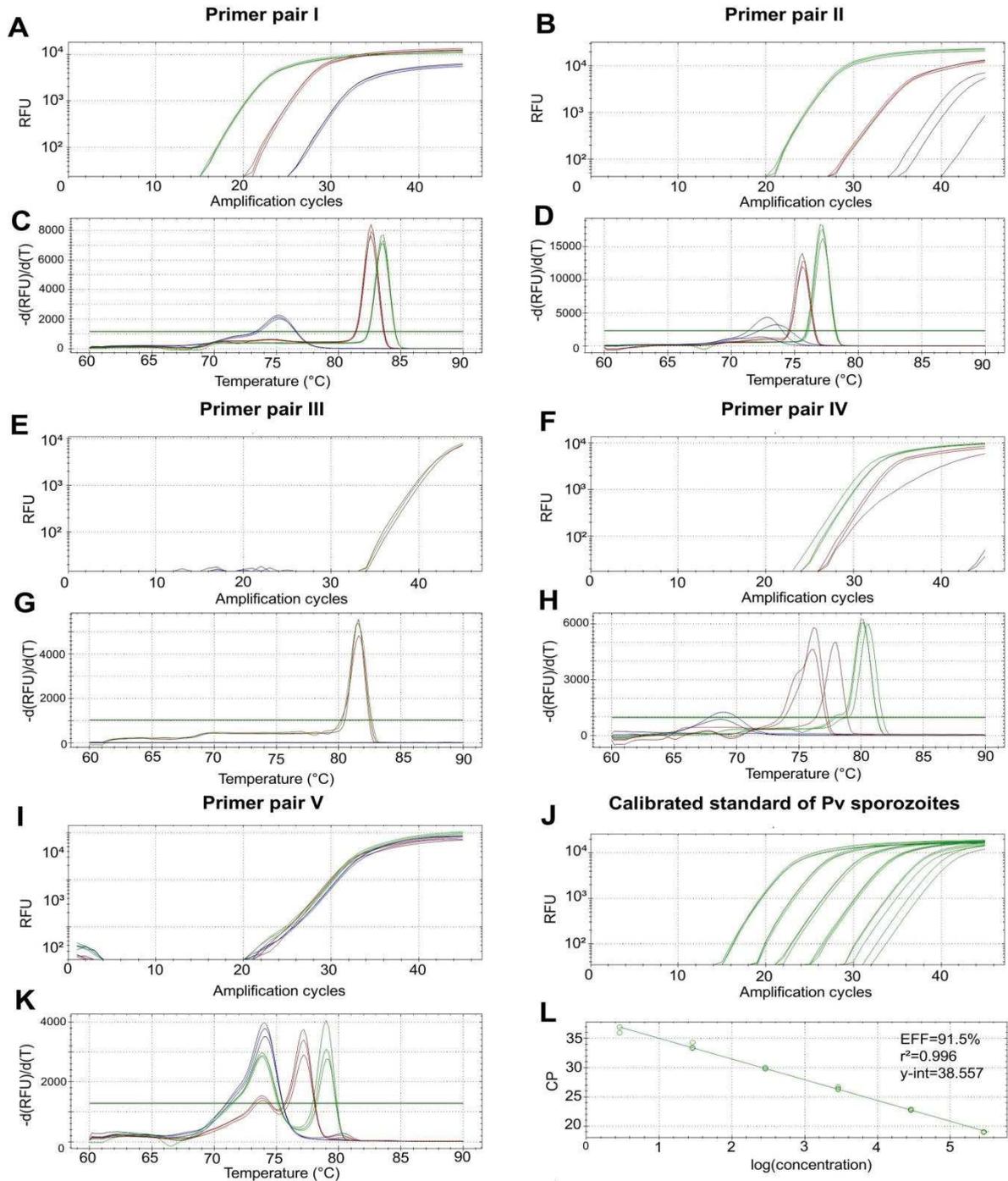
### Comparison of the sensitivity of the five primer sets on sporozoites, oocysts and blood stage standards of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

As expected, the number of positive reactions was 100% (12/12) with all primers at high concentrations of parasite whereas it progressively declined as the dilution factor increased (Table 3). At low concentrations of parasite, a significant disparity in the score values was observed, supporting that this approach is efficient to discriminate between different primers. The results of the pairwise Chi-square tests adjusted with Bonferroni's correction are presented in the S1 Table. On Pf standards, the best score values were obtained with the primer sets I, II and IV for sporozoites, oocysts and blood stages respectively. Regarding the detection of Pv, the best results were obtained with the primer sets I and II which had similar score values on all standards. The score values obtained with the primer set V was significantly lower than the score values obtained with the other primers on all *Plasmodium* standards.

### Absolute quantification of *Plasmodium* sporozoites

Typical amplification and standard curves derived from the dilution series performed on calibrated sporozoites standards are illustrated in the Fig 1 (panels K and L). The standard curve parameters (y-intercept, slope,  $r^2$  and linear dynamic) were calculated on the linear portion of each standard curve (Pearson's coefficient  $r^2 > 0.990$ ). The efficiency was >80% and the value of  $r^2$  was >0.990 for all regression lines hence allowing an accurate quantification of the DNA target over a linear dynamic spanning from 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> according to the assay and standard (Tables 4 and 5).

The LOD varied between 3.6 (primer sets I and II) and 360 (primer set V) sporozoites per mosquito on Pv standard, and between 6 (primer set II) and 600 (primer set V) sporozoites per mosquito on Pf standard (Table 6). The presence of *Plasmodium* was confirmed by sequencing for all standards and serial dilutions (Macrogen®, Seoul, Korea).



**Fig 1. Typical amplification curves, melt curves and standard curves generated with the five primer sets.** (A,B,E,F and I) Amplification curves generated by the real-time measurement of the fluorescent signal at the end of each amplification cycle; (C,D,G,H, and K) Melt curves analysis of the PCR product; (J and L) Amplification curves and standard curve generated during the assessment of primer set II on dilution series of calibrated *Plasmodium vivax* sporozoites standard (vial 1), demonstrating the linear relationship between the logarithm of the parasitic concentration and the CP value. Brown and green lines represent *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* standards respectively; blue lines represent the non-template negative control.

doi:10.1371/journal.pone.0159160.g001

The primer pair IV was further selected to quantify the sporozoite load in 49 naturally infected *Anopheles* collected along the Thai-Myanmar border (unpublished data). The mean CP value was  $32.9 \pm 3.0$  (range, 25.1 to 35.7) and  $32.3 \pm 4.0$  (range, 21.6 to 38.7) for Pf and Pv respectively. The range of the standard curve was appropriate for the quantification of sporozoites in most infected specimens (12 Pv infected *Anopheles* had however a mean CP value below quantification threshold which corresponds to less than 36 sporozoites per mosquito). The geometric mean of the sporozoite load was 57 (CI95% [52–60]; range, 9 to 11,428) and 137 (CI95% [132–141]; range, <36 to 273,787) sporozoites per mosquito for Pf and Pv respectively (Table 7).

Overall 60% of the infected *Anopheles* carried less than 100 sporozoites and the sporozoite load seems to follow right skewed distribution (Fig 2).

### Discussion

The aim of the present work was to provide technical guidance on the best molecular method to use for the detection of *Plasmodium* in anopheline vectors with particular focus on low transmission settings. We successfully compared the performances of five primer sets with regard to their ability to (i) detect sporozoites, oocysts and blood stages of *P. falciparum* and *P. vivax* and (ii) to quantify the sporozoite load in *Anopheles* vectors.

### Discrimination between methods at low concentrations of parasite

High concentrations of parasite were accurately detected by all primers. Contrastingly, significant variations were observed at low concentrations (Table 3). The best primer set to detect blood stages was not necessarily the best primer set to detect sporozoites or oocysts. This observation confirms our hypothesis that an assay developed for the diagnosis of malaria in human can be less sensitive when transposed to the detection of *Plasmodium* in malaria vectors. The LOD of our qrtPCR assay varied from 3.6 (primer sets I and II) to 360 (primer set V) Pv

**Table 2. Optimal reaction conditions and corresponding efficiencies using the CFX-96® (Biorad) device.**

Primer set	Annealing temperature (°C)	MgCl <sub>2</sub> concentration (mM)	Primers concentration (nM)	%EFF <sup>a</sup> (Pf)	%EFF <sup>a</sup> (Pv)
I	58	2.5	250 each	ND <sup>b</sup>	110
II	60	2.5	300 each	84	92
III	58	2.5	500 each	96	110
IV	54	2.5	250 each	97	101
V	60	2.5	400 each	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>

ND, not determined; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pv, *Plasmodium vivax*; EFF, efficiency of the PCR.

<sup>a</sup> %EFF: efficiency (EFF) of the PCR calculated with the formula  $EFF = 10^{(-1/slope)} - 1$  and expressed as a percentage. An efficiency of 100% corresponds to a slope of -3.32 and means that the number of amplicons doubles after each cycle of amplification. Efficiency was calculated from serial dilutions of calibrated Pf and Pv sporozoite standards.

<sup>b</sup> Due to the lack of sample, it was not possible to determine the PCR efficiency of the primer pair I with the Pf sporozoite standard.

<sup>c</sup> Due to the presence of primer-dimers, it was not possible to determine the PCR efficiency with primer set V.

doi:10.1371/journal.pone.0159160.t002

**Table 3. Results of the assessment of each primer set on sporozoites, oocysts and blood stages standards.**

Standard sample	Species	Primer set	Dilution																		Score <sup>b</sup>			
			ND		10 <sup>-1</sup>		10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-3</sup>		10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-5</sup>		10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-7</sup>		10 <sup>-8</sup>		10 <sup>-9</sup>		nb	%
			nb <sup>a</sup>	%a	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%										
Head/Thorax (sporozoites)	Pf	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	10/12	83	2/12	17	-	-	-	-	-	-	36/48	75
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	9/12	75	3/12	25	-	-	-	-	-	-	36/48	75
		III	12/12	100	12/12	100	11/12	92	11/12	92	8/12	67	3/12	25	0/12	0	-	-	-	-	-	-	22/48	46
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	4/12	33	1/12	8	-	-	-	-	-	-	25/48	52
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	-	-	12/48	25
	Pv	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	4/12	33	0/12	0	0/12	0	0/12	0	23/36	64
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	5/12	42	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	18/36	50
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	1/12	8	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	10/36	28
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	3/12	25	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	11/36	31
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	0/36	0
Abdomen (oocysts)	Pf	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	5/12	42	1/12	8	-	-	-	-	-	-	25/48	52
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	4/12	33	1/12	8	-	-	-	-	-	-	24/48	50
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	9/12	75	3/12	25	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	-	-	13/48	27
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	4/12	33	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	-	-	13/48	27
		V	12/12	100	12/12	100	10/12	83	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	-	-	0/48	0
	Pv	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	9/12	75	4/12	33	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	26/60	43
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	6/12	50	3/12	25	2/12	17	-	-	-	-	35/60	58
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	7/12	58	4/12	33	1/12	8	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	12/60	20
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	6/12	50	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	17/60	28
		V	12/12	100	11/12	92	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	0/60	0
Blood (blood stages)	Pf	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	10/12	83	3/12	25	0/12	0	-	-	-	-	25/48	52
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	2/12	17	1/12	8	-	-	-	-	26/48	54
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	6/12	50	3/12	25	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	9/48	19
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	2/12	17	1/12	8	0/12	0	-	-	-	-	11/48	23
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	10/12	83	1/12	8	0/12	0	0/12	0	0/12	0	-	-	-	-	1/48	2
	Pv	I	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	8/12	67	3/12	25	1/12	8	0/12	0	12/36	33
		II	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	3/12	25	3/12	25	0/12	0	17/36	47
		III	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	1/12	8	0/12	0	0/12	0	12/36	33
		IV	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	11/12	92	5/12	42	3/12	25	0/12	0	19/36	53
		V	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	12/12	100	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/36	0

ND, not diluted; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pv, *Plasmodium vivax*.

<sup>a</sup> number (nb) or percentage (%) of positive reactions over the total number of reaction performed.

<sup>b</sup> score of the proportion of positive reactions at low concentrations of parasite (the bold cells indicate the concentrations used to calculate the score), the definition is given in the section Material and Methods; an example of the calculation of the score is given here: the maximum hit for the score on *Plasmodium vivax* sporozoites standard is 48 reactions (12 at the dilution D, +12 at the dilution E, +12 at the dilution F and +12 at the dilution G), the score obtained with the primer pair I is 75% (36/48 = (12+12+10+2)/48).

doi:10.1371/journal.pone.0159160.t003

sporozoites per mosquito and from 6 (primer sets I and II) to 600 (primer set V) Pf sporozoites per mosquito according to the primers used to perform the reaction.

The main limitation to discriminate between PCR assays is the Poisson's law which applies at very low concentrations of parasite. Indeed only a certain proportion of the replicates are positive at low concentrations and the standard deviation of the mean CP value increases

**Table 4. Results of the assessment of each primer set on calibrated standards of *Plasmodium vivax* sporozoites.**

Primer set (%EFF and r <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Parameter	Value at the indicated concentration (in Pvg equivalent per tube)							
		9,000	900	90	9	0.9	0.1	0.01	0.001
I (110%, 0.997)	Nb. Positive (%) <sup>b</sup>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	5/9 (56%)	0/9	0/9
	Mean CP value	<b>17.90</b>	<b>21.18</b>	<b>24.45</b>	<b>27.70</b>	<b>30.18</b>	31.90	-	-
	Intra-SD <sup>c</sup>	<b>0.10</b>	<b>0.16</b>	<b>0.17</b>	<b>0.16</b>	<b>0.42</b>	0.23	-	-
	Inter-SD <sup>d</sup>	<b>0.85</b>	<b>0.71</b>	<b>0.82</b>	<b>0.80</b>	<b>0.22</b>	0.22	-	-
II (92%, 0.999)	Nb. Positive	<b>9/9(100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>7/9 (78%)</b>	1/9 (11%)	0/9
	Mean CP value	<b>19.66</b>	<b>23.40</b>	<b>27.04</b>	<b>30.37</b>	<b>34.23</b>	<b>37.18</b>	-	-
	Intra-SD	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>	<b>0.16</b>	<b>0.18</b>	<b>0.75</b>	<b>1.36</b>	-	-
	Inter-SD	<b>1.08</b>	<b>0.83</b>	<b>0.92</b>	<b>0.84</b>	<b>0.97</b>	<b>1.91</b>	-	-
III (110%, 0.991)	Nb. positive	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>8/9 (89%)</b>	3/9 (33%)	0/9	0/9
	Mean CP value	<b>24.94</b>	<b>28.10</b>	<b>30.53</b>	<b>33.55</b>	<b>37.78</b>	37.56	-	-
	Intra-SD	<b>0.39</b>	<b>0.99</b>	<b>0.35</b>	<b>0.62</b>	<b>2.19</b>	0.35	-	-
	Inter-SD	<b>1.31</b>	<b>1.88</b>	<b>0.95</b>	<b>0.66</b>	<b>0.99</b>	0.56	-	-
IV (101%, 0.999)	Nb. positive	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>7/9 (78%)</b>	2/9 (22%)	1/9 (11%)	0/9
	Mean CP value	<b>21.05</b>	<b>24.68</b>	<b>28.02</b>	<b>31.20</b>	<b>34.24</b>	35.86	35.83	-
	Intra-SD	<b>0.15</b>	<b>0.09</b>	<b>0.26</b>	<b>0.27</b>	<b>0.21</b>	-	-	-
	Inter-SD	<b>0.94</b>	<b>1.02</b>	<b>0.78</b>	<b>0.52</b>	<b>0.55</b>	1.52	-	-
V *	Nb. positive	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	1/9 (11%)	0/9	0/9	0/9
	Mean CP value	-	-	-	-	-	-	-	-
	Intra-SD	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inter-SD	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> %EFF: efficiency (EFF) of the PCR was calculated with the formula  $EFF = 10^{(-1/slope)} - 1$  and expressed as a percentage. An efficiency of 100% corresponds to a slope of -3.32 and means that the number of amplicons doubles after each cycle of amplification; <sup>r</sup><sup>2</sup>: Pearson's correlation coefficient expressing the intensity of the relationship between the logarithm of the concentration and the mean CP value. <sup>r</sup><sup>2</sup> varies between 0 (no correlation) and 1 (perfect correlation), a value >0.990 testify of the linearity of the method (over a defined linear range) and allow an accurate quantification. <sup>r</sup><sup>2</sup> and EFF have been calculated on the linear dynamic of each curve (bold cells).

<sup>b</sup> Nb. Positive (%): number of positive reactions (amplification of the PCR DNA target) / total of reactions performed at a given dilution and corresponding percentage.

<sup>c</sup> Intra-assay SD: intra-assay standard deviation (SD), calculated as the average SD of the mean CP value measured for each dilution during the same experiment.

<sup>d</sup> Inter-assay SD: inter-assay standard deviation (SD), calculated as the SD of the means CP values measured during two independent experiments.

\* co-amplification of primer-dimers during the PCR invalidates the calculation of the CP values and the estimation of the subsequent parameters of the best-fit line.

doi:10.1371/journal.pone.0159160.t004

substantially. The pitfall of Poisson's law can be avoided by (i) the use of DNA extracts combined with repetition of the PCR DNA target [40, 41], (ii) the multiplication of the number of reactions performed at a given dilution [39, 40] and (iii) by the use of a discriminative method for data analysis [39].

### The use of quantitative data to study malaria transmission

To our knowledge, this is the first report of absolute quantification of *Plasmodium* in anopheline vectors using calibrated suspensions of sporozoites. We set-up standard curves suitable for the quantification of *Plasmodium* sporozoites over 4 orders of magnitude allowing the quantification of sporozoite loads ranking from 6 to 60,000 sporozoites per mosquito for Pf and from 36 to 360,000 sporozoites per mosquito for Pv. We could generate three vials of calibrated sporozoites suspension for Pv and only one vial for Pf. However the data obtained with Pf standard

**Table 5. Results of the assessment of each primer set on calibrated standards of *Plasmodium falciparum* sporozoites.**

Primer set (%EFF and r <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Parameter	Value at the indicated concentration (in Pfg equivalent per tube)						
		1500	150	15	1.5	0.15	0.015	0.002
I *	Nb. Positive (%) <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	Mean CP value	-	-	-	-	-	-	-
	Intra-SD <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	Inter-SD <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-
II (84%, 0.998)	Nb. Positive	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>8/9 (89%)</b>	2/9 (22%)	0/9 (0%)
	Mean CP value	<b>22.59</b>	<b>26.21</b>	<b>30.01</b>	<b>33.43</b>	<b>37.95</b>	38.99	-
	Intra-SD	<b>0.07</b>	<b>0.25</b>	<b>0.13</b>	<b>0.29</b>	<b>0.99</b>	-	-
	Inter-SD	<b>0.12</b>	<b>0.19</b>	<b>0.08</b>	<b>0.27</b>	<b>1.10</b>	0.40	-
III (96%, 0.996)	Nb. positive	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>4/9 (44%)</b>	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	Mean CP value	<b>25.69</b>	<b>28.67</b>	<b>32.02</b>	<b>35.98</b>	<b>37.08</b>	-	-
	Intra-SD	<b>0.24</b>	<b>0.08</b>	<b>0.42</b>	<b>1.05</b>	<b>0.61</b>	-	-
	Inter-SD	<b>0.06</b>	<b>0.17</b>	<b>0.14</b>	<b>0.38</b>	<b>1.23</b>	-	-
IV (97%, 0.991)	Nb. positive	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>9/9 (100%)</b>	<b>3/9 (33%)</b>	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	Mean CP value	<b>22.60</b>	<b>25.94</b>	<b>29.35</b>	<b>33.70</b>	<b>35.73</b>	-	-
	Intra-SD	<b>0.12</b>	<b>0.06</b>	<b>0.36</b>	<b>1.10</b>	<b>1.24</b>	-	-
	Inter-SD	<b>0.09</b>	<b>0.14</b>	<b>0.11</b>	<b>0.34</b>	<b>1.22</b>	-	-
V **	Nb. positive	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	Mean CP value	-	-	-	-	-	-	-
	Intra-SD	-	-	-	-	-	-	-
	Inter-SD	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> %EFF: efficiency (EFF) of the PCR was calculated with the formula  $EFF = 10^{(-1/slope)} - 1$  and expressed as a percentage. An efficiency of 100% corresponds to a slope of -3.32 and means that the number of amplicons doubles after each cycle of amplification; r<sup>2</sup>: Pearson's correlation coefficient expressing the intensity of the relationship between the logarithm of the concentration and the mean CP value. r<sup>2</sup> varies between 0 (no correlation) and 1 (perfect correlation), a value >0.990 testify of the linearity of the method (over a defined linear range) and allow an accurate quantification. r<sup>2</sup> and EFF have been calculated on the linear dynamic of each curve (bold cells).

<sup>b</sup> Nb. Positive (%): number of positive reactions (amplification of the PCR DNA target) / total of reactions performed at a given dilution and corresponding percentage.

<sup>c</sup> Intra-assay SD: intra-assay standard deviation (SD), calculated as the average SD of the mean CP value measured for each dilution during the same experiment.

<sup>d</sup> Inter-assay SD: inter-assay standard deviation (SD), calculated as the SD of the means CP values measured during two independent experiments.

\* due to the lack of sample, it was not possible to perform the experiment with the primer pair I.

\*\* co-amplification of primer-dimers during the PCR invalidates the calculation of the CP values and the estimation of the subsequent parameters of the best-fit line.

doi:10.1371/journal.pone.0159160.t005

were consistent with those obtained with Pv standards. The estimation of the sporozoite loads in Pf infected specimens can therefore be considered as accurate.

In the absence of calibrated sporozoite standard, some authors have set-up standard curves from suspension of plasmids containing a single copy of the PCR DNA target. However, the conversion of plasmid concentration in the standard (*i.e.* a known copy number of the PCR DNA target) in number of genome equivalent (*i.e.* number of sporozoites per mosquito) may not be possible for two reasons. In the absence of molecular data, the copy number of a given PCR DNA target in *Plasmodium* sporozoites is unknown. Moreover the efficiency of the PCR (*i.e.* the slope of the standard curve) is likely to be different on plasmid and sporozoite standards. If an accurate quantification of the parasite is expected, the standard curve must be set-up using the same extraction and amplification protocols for the serial dilution experiment

**Table 6. Determination of the limit of detection (LOD) using calibrated standards of Pf and Pv sporozoites.**

Primer set	LOD for the indicated species <sup>a</sup>	
	Pf	Pv
I	ND <sup>b</sup>	0.1 (3.6)
II	0.15 (6)	0.1 (3.6)
III	1.5 (60)	0.9 (36)
IV	1.5 (60)	0.9 (36)
V	15 (600)	9 (360)

LOD, limit of detection; ND, not determined; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pv, *Plasmodium vivax*.

<sup>a</sup> limits of detection are expressed in number of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* genome equivalent (Pfg and Pvg) per reaction tube, values into brackets represent the corresponding number of sporozoites per mosquito.

<sup>b</sup> due to the lack of sample, it was not possible to determine the LOD of the primer pair I for Pf sporozoites. According to the score values presented in the Table 3, the LOD determined with the primer pair I should be similar to the LOD determined with the primer set II for Pf sporozoites (6 Pf sporozoites per mosquito).

doi:10.1371/journal.pone.0159160.t006

than those used to detect *Plasmodium* in routine samples. The dilution series must be performed using appropriate *Plasmodium* standards (Pf and Pv sporozoites) and appropriate negative DNA matrix (DNA extracted from uninfected *Anopheles*). Finally the quantification of the sporozoite load (expressed as a total number of sporozoites per mosquito) must be performed without the use of a calibrator to normalize the signal.

In our study, the sporozoite loads of naturally infected *Anopheles* collected along the Thai-Myanmar border were very low (60% of the *Anopheles* carried less than <100 sporozoites). This is consistent with previous report in the area [42] and contrasts with the high sporozoite loads observed in African malaria vectors [43–45]. Interestingly our findings showed a lower sporozoite load in Pf infected mosquitoes compared to Pv infected mosquitoes (geometric means of 57 CI95% [53–61] and 137 CI95% [132–141] sporozoites respectively). Baker and colleagues reported similar sporozoite loads in Pv infected malaria vectors [42] but higher Pf sporozoite density compared to our study [42, 46, 47]. These observations suggest that both the prevalence and the density of infection become low when the transmission intensity declines. Moreover the frequency distribution of the sporozoite loads seems to follow a right skewed distribution, which contrasts with the log normal and unimodal distribution of parasite densities during asymptomatic malaria in the same area [48]. Therefore we suspect that the very low densities of infection observed in naturally infected malaria vectors might result from infective blood meals taken from submicroscopic gametocytaemia [49, 50]. Clearly much work has to be done to address the causal relationship between submicroscopic reservoir and malaria transmission along the Thai-Myanmar border.

**Table 7. Descriptive statistic of the sporozoite loads in naturally infected *Anopheles* collected along the Thai-Myanmar border.**

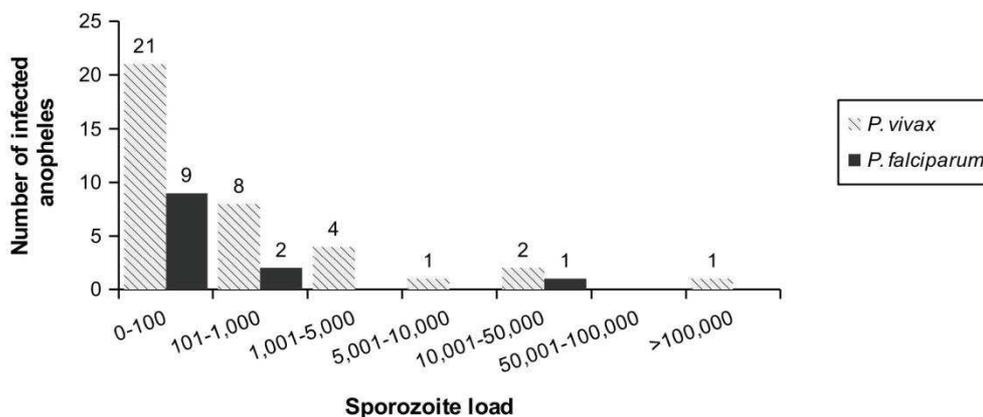
Species	Value for the indicated species				
	Nb. infected specimen <sup>a</sup>	geometric mean [CI95%] <sup>b</sup>	minimum <sup>b</sup>	maximum <sup>b</sup>	median <sup>b</sup>
Pf	12	57[52–60]	9	11,428	28
Pv	37	137 [132–141]	<36	273,787	71

CI, confidence interval; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pv, *Plasmodium vivax*.

<sup>a</sup> Nb. infected specimen: number of *Anopheles* naturally infected with *Plasmodium*.

<sup>b</sup> Geometric mean, minimum, maximum and median of the sporozoite load in *Anopheles* naturally infected with *Plasmodium*, expressed in number of sporozoites per mosquito.

doi:10.1371/journal.pone.0159160.t007



**Fig 2. Frequency distribution of the sporozoite loads in naturally infected *Anopheles* collected along the Thai-Myanmar border.** The sporozoite loads in the studied area are very low: 60% (30/49) of the infected *Anopheles* carry less than 100 sporozoites.

doi:10.1371/journal.pone.0159160.g002

### The role of transmission studies in epidemiological trials

An accurate detection of *Plasmodium* in vectors is crucial to evaluate the intensity of malaria transmission (*i.e.* the number of infective bites per person per year). Detection methods need to be sensitive and specific enough to provide an accurate measurement of vector infectivity in low transmission settings where both the prevalence and the density of infection become low [51]. Any false negative or any false positive results would result in a significant bias in the estimation of the transmission's intensity [3, 4]. This is of major concern during epidemiological trials aiming at evaluating the effectiveness of malaria control tools (drugs or vector control) in a context of malaria control and elimination.

### Conclusion

In conclusion, the molecular detection of *Plasmodium* infection in vectors provides essential information on malaria epidemiology that is not accessible by conventional methods (either in clinical or in entomological samples). Unlike diagnosis of malaria in human, few recommendations exist for the assessment of the prevalence and density of *Plasmodium* infection in anopheline vectors. Here we generate accurate data on the performances of five primer sets in order to provide guidance for a better use of molecular methods for *Plasmodium* detection in low malaria transmission settings.

### Supporting Information

**S1 Table. Results of the multiple pairwise Chi-square tests between the score values obtained on Pf and Pv standards.**  
(DOCX)

### Acknowledgments

We thank the Thailand International Development Cooperation Agency (TICA) from the Ministry of Foreign Affairs (MoFA) through the STOPVEC programme for their technical and administrative assistance. We also acknowledge the UMR-224 (MIVEGEC) of the Institut de

- Epub 2012/10/12. doi: [10.1186/1756-3305-5-230](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-230) PMID: [23050856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23050856/); PubMed Central PMCID: [PMC3485129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC3485129/).
16. Yu G, Yan G, Zhang N, Zhong D, Wang Y, He Z, et al. The Anopheles community and the role of *Anopheles minimus* on malaria transmission on the China-Myanmar border. *Parasites & Vectors*. 2013; 6(1):264. info:pmid/24034528.
  17. Ngo CT, Dubois G, Sinou V, Parzy D, Le HQ, Harbach RE, et al. Diversity of *Anopheles* mosquitoes in Binh Phuoc and Dak Nong Provinces of Vietnam and their relation to disease. *Parasit Vectors*. 2014; 7:316. doi: [10.1186/1756-3305-7-316](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-316) PMID: [25008314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25008314/); PubMed Central PMCID: [PMC4227083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC4227083/).
  18. Boissiere A, Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Bayibeki A, Awono-Ambene PH, et al. Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s. in Cameroon. *PLoS One*. 2013; 8(1):e54820. doi: [10.1371/journal.pone.0054820](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054820) PMID: [23349974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23349974/).
  19. Bickersmith SA, Lainhart W, Moreno M, Chu VM, Vinetz JM, Conn JE. A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110(4):573–6. Epub 2015/06/11. doi: [10.1590/0074-02760150031](https://doi.org/10.1590/0074-02760150031) PMID: [26061150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26061150/); PubMed Central PMCID: [PMC4501424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC4501424/).
  20. Rao RU, Huang Y, Bockarie MJ, Susapu M, Laney SJ, Weil GJ. A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009; 103(4):365–70. doi: [10.1016/j.trstmh.2008.07.012](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.07.012) PMID: [18801545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18801545/); PubMed Central PMCID: [PMC2713189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2713189/).
  21. Conway DJ. Molecular epidemiology of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1):188–204. Epub 2007/01/16. doi: [10.1128/cmr.00021-06](https://doi.org/10.1128/cmr.00021-06) PMID: [17223628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17223628/); PubMed Central PMCID: [PMC1797638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC1797638/).
  22. Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price RN, Leimanis M, et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. *Malar J*. 2011; 10:323. doi: [10.1186/1475-2875-10-323](https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-323) PMID: [22034851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22034851/).
  23. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(6):1897–900. doi: [10.1128/jcm.02258-07](https://doi.org/10.1128/jcm.02258-07) PMID: [18400914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18400914/).
  24. Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? *J Clin Microbiol*. 2005; 43(12):5835–41. doi: [10.1128/jcm.43.12.5835-5841.2005](https://doi.org/10.1128/jcm.43.12.5835-5841.2005) PMID: [16333064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16333064/).
  25. Marie A, Boissiere A, Tsapi MT, Poinson A, Awono-Ambene PH, Morlais I, et al. Evaluation of a real-time quantitative PCR to measure the wild *Plasmodium falciparum* infectivity rate in salivary glands of *Anopheles gambiae*. *Malaria journal*. 2013; 12:224. doi: [10.1186/1475-2875-12-224](https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-224) PMID: [23819831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23819831/); PubMed Central PMCID: [PMC3707787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC3707787/).
  26. Sandeu MM, Moussiliou A, Moiroux N, Padonou GG, Massougbodji A, Corbel V, et al. Optimized Pan-species and speciation duplex real-time PCR assays for *Plasmodium* parasites detection in malaria vectors. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52719. doi: [10.1371/journal.pone.0052719](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052719) PMID: [23285168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23285168/); PubMed Central PMCID: [PMC3532469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC3532469/).
  27. Lardeux F, Tejerina R, Aliaga C, Ursic-Bedoya R, Lowenberger C, Chavez T. Optimization of a semi-nested multiplex PCR to identify *Plasmodium* parasites in wild-caught *Anopheles* in Bolivia, and its application to field epidemiological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; 102(5):485–92. doi: [10.1016/j.trstmh.2008.02.006](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.006) PMID: [18358508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18358508/).
  28. Foley DH, Harrison G, Murphy JR, Dowler M, Rueda LM, Wilkerson RC. Mosquito bisection as a variable in estimates of PCR-derived malaria sporozoite rates. *Malar J*. 2012; 11:145. doi: [10.1186/1475-2875-11-145](https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-145) PMID: [22551078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22551078/).
  29. Harrison GF, Foley DH, Rueda LM, Melanson VR, Wilkerson RC, Long LS, et al. *Plasmodium*-specific molecular assays produce uninterpretable results and non-*Plasmodium* spp. sequences in field-collected *Anopheles* vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 89(6):1117–21. doi: [10.4269/ajtmh.12-0581](https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0581) PMID: [24189365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24189365/).
  30. Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franco AS, Snounou G, do Rosario VE. *Plasmodium* sp.: optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp.) samples. *Experimental parasitology*. 2000; 94(4):269–72. doi: [10.1006/expr.2000.4496](https://doi.org/10.1006/expr.2000.4496) PMID: [10831396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10831396/).
  31. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3):1559–82. Epub 2007/04/05. doi: [10.1038/hprot.2006.236](https://doi.org/10.1038/hprot.2006.236) PMID: [17406449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406449/).
  32. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(5):2435–40. doi: [10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005) PMID: [15872277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15872277/); PubMed Central PMCID: [PMC1153761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC1153761/).

Recherche pour le Développement (IRD) and Shoklo Malaria Research Unit (SMRU, Mae Sot) for providing human resources to the project.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: V. Chaumeau DC FN V. Corbel TC. Performed the experiments: V. Chaumeau CA. Analyzed the data: V. Chaumeau DC FN V. Corbel. Contributed reagents/materials/analysis tools: BF SH CA CB NTN. Wrote the paper: V. Chaumeau V. Corbel.

### References

- Garnham PCC. Malaria parasites and other haemosporidia 1966.
- White NJ. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(2):172–3. Epub 2008/01/04. doi: [10.1086/524889](https://doi.org/10.1086/524889) PMID: [18171246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18171246/).
- Snounou G, Pinheiro L, Goncalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, et al. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993; 87(6):649–53. Epub 1993/11/01. PMID: [8296364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8296364/).
- 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. Epub 2011/07/20. doi: [10.1186/1475-2875-10-195](https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-195) PMID: [21767376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21767376/); PubMed Central PMCID: [PMC3160429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3160429/).
- Beier JC, Perkins PV, Koros JK, Onyango FK, Gargan TP, Wirtz RA, et al. Malaria sporozoite detection by dissection and ELISA to assess infectivity of afrotropical Anopheles (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1990; 27(3):377–84. Epub 1990/05/01. PMID: [2185363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2185363/).
- Wilson MD, Ofosu-Okyere A, Okoli AU, McCall PJ, Snounou G. Direct comparison of microscopy and polymerase chain reaction for the detection of Plasmodium sporozoites in salivary glands of mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998; 92(5):482–3. Epub 1998/12/23. PMID: [9861357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9861357/).
- Abonuusum A, Owusu-Daako K, Tannich E, May J, Garms R, Kruppa T. Malaria transmission in two rural communities in the forest zone of Ghana. *Parasitol Res*. 2011; 108(6):1465–71. Epub 2010/12/15. doi: [10.1007/s00436-010-2195-1](https://doi.org/10.1007/s00436-010-2195-1) PMID: [21153839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21153839/).
- Rosenberg R, Maheswary NP. Forest malaria in Bangladesh. II. Transmission by Anopheles dirus. *Am J Trop Med Hyg*. 1982; 31(2):183–91. Epub 1982/03/01. PMID: [7072883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7072883/).
- Adja AM, N'goran EK, Koudou BG, Dia I, Kengne P, Fontenille D, et al. Contribution of Anopheles funestus, An. gambiae and An. nili (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Côte d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011; 105(1):13–24. doi: [10.1179/136485910x12851868780388](https://doi.org/10.1179/136485910x12851868780388) PMID: [21294945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21294945/).
- Alam MS, Chakma S, Khan WA, Glass GE, Mohon AN, Elahi R, et al. Diversity of anopheline species and their Plasmodium infection status in rural Bandarban, Bangladesh. *Parasites & Vectors*. 2012; 5(1):150. info:pmid/22839212.
- Carnevale P, Toto JC, Besnard P, Santos MA, Fortes F, Allan R, et al. Spatio-temporal variations of Anopheles coluzzii and An. gambiae and their Plasmodium infectivity rates in Lobito, Angola. *J Vector Ecol*. 2015; 40(1):172–9. Epub 2015/06/06. doi: [10.1111/jvec.12147](https://doi.org/10.1111/jvec.12147) PMID: [26047198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26047198/).
- Carrara VI, Sirilak S, Thonglairuam J, Rojanawatsirivet C, Proux S, Gilbos V, et al. Deployment of early diagnosis and mefloquine-artesunate treatment of falciparum malaria in Thailand: the Tak Malaria Initiative. *PLoS Med*. 2006; 3(6):e183. Epub 2006/05/25. 05-PLME-RA-0545R2 [pii] doi: [10.1371/journal.pmed.0030183](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030183) PMID: [16719547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16719547/); PubMed Central PMCID: [PMC1470664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1470664/).
- Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, et al. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(8):617–26. doi: [10.1016/S1473-3099\(12\)70081-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70081-6) PMID: [22682536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22682536/).
- Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ*. 1987; 65(1):39–45. Epub 1987/01/01. PMID: [3555879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3555879/); PubMed Central PMCID: [PMC2490858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2490858/).
- Kawada H, Dida GO, Sonye G, Njenga SM, Mwandawiro C, Minakawa N. Reconsideration of Anopheles rivulorum as a vector of Plasmodium falciparum in western Kenya: some evidence from biting time, blood preference, sporozoite positive rate, and pyrethroid resistance. *Parasit Vectors*. 2012; 5:230.

33. Bourgeois N, Boutet A, Bousquet PJ, Basset D, Douard-Enault C, Charachon S, et al. Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in *Plasmodium* sp. infection. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(8):1305–11. doi: [10.1111/j.1469-0691.2009.02933.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02933.x) PMID: [19840032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19840032/).
34. Cunha MG, Medina TS, Oliveira SG, Marinho AN, Povia MM, Ribeiro-dos-Santos AK. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Acta Trop*. 2009; 111(1):35–8. doi: [10.1016/j.actatropica.2009.02.003](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.02.003) PMID: [19426660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426660/).
35. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(3):1214–9. doi: [10.1128/jcm.42.3.1214-1219.2004](https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.1214-1219.2004) PMID: [15004078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15004078/)
36. Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(1):35–8. Epub 1998/12/17. PMID: [9854060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9854060/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC84160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMCPMC84160/).
37. Andolina C, Landier J, Carrara V, Chu CS, Franetich JF, Roth A, et al. The suitability of laboratory-bred *Anopheles cracens* for the production of *Plasmodium vivax* sporozoites. *Malar J*. 2015; 14:312. Epub 2015/08/12. doi: [10.1186/s12936-015-0830-0](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0830-0) PMID: [26259952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26259952/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc4531391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531391/).
38. de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97(4):387–90. Epub 2004/07/21. PMID: [15259463](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15259463/).
39. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Brun S, Dalle F, et al. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(9):3216–22. doi: [10.1128/jcm.02500-09](https://doi.org/10.1128/jcm.02500-09) PMID: [20610670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610670/).
40. Varlet-Marie E, Sterkers Y, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, et al. Characterization and multicentric validation of a common standard for *Toxoplasma gondii* detection using nucleic acid amplification assays. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(11):3952–9. Epub 2014/09/05. doi: [10.1128/jcm.01906-14](https://doi.org/10.1128/jcm.01906-14) PMID: [25187637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25187637/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc4313224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313224/).
41. Morelle C, Varlet-Marie E, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Pelloux H, Bastien P, et al. Comparative assessment of a commercial kit and two laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(12):3977–82. doi: [10.1128/jcm.01959-12](https://doi.org/10.1128/jcm.01959-12) PMID: [23035184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23035184/).
42. Baker EZ, Beier JC, Meek SR, Wirtz RA. Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections in Thai-Kampuchean *Anopheles* (Diptera: Culicidae) by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Entomol*. 1987; 24(5):536–41. Epub 1987/09/01. PMID: [3312607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3312607/).
43. Kabiru EW, Mbogo CM, Muiruri SK, Ouma JH, Githure JI, Beier JC. Sporozoite loads of naturally infected *Anopheles* in Kilifi District, Kenya. *J Am Mosq Control Assoc*. 1997; 13(3):259–62. Epub 1998/02/12. PMID: [9383768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9383768/).
44. Collins FH, Zavala F, Graves PM, Cochrane AH, Gwadz RW, Akoh J, et al. First field trial of an immunoradiometric assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 1984; 33(4):538–43. Epub 1984/07/01. PMID: [6383093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6383093/).
45. Beier JC, Onyango FK, Ramadhan M, Koros JK, Asiago CM, Wirtz RA, et al. Quantitation of malaria sporozoites in the salivary glands of wild Afrotropical *Anopheles*. *Med Vet Entomol*. 1991; 5(1):63–70. Epub 1991/01/01. PMID: [1768902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1768902/).
46. Burkot TR, Graves PM, Cattán JA, Wirtz RA, Gibson FD. The efficiency of sporozoite transmission in the human malarial, *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Bull World Health Organ*. 1987; 65(3):375–80. Epub 1987/01/01. PMID: [3311441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3311441/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC4290998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290998/).
47. Wirtz RA, Burkot TR, Graves PM, Andre RG. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J Med Entomol*. 1987; 24(4):433–7. Epub 1987/07/01. PMID: [3305949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3305949/).
48. Imwong M, Stepniewska K, Tripura R, Peto TJ, Lwin KM, Vihokhern B, et al. Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. *J Infect Dis*. 2016; 213(8):1322–9. Epub 2015/12/19. doi: [10.1093/infdis/jiv596](https://doi.org/10.1093/infdis/jiv596) PMID: [26681777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26681777/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC4799672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4799672/).
49. Jeffery GM, Eyles DE. Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* as related to gametocyte density and duration of infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1955; 4(5):781–9. Epub 1955/09/01. PMID: [13259002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13259002/).
50. Jeffery GM. The infection of mosquitoes by *Plasmodium vivax* (Chesson strain) during the early primary parasitemias. *Am J Trop Med Hyg*. 1952; 1(4):612–7. Epub 1952/07/01. PMID: [14943909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14943909/).
51. Imwong M, Nakeesathit S, Day NP, White NJ. A review of mixed malaria species infections in anopheline mosquitoes. *Malar J*. 2011; 10:253. doi: [10.1186/1475-2875-10-253](https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-253) PMID: [21880138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21880138/).

RESEARCH

Open Access



# Insecticide resistance in malaria vectors along the Thailand-Myanmar border

Victor Chaumeau<sup>1,2,3,4\*</sup>, Dominique Cerqueira<sup>4</sup>, John Zadrozny<sup>4</sup>, Praphan Kittiphanakun<sup>3</sup>, Chiara Andolina<sup>3,5</sup>, Theeraphap Chareonviriyaphap<sup>4</sup>, François Nosten<sup>3,5</sup> and Vincent Corbel<sup>2,4\*</sup>

## Abstract

**Background:** There is a paucity of data about the susceptibility status of malaria vectors to Public Health insecticides along the Thailand-Myanmar border. This lack of data is a limitation to guide malaria vector-control in this region. The aim of this study was to assess the susceptibility status of malaria vectors to deltamethrin, permethrin and DDT and to validate a simple molecular assay for the detection of knock-down resistance (kdr) mutations in the study area.

**Methods:** *Anopheles* mosquitoes were collected in four sentinel villages during August and November 2014 and July 2015 using human landing catch and cow bait collection methods. WHO susceptibility tests were carried out to measure the mortality and knock-down rates of female mosquitoes to deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%) and DDT (4%). DNA sequencing of a fragment of the voltage-gated sodium channel gene was carried out to identify knock-down resistance (kdr) mutations at position 1014 in mosquitoes surviving exposure to insecticides.

**Results:** A total of 6295 *Anopheles* belonging to ten different species were bioassayed. Resistance or suspected resistance to pyrethroids was detected in *An. barbirostris* (s.l.) (72 and 84% mortality to deltamethrin ( $n = 504$ ) and permethrin ( $n = 493$ ) respectively), *An. hyrcanus* (s.l.) (33 and 48% mortality to deltamethrin ( $n = 172$ ) and permethrin ( $n = 154$ ), respectively), *An. jamesii* (87% mortality to deltamethrin,  $n = 111$ ), *An. maculatus* (s.l.) (85 and 97% mortality to deltamethrin ( $n = 280$ ) and permethrin ( $n = 264$ ), respectively), *An. minimus* (s.l.) (92% mortality,  $n = 370$ ) and *An. vagus* (75 and 95% mortality to deltamethrin ( $n = 148$ ) and permethrin ( $n = 178$ ), respectively). Resistance or suspected resistance to DDT was detected in *An. barbirostris* (s.l.) (74% mortality,  $n = 435$ ), *An. hyrcanus* (s.l.) (57% mortality,  $n = 91$ ) and *An. vagus* (97% mortality,  $n = 133$ ). The L1014S kdr mutation at both heterozygous and homozygous state was detected only in *An. peditaeniatus* (Hyrceanus Group).

**Conclusion:** Resistance to pyrethroids is present along the Thailand-Myanmar border, and it represents a threat for malaria vector control. Further investigations are needed to better understand the molecular basis of insecticide resistance in malaria vectors in this area.

**Keywords:** Malaria, Thailand-Myanmar border, *Anopheles*, Pyrethroids, Insecticide resistance, kdr mutation, Southeast Asia

## Background

Vector-borne diseases account for 17% of all infectious diseases, causing more than 1 million deaths annually [1]. Malaria causes more than 600,000 deaths every year, mostly in children under 5 years [2]. Vector-control is an essential component of malaria control, and it relies mainly on long-lasting insecticidal nets (LLINs) and

indoor residual spraying (IRS) [3]. In low transmission settings, especially where residual transmission (i.e. transmission that is not prevented by LLINs and IRS) is prominent, LLINs and IRS must be supplemented by other methods to target early feeding, exophagic and zoophagic malaria vectors [4].

Pyrethroids are widely used for vector control because of their strong insecticidal effect and their low toxicity to mammals [5]. They induce a rapid “knock-down” (KD), and they have irritant and excito-repellent properties against susceptible mosquitoes [6]. Sadly, pyrethroid

\* Correspondence: victor@shoklo-unit.com; vincent.corbel@ird.fr

<sup>1</sup>Centre hospitalier universitaire de Montpellier, Montpellier, France

<sup>2</sup>Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** 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.

resistance in malaria vectors has been identified in at least 64 countries [5] and is spreading worldwide [7] because of the intense selection pressure caused by agricultural practices [8] and the large-scale implementation of malaria vector control interventions [7]. Resistance has been implicated in the reduced efficacy of vector control interventions such as IRS and LLIN [9, 10] and malaria resurgence [11–17]. Routine monitoring of resistance and detection of temporal changes in both prevalence and intensity of resistance are needed to guide malaria vector interventions and resistance management plan [18].

Compared to Africa, there is a notable lack of data on insecticide resistance in Southeast Asian malaria vectors. Previous report of resistance in malaria vectors from the GMS are summarised in Table 1. Resistance to several pyrethroids and decreased susceptibility to DDT were described for *An. minimus* (s.s.) in Vietnam, Thailand and Cambodia [19, 20]. Resistance to organophosphate was reported in *An. maculatus* and *An. sawadwongporni* in northern Thailand [21]. Suspected resistance to pyrethroids (Vietnam) and DDT (Cambodia) was described in *An. dirus* (s.s.) [19] and suspected resistance to DDT and fenitrothion were reported in laboratory reared *An. cracens* from Thailand and Malaysia [22]. High levels of resistance to DDT and permethrin were reported in *An. vagus* in the Greater Mekong Subregion (GMS) [19, 23].

The mechanisms of insecticide resistance in mosquitoes are multiple and include behavioural and physiological changes leading to insecticide avoidance, reduced penetration, sequestration, target site modification (knock-down resistance or kdr mutation for pyrethroids and DDT) and increased biodegradation [13, 24, 25]. With the exception of *An. sinensis* [26–30], resistance mechanisms remain largely unknown in Southeast Asian malaria vectors. In this region, metabolic resistance is thought to play a major

role compared to target site mutations [27, 31]. Only a few studies have been conducted to understand the pathways involved in metabolic resistance, and they were limited to a laboratory adapted deltamethrin-resistant strain of *An. minimus* (s.s.) from Thailand [32–34]. Kdr mutations were reported in several anopheline species [23, 35] but were not detected in the major malaria vectors in the GMS [31].

The aim of the present study is to investigate the susceptibility status of malaria vectors to Public Health insecticides (deltamethrin, permethrin and DDT) along the Thailand-Myanmar border (TMB), and to assess the presence of kdr mutations [35]. Resistance data are deemed important to design more effective vector control interventions in the area.

## Methods

### Study sites and mosquito collection

Mosquito collections were carried out in four Karen villages located on the Myanmar side of the TMB, namely Htoo Pyin Nyar (TPN, 17°14'N, 98°29'E), Tar Au Ta (TOT, 16°36'N, 98°57'E), Ka Nu Hta (KNH, 17°18'N, 98°24'E) and Htee Kaw Taw (HKT, 16°85'N, 98°47'E) (Fig. 1). Three entomological surveys were conducted in August and November 2014 and July 2015 using human landing catch (HLC) and cow-bait collection (CBC) methods. Mosquitoes were collected individually using 5 ml plastic tubes and shipped daily to the Shoklo Malaria Research Unit (Mae Sot, Thailand). *Anopheles* were individually transferred to a clean and transparent plastic tube while still alive and identified by morphology [36]. The mosquitoes belonging to different species were separated into different cups and reared for 1–4 days until enough specimens were collected to run the bioassay. Mosquitoes collected by HLC and CBC were pooled together to increase the sample size.

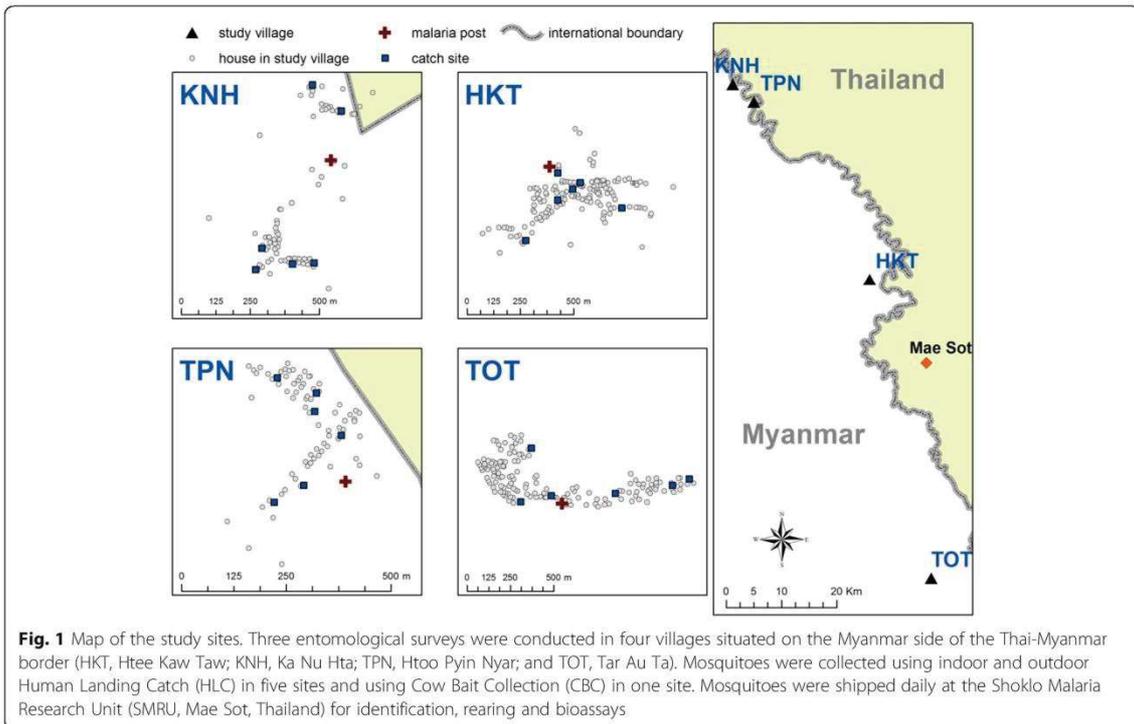
**Table 1** Insecticide resistance in malaria vectors from the Greater Mekong Subregion

Species	Insecticide	Site	Date	Reference
<i>An. minimus</i> (s.s.)	DDT	Thailand, Vietnam, Cambodia	1999, 2003, 2008	[19, 20, 52]
	Pyrethroids <sup>a</sup>	Vietnam	2008	[19]
<i>An. maculatus</i> (s.s.) and <i>An. sawadwongporni</i>	DDT	Thailand	1999	[52]
	Methylparathion	Thailand	2005	[21]
<i>An. dirus</i> (s.s.)	DDT	Cambodia	2008	[19]
	Pyrethroids <sup>b</sup>	Vietnam	2008	[19]
<i>An. cracens</i>	DDT, fenitrothion	Thailand and Malaysia	1984	[22]
<i>An. vagus</i>	DDT, pyrethroids <sup>c</sup>	Thailand, Vietnam, Cambodia	2008	[19]

<sup>a</sup> alpha-cypermethrin, lambda-cyhalothrin and permethrin

<sup>b</sup> alpha-cypermethrin and lambda-cyhalothrin

<sup>c</sup> alpha-cypermethrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin and permethrin



#### Susceptibility tests

Susceptibility tests were performed following the WHO guidelines for insecticide resistance monitoring in malaria vectors [37]. All materials used in this study were provided by the Vector Control Research Unit (VCRU), Universiti Sains Malaysia. Wild caught female *Anopheles* were exposed for 60 min to papers impregnated with deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%) or DDT (4%). The susceptibility status of two *Anopheles* laboratory strains [*An. minimus* (*s.s.*) from Kasetsart University, Bangkok, Thailand and *An. scanloni*, Shoklo Malaria Research Unit, Mae Sot, Thailand] were also determined (50 mosquitoes for each insecticide and the control). The number of knocked-down (KD) mosquitoes was recorded every 5 min for 60 min. The females were then transferred into holding tubes, provided with a sugar solution (10%), and kept at 26 °C with a relative humidity of 80%. Mortality was recorded after a 24 h observation period. Mosquitoes exposed for 1 h to paper impregnated with the carrier (silicone oil mixed with acetone) were used as controls. Tests were replicated when a sufficient number of specimens were collected. Results were interpreted as per WHO guidelines: confirmed resistance (mortality below 90%), suspected resistance (mortality between 90 and 98%) and susceptible (mortality over 98%) [37].

#### *kdr* mutation detection

DNA was extracted from a leg of each specimen as previously described [38]. Amplification of a 300 bp segment of the voltage-gated sodium channel (VGSC) gene flanking the 1014 position was performed using the primer pair Ag-F *kdr* (5'-GAC CAT GAT CTG CCA AGA TGG AAT-3') and An-*kdr*-R2 (5'-GAG GAT GAA CCG AAA TTG GAC-3') described by Syafrudin et al. [35]. The PCR mix was composed of 1 unit of Tfi DNA polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, United States), 200 μM of dNTP mix (Invitrogen) which corresponded to 200 μM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), and 400 μM of each primer. The PCR was conducted in a total reaction volume of 50 μl (3 μl of DNA template and 47 μl of PCR mix). The thermocycling protocol consisted in a first cycle of 5 min at 94 °C then 30 s at 45 °C, followed by 29 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C and 1 min at 72 °C. The PCR product was sequenced by Macrogen™ (Seoul, South-Korea) using both primers. Each sequence was checked and cleaned manually using the Bioedit software version 7.1.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). A consensus sequence was generated for each specimen using the CAPS3 sequence assembly program [39] and then aligned using the Clustal Omega multiple sequence alignment program [40–42] (GenBank accession numbers KY677707–KY677716).

### Molecular identification of *Anopheles* by ITS2 sequencing

Amplification of the ITS2 was performed using the primer pair ITS2A (5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA T-3') and ITS2B (5'-ATG CTT AAA TTY AGG GGG T-3') described by Beebe et al. [43]. The PCR mix was composed of 1 unit of Goldstar DNA polymerase (Eurogentec™, Seraing, Belgium) and 400 μM of each primer. The PCR was conducted in a total reaction volume of 25 μl (4 μl of DNA template and 21 μl of PCR mix). The thermocycling protocol consisted in an initial activation step of 1 min at 94 °C, followed by 40 amplification cycles of 20 s at 94 °C, 20 s at 51 °C and 30 s at 72 °C, and a final elongation step of 30 s at 72 °C. The PCR product was sequenced by Macrogen™ (Seoul, South-Korea) using the ITS2A primer. *Anopheles* species was determined using the blastn algorithm of the online BLAST™ software [44] (accession numbers KY677698–KY677706).

### Data analysis

Adult mortality rate was corrected by the formula of Abbott [45] in the case of mortality > 5% in the control. Tests with > 20% mortality in the control were excluded from the analysis. Knock-down time 50 (KDT50) was determined by the log-probit method described by Finney [46] using R software [47]. The R code used to determine the knock-down time 50 (KDT50) and its confidence interval were adapted from Johnson et al. 2013 [48].

## Results

### Bioassays

In total, 5896 *Anopheles* (belonging to 9 groups of species) were collected in the villages and used to assess the insecticidal activity of deltamethrin 0.05% ( $n = 1,805$ ), permethrin 0.75% ( $n = 1483$ ) and DDT 4% ( $n = 1202$ ) (Tables 2, 3 and 4). A total of 1406 specimens were used for the control (Tables 2, 3 and 4). Overall, the mean mortality in the control batch was 8.4% (119/1406), 3 of 46 tests were excluded from the analysis because the control mortality was > 20% (91/5896 specimens).

Mortality and knock-down (KD) rates are reported in Fig. 2 whereas the kinetic of KD (evolution of the KD rate over a 60 min observation period) is shown in Fig. 3 (data were analysed at the species complex or group when accurate identification at species level could not be done). Laboratory strain of *An. minimus* (*s.s.*) was susceptible to all insecticides whereas laboratory strain of *An. scanloni* was resistant to DDT (mortality of 84%, 42/50). The KDT50 of these strains were 10, 13 and 38 min for *An. minimus* (*s.s.*) and 20, 26 and 63 min for *An. scanloni* with deltamethrin, permethrin and DDT, respectively. Suspected resistance to deltamethrin was detected in wild caught *An. minimus* (*s.l.*) (92% mortality, 339/370). Resistance to deltamethrin and suspected resistance to permethrin were detected in *An. maculatus* (*s.l.*) (85 and 97% mortality, 239/280 and 257/264, respectively). *Anopheles barbirostris* (*s.l.*) and *An. hyrcanus*

**Table 2** Summary results of the bioassays with deltamethrin 0.05%

Taxa	N <sup>a</sup>	% Mortality <sup>b</sup>	% KD <sup>c</sup>	KDT50 <sup>d</sup>	Status <sup>e</sup>
<i>An. scanloni</i> (laboratory strain)	50	100 (na)	100 (na)	19.6 (18.4–20.7)	S
<i>An. minimus</i> ( <i>s.s.</i> ) (laboratory strain)	50	100 (na)	100 (na)	10.4 (9.4–11.4)	S
<i>An. annularis</i> ( <i>s.l.</i> )	40	100 (na)	100 (na)	14.4 (13.1–15.6)	S
<i>An. barbirostris</i> ( <i>s.l.</i> )	504	72 (68–76)	85 (82–88)	30.5 (28.7–32.4)	R
<i>An. hyrcanus</i> ( <i>s.l.</i> )	172	33 (26–40)	27 (20–33)	131.3 (83–378.1)	R
<i>An. jamesii</i> ( <i>s.l.</i> )	111	87 (81–94)	97 (94–100)	14 (11.7–16.2)	R
<i>An. kochi</i>	43	98 (93–100)	100 (na)	14.6 (13–16)	S
<i>An. maculatus</i> ( <i>s.l.</i> )	280	85 (81–89)	89 (85–93)	18.8 (15.8–21.6)	R
<i>An. minimus</i> ( <i>s.l.</i> )	370	92 (89–94)	99 (98–100)	15.4 (14.3–16.5)	SR
<i>An. tessellatus</i>	83	98 (94–100)	99 (96–100)	17.7 (16.6–18.8)	S
<i>An. vagus</i>	148	75 (68–82)	95 (91–98)	21.3 (19–23.4)	R

<sup>a</sup> N: number of mosquito phenotyped

<sup>b</sup> % Mortality: mortality rate (expressed in %) after 1 h of exposure to insecticide, recorded following a 24 h observation period; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the mean mortality rate

<sup>c</sup> % KD: rate of mosquitoes “knocked down” (KD, expressed in %) recorded after 1 h of exposure to insecticide; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the mean KD rate

<sup>d</sup> TKD50: time (expressed in minutes) necessary to “knock down” 50% of the mosquitoes; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the TKD50

<sup>e</sup> Status: resistance status as defined by WHO [37]. Briefly, a mortality in the range 98–100% indicates susceptibility; a mortality between 90 and 97% indicates suspected resistance; a mortality < 90% indicates confirmed resistance as long as 100 specimens have been phenotyped

Abbreviations: na, not applicable; R, resistant; S, susceptible; SR, suspected resistance

**Table 3** Summary results of the bioassays with permethrin 0.75%

Taxa	N <sup>a</sup>	% Mortality <sup>b</sup>	% KD <sup>c</sup>	KDT50 <sup>d</sup>	Status <sup>e</sup>
<i>An. scanloni</i> (laboratory strain)	50	100 (na)	98 (94–100)	25.6 (24.2–27)	S
<i>An. minimus</i> (s.s.) (laboratory strain)	50	100 (na)	100 (na)	13.5 (11.5–15.3)	S
<i>An. annularis</i> (s.l.)	0	na	na	na	na
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	493	84 (81–88)	90 (88–93)	26.6 (25.8–27.5)	R
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	154	48 (40–56)	32 (24–39)	116.2 (83–212.1)	R
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	54	98 (95–100)	100 (na)	11.3 (10.3–12.2)	S
<i>An. kochi</i>	0	na	na	na	na
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	264	97 (95–99)	97 (95–99)	16.7 (15.6–17.8)	SR
<i>An. minimus</i> (s.l.)	340	98 (96–99)	99 (98–100)	15 (14.4–15.6)	S
<i>An. tessellatus</i>	0	na	na	na	na
<i>An. vagus</i>	178	95 (92–98)	100 (na)	15.3 (14.3–16.3)	SR

<sup>a</sup> N: number of mosquito

<sup>b</sup> % Mortality: mortality rate (expressed in %) after 1 h of exposure to insecticide, recorded following a 24 h observation period; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the mean mortality rate

<sup>c</sup> % KD: rate of mosquitoes “knocked down” (KD, expressed in %) recorded after 1 h of exposure to insecticide; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the mean KD rate

<sup>d</sup> TKD50: time (expressed in minutes) necessary to “knock down” 50% of the mosquitoes; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the TKD50

<sup>e</sup> Status: resistance status as defined by WHO [37]. Briefly, a mortality in the range 98–100% indicates susceptibility; a mortality between 90 and 97% indicates suspected resistance; a mortality < 90% indicates confirmed resistance as long as 100 specimens have been phenotyped

Abbreviations: na, not applicable; R, resistant; S, susceptible; SR, suspected resistance

(s.l.) were resistant to all insecticides (mortality rates < 90%). *Anopheles vagus* was resistant to deltamethrin (75% mortality, 111/148) and suspected resistance to permethrin and DDT was also reported for this species (95 and 97% mortality, 169/178 and 123/133, respectively). Resistance to deltamethrin was detected in *An. jamesii* (s.l.) (87%, 97/111) whereas *An. annularis* (s.l.),

*An. tessellatus* and *An. kochi* were susceptible to this pyrethroid insecticide. The susceptibility status of these latter species to permethrin and DDT could not be determined due to a very low sample size. Overall, the KDT50 varied from 10 to 131 min, from 13 to 116 min and 23 to 84 min for deltamethrin, permethrin and DDT, respectively (Tables 2, 3 and 4).

**Table 4** Summary results of the bioassays with DDT 4%

Taxa	N <sup>a</sup>	% Mortality <sup>b</sup>	% KD <sup>c</sup>	KDT50 <sup>d</sup>	Status <sup>e</sup>
<i>An. scanloni</i> (laboratory strain)	50	84 (74–94)	42 (28–56)	63.2 (59.8–69.7)	S
<i>An. minimus</i> (s.s.) (laboratory strain)	50	100 (na)	98 (94–100)	38.3 (36.9–39.7)	R
<i>An. annularis</i> (s.l.)	0	na	na	na	na
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	435	74 (70–78)	49 (45–54)	61 (59.1–63.2)	R
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	91	57 (47–67)	30 (20–39)	84.2 (70.9–112.1)	R
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	59	98 (95–100)	88 (80–96)	33.3 (31.3–35.2)	S
<i>An. kochi</i>	0	na	na	na	na
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	239	99 (97–100)	9 (94–99)	25.5 (23.4–27.4)	S
<i>An. minimus</i> (s.l.)	245	100 (na)	100 (na)	23.4 (21.8–24.9)	S
<i>An. tessellatus</i>	0	na	na	na	na
<i>An. vagus</i>	133	97 (94–100)	91 (86–96)	35.3 (34–36.6)	SR

<sup>a</sup> N: number of mosquito phenotyped

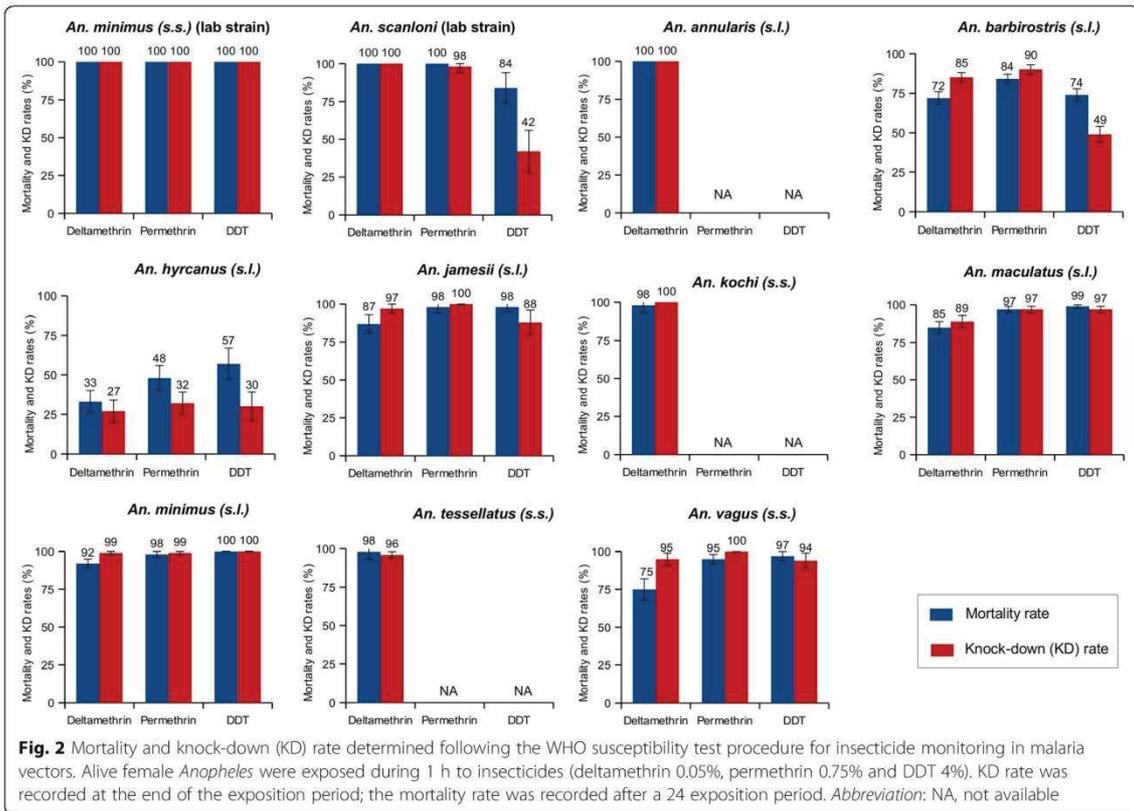
<sup>b</sup> % Mortality: mortality rate (expressed in %) after 1 h of exposure to insecticide, recorded following a 24 h observation period; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the mean mortality rate

<sup>c</sup> % KD: rate of mosquitoes “knocked down” (KD, expressed in %) recorded after 1 h of exposure to insecticide; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the mean KD rate

<sup>d</sup> TKD50: time (expressed in minutes) necessary to “knock down” 50% of the mosquitoes; the values between parentheses indicate the 95% confidence interval of the TKD50

<sup>e</sup> Status: resistance status as defined by WHO [37]. Briefly, a mortality in the range 98–100% indicates susceptibility; a mortality between 90 and 97% indicates suspected resistance; a mortality < 90% indicates confirmed resistance as long as 100 specimens have been phenotyped

Abbreviations: na, not applicable; R, resistant; S, susceptible; SR, suspected resistance



**Kdr detection**

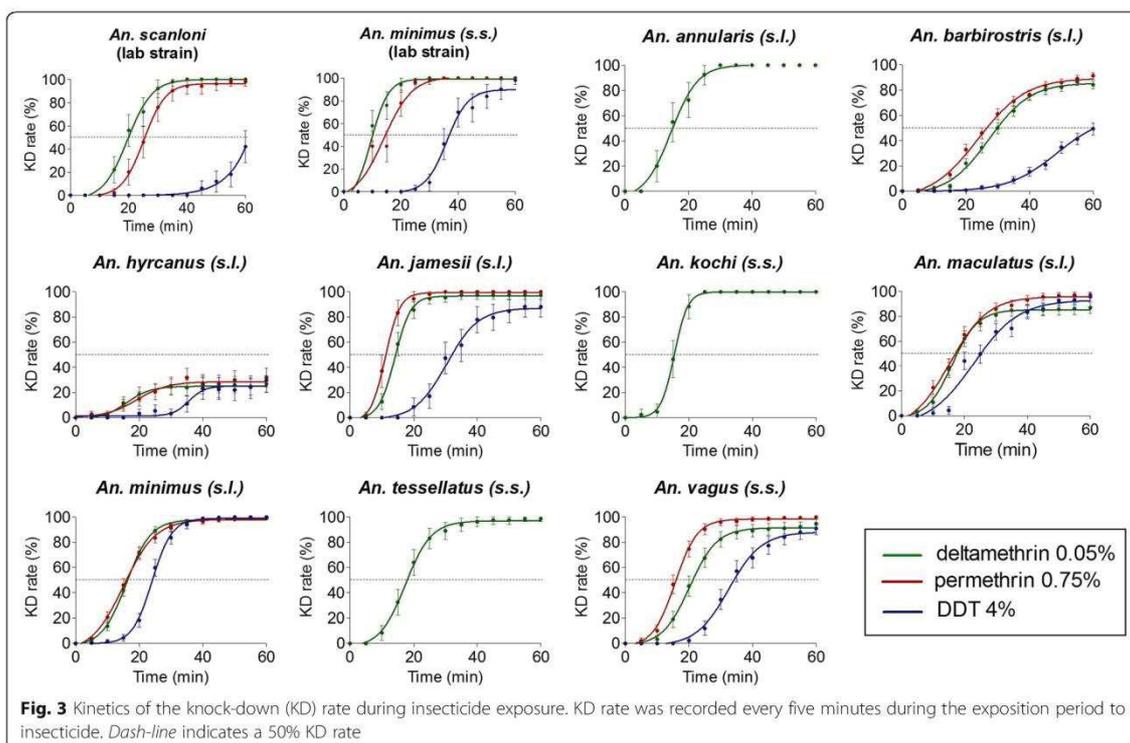
A PCR assay for kdr detection developed by Syafrudin et al. [35] was first validated on ten species complexes collected along the TMB using two specimens per species (Fig. 4). The presence of kdr mutations was assessed in specimens surviving exposure to insecticide (post bioassays) to increase the chance to detect SNPs. The presence of kdr mutation was not investigated in *An. annularis* (s.l.), *An. kochi* and *An. tessellatus* considering the high mortality rates observed in bioassays (Table 5). The sequence alignment of the PCR product is presented in Fig. 4a. The non-synonymous L1014S mutation was found in *An. hyrcanus* (s.l.) (Fig. 4a, b) at both heterozygous (19%, 6/31) or homozygous state (10%, 3/31) (Table 5). No kdr mutations were detected in other anopheline species (Table 5).

**Discussion**

In this study, we assessed the susceptibility status of several anopheline taxa to three public health insecticides (deltamethrin, permethrin and DDT) along the TMB. To our knowledge, this is the first study reporting the susceptibility status of *Anopheles* mosquitoes to pesticides used for malaria control in this area. These data are important

in the context of malaria elimination to select the most appropriate insecticides for vector control.

Bioassays were performed following the WHO guidelines for insecticide resistance monitoring in malaria vectors [37]. However, the WHO recommends the use of unfed 2–5 days old female *Anopheles* to assess the susceptibility of wild malaria vectors populations to insecticides. This implies to collect a sufficient number of larvae, which was not possible in the present study considering the difficulty of accessing to the collection sites. Since only adults were collected to run the bioassays, the mortality might be underestimated [49, 50]. Another limitation of the study was the identification of malaria vectors at the species level. Indeed most of *Anopheles* collected in the villages belong to complexes of sibling species i.e. groups of several species that are not distinguishable using conventional morphology criterions [51]. Previous data in the same study villages showed that *An. minimus* (s.s.) represents >99% of the Minimus complex whereas *An. maculatus* (s.s.) and *An. sawadwongporni* were predominant within Maculatus group (unpublished data). Moreover, it was not always possible to reach the sample size recommended by the WHO for each test (80 mosquitoes for each insecticide



and at least 20 mosquitoes for the control). Thus the interpretation of the results must take into account the sample size and the corresponding error bars.

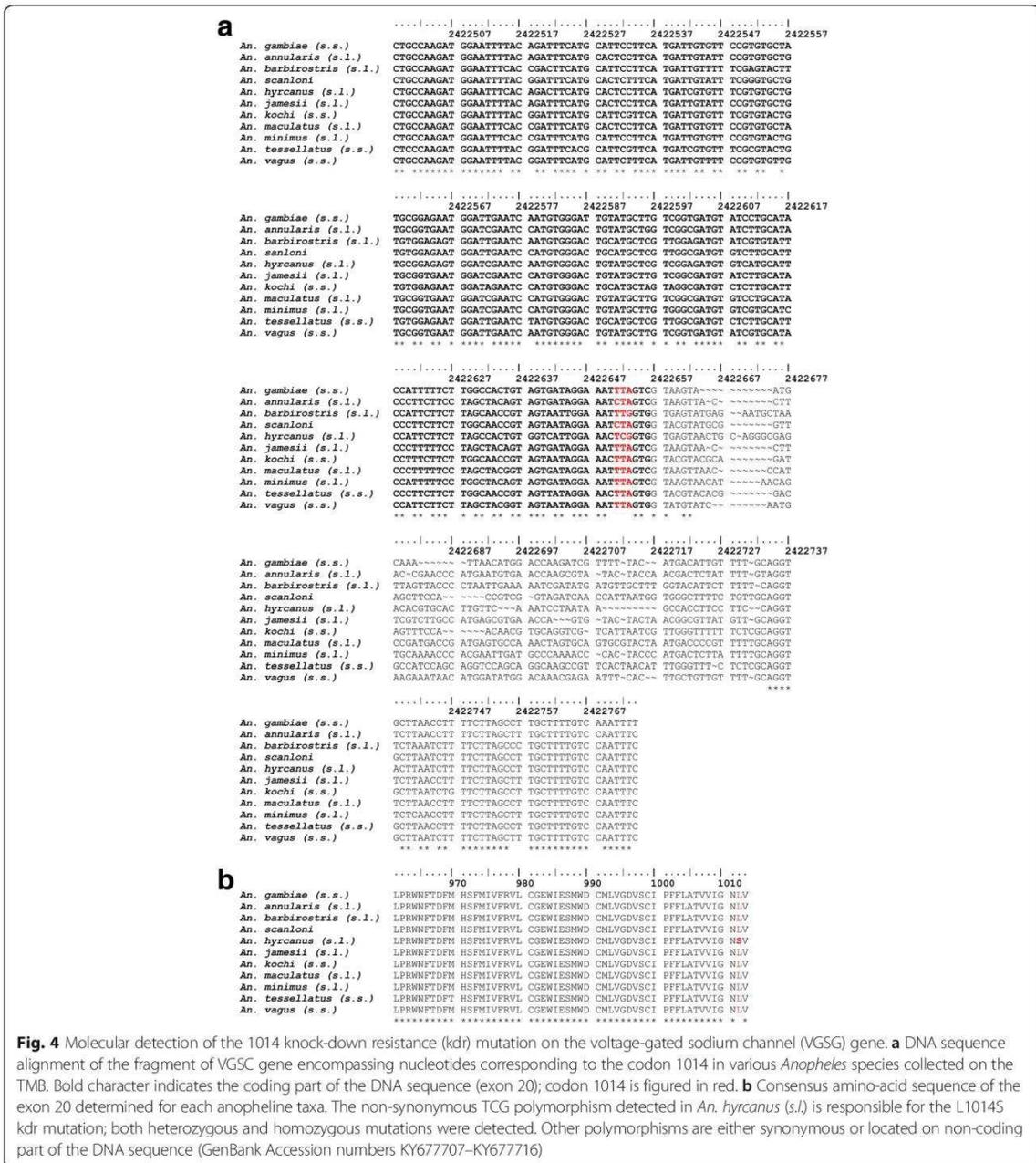
In this study, suspected resistance to deltamethrin was detected in *An. minimus* (s.s.). Resistance to DDT was previously reported in Cambodia, Vietnam and Thailand [19, 20, 52] whereas resistance to pyrethroids (permethrin, alpha-cypermethrin and lambda-cyhalothrin) was only detected in Vietnam [19]. Few data have been collected so far on the susceptibility of *An. maculatus* (s.s.) and *An. sawadwongporni* to insecticides. In Thailand, resistance to DDT was documented by the Offices of Vector-Borne Diseases Control [52]. Overgaard et al. [21] later reported resistance of both sibling species to methyl-parathion in the Northern part of the country. No resistance to organophosphates, pyrethroids and DDT was detected however in neighbouring Malaysia [53, 54].

*Anopheles barbirostris* (s.l.) (confirmed secondary vector) and *An. hyrcanus* (s.l.) (suspected vector) were resistant to all insecticides. Pyrethroid resistance in *An. barbirostris* has only been described before in studies conducted in Indonesia [35, 55] and Sri Lanka [56]. Confirmed resistance to deltamethrin and suspected resistance to permethrin and DDT in *An. vagus* (suspected vector) are in agreement with a previous report showing a high level of resistance within the Hyrcanus group and

in *An. vagus* [19, 23]. Unfortunately, it was not possible to generate data on the susceptibility of primary vectors belonging to the Dirus complex because of the low number of specimens collected.

Overall resistance to pyrethroids was reported in six out of the ten species complexes tested along TMB which suggests a strong selection pressure in the studied area. In northern Thailand, Overgaard et al. [21] previously demonstrated that resistance is likely to arise from the intense use of pesticides for agriculture (especially for organophosphates compounds, a class of insecticides that has never been used for vector control purposes). This must be taken into account by policy makers as additional use of insecticide (especially pyrethroids) for vector-control may lead to a rapid selection of a resistant phenotype as observed previously in Africa [8, 57]. Further efforts should be made to document the susceptibility status of malaria vectors to other classes of insecticides (such as carbamates, organophosphates and insect growth regulators) that could be used as an alternative to pyrethroids in the frame of resistance management strategies [58–60].

In this study, we briefly investigated the molecular mechanisms involved in pyrethroid and DDT resistance by using a PCR assay adapted from Syafruddin et al. [35]. The *kdr* mutation is known to induce a cross-resistance to



**Fig. 4** Molecular detection of the 1014 knock-down resistance (kdr) mutation on the voltage-gated sodium channel (VGSC) gene. **a** DNA sequence alignment of the fragment of VGSC gene encompassing nucleotides corresponding to the codon 1014 in various *Anopheles* species collected on the TMB. Bold character indicates the coding part of the DNA sequence (exon 20); codon 1014 is figured in red. **b** Consensus amino-acid sequence of the exon 20 determined for each anopheline taxa. The non-synonymous TCG polymorphism detected in *An. hyrcanus* (s.l.) is responsible for the L1014S kdr mutation; both heterozygous and homozygous mutations were detected. Other polymorphisms are either synonymous or located on non-coding part of the DNA sequence (GenBank Accession numbers KY677707–KY677716)

both DDT and pyrethroids, and to be associated with an increase in the KDT50 values [6, 27]. Therefore we suspected this mechanism to be involved in the resistance of *An. hyrcanus* (s.l.) to the insecticides tested. We reported the occurrence of the L1014S kdr mutation in *An. hyrcanus* (s.l.) at a low frequency in the specimens surviving insecticide exposure. Specimens carrying a kdr

mutation were further identified as *An. peditaeniatus* using molecular methods (data not shown) (Accession numbers: KY677698–KY677706). This finding confirms the previous report of the L1014S mutation in *An. peditaeniatus* populations from Southern Vietnam and Cambodia [23]. However, the occurrence of kdr mutations in other positions cannot be ruled out. For example,

**Table 5** *kdr* mutation at position 1014 in the voltage-gated sodium channel (VGSG) gene

Taxa	N <sup>a</sup>	1014 L <sup>b</sup>	L1014S <sup>c</sup>	
			Homozygous	Heterozygous
<i>An. annularis</i> (s.l.)	2	2	0	0
<i>An. barbirostris</i> (s.l.)	42	42	0	0
<i>An. hyrcanus</i> (s.l.)	31	22 (71%)	3 (10%)	6 (19%)
<i>An. jamesii</i> (s.l.)	55	55	0	0
<i>An. kochi</i>	2	2	0	0
<i>An. maculatus</i> (s.l.)	49	49	0	0
<i>An. minimus</i> (s.l.)	44	44	0	0
<i>An. tessellatus</i>	2	2	0	0
<i>An. vagus</i>	50	50	0	0

<sup>a</sup> N, number of specimens genotyped

<sup>b</sup> Number of specimens (%) carrying the wild-type genotype (homozygous 1014 L)

<sup>c</sup> Number of specimens (%) carrying the homozygous or heterozygous 1014 L mutation

another *kdr* mutation (N1575Y) occurring within the domain VIII of the VGSG gene was found in *An. gambiae* from West Africa occurring in a V1014F haplotypic background [61]. Several authors have stressed previously that the absence of *kdr* mutations in most of the *Anopheles* species tested suggests that metabolic resistance is probably the main route of insecticide resistance in malaria vectors in Southeast Asia (i.e. *An. minimus* (s.l.), *An. maculatus* (s.l.) and *An. dirus* (s.l.)) [27, 31]. The metabolic basis of insecticide resistance in malaria vectors in the GMS remains largely unknown. The only metabolic mechanism described so far is the over-expression of two P450 isoforms (CYP6P7 and CYP6AA3) suspected to metabolise several pyrethroids [62] in a laboratory colony of deltamethrin-resistant *An. minimus* (s.s.) from Thailand [34, 63]. Further efforts should be made to decipher the molecular basis of insecticide resistance in Southeast Asian malaria vectors.

## Conclusion

Pyrethroid resistance seems to be widespread in *Anopheles* populations from the Thailand-Myanmar border. Documenting the susceptibility to other classes of insecticides is important in the framework of malaria control and elimination. Molecular basis of the resistance remains largely unknown in most of the Southeast Asian malaria vectors. Additional efforts should be made to identify molecular markers allowing the routine monitoring of insecticide resistance in this area.

## Abbreviations

DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethane; DNA: Deoxyribonucleic acid; GMS: Greater Mekong Subregion; IRS: Indoor residual spraying; KD: Knock-down; *kdr* mutation: Knock-down resistance mutation; KDT50: Knock-down time 50; LLINs: Long-lasting insecticide-treated nets; TMB: Thailand-Myanmar

border; VCRU: Vector Control Research Unit; VGSC: Voltage-gated sodium channel; WHO: World Health Organisation

## Acknowledgements

We acknowledge the UMR-224 (MIVEGEC) of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the Shoklo Malaria Research Unit (SMRU) and the Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Montpellier for providing human resources to the project. We also thank the Thailand International Development Cooperation Agency (TICA) from the Ministry of Foreign Affairs (MoFA) through the STOPVEC programme for their technical and administrative assistance. This work was partially supported by the Centre for Advanced Studies for Agriculture and Food, Institute for Advanced Studies, Kasetsart University under the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand.

## Funding

This work was supported by The Global Fund Thailand (THA-M-DDC) through the MAEL research programme. This work was partially supported by the Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Institute for Advanced Studies, Kasetsart University under the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand. Victor Chaumeau received a PhD scholarship by the Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier (CHRU Montpellier). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article. The raw data used and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. Sequences are submitted to the GenBank database under accession numbers KY677698–KY677706.

## Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: VIC, VC, FN and TC. Performed the bioassays: JZ and VIC. Performed mosquito identification: JZ, PK and VIC. Performed molecular detection of *kdr* mutation: VIC. Analysed the data: VIC and VC. Contributed reagents/materials/analysis tools: DC and CA. Wrote the paper: VIC and VC. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

The protocols for mosquito collection were approved by the Ethics Review Committee for Research Involving Human Research Subjects, Health Science Group, Chulalongkorn University (No 096.1/56) and Oxford Tropical Research Ethic Committee (1015-13, dated 29 April 2013).

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Centre hospitalier universitaire de Montpellier, Montpellier, France. <sup>2</sup>Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France. <sup>3</sup>Shoklo Malaria Research Unit, Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Mae Sot, Thailand. <sup>4</sup>Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. <sup>5</sup>Centre for Tropical Medicine and Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

Received: 18 January 2017 Accepted: 23 March 2017

Published online: 31 March 2017

## References

- Prüss-Ustün A, Corvalán CF, World Health Organization. Preventing disease through healthy environments: towards an estimate of the environmental burden of disease. Geneva: World Health Organization; 2006.
- WHO. World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015;526(7572):207–11.
- Killeen GF. Characterising, controlling and eliminating residual malaria transmission. *Malar J*. 2014;13:330.
- WHO. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. Geneva: World Health Organization; 2012.
- Hougard JM, Duchon S, Darriet F, Zaim M, Rogier C, Guillet P. Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. *Bull World Health Organ*. 2003;81(5):324–33.
- Corbel V, N'Guessan R. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors; a pragmatic review. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Rijeka: InTech; 2013.
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akooobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, et al. The role of the agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(6):617–22.
- N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(2):199–206.
- Asidi A, N'Guessan R, Akogbeto M, Curtis C, Rowland M. Loss of household protection from use of insecticide-treated nets against pyrethroid-resistant mosquitoes, Benin. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(7):1101–6.
- 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.
- Harrus S, Baneth G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int J Parasitol*. 2005;35(11–12):1309–18.
- Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol*. 2015;60:537–59.
- McCann RS, Ochomo E, Bayoh MN, Vulule JM, Hamel MJ, Gimign JE, et al. Reemergence of *Anopheles funestus* as a vector of *Plasmodium falciparum* in western Kenya after long-term implementation of insecticide-treated bed nets. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(4):597–604.
- Strode C, Donegan S, Garner P, Enayati AA, Hemingway J. The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *Plos Med*. 2014;11(3):e1001619.
- Trape JF, Tall A, Diagne N, Ndiath O, Ly AB, Faye J, et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(12):925–32.
- Churcher TS, Lissenden N, Griffin JT, Worrall E, Ranson H. The impact of pyrethroid resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa. *Elife*. 2016;5. doi:10.7554/eLife.16090.
- Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol*. 2016;32(3):187–96.
- Van Bortel W, Trung HD, Thuan le K, Sochantha T, Socheat D, Sumrandee C, et al. The insecticide resistance status of malaria vectors in the Mekong region. *Malar J*. 2008;7:102.
- Somboon P, Prapanthadara LA, Suwonkerd W. Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus* s.l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34(1):87–93.
- Overgaard HJ, Sandve SR, Suwonkerd W. Evidence of anopheline mosquito resistance to agrochemicals in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005;36 Suppl 4:152–7.
- Hii JL. Insecticide susceptibility studies of three cryptic species of the *Anopheles balabacensis* complex. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1984;15(1):104–11.
- Verhaeghen K, Van Bortel W, Trung HD, Sochantha T, Keokenchanh K, Coosemans M. Knockdown resistance in *Anopheles vagus*, *An. sinensis*, *An. paraliae* and *An. peditaeniatus* populations of the Mekong region. *Parasit Vectors*. 2010;3(1):59.
- Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000;45:371–91.
- David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013; 368(1612):20120429.
- Zhu G, Zhong D, Cao J, Zhou H, Li J, Liu Y, et al. Transcriptome profiling of pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes in the malaria vector, *Anopheles sinensis*. *BMC Genomics*. 2014;15:448.
- Chang X, Zhong D, Fang Q, Hartsel J, Zhou G, Shi L, et al. Multiple resistances and complex mechanisms of *Anopheles sinensis* mosquito: a major obstacle to mosquito-borne diseases control and elimination in China. *Plos Negl Trop Dis*. 2014;8(5):e2889.
- Chang X, Zhong D, Lo E, Fang Q, Bonizzoni M, Wang X, et al. Landscape genetic structure and evolutionary genetics of insecticide resistance gene mutations in *Anopheles sinensis*. *Parasit Vectors*. 2016;9:228.
- Feng X, Yang C, Yang Y, Li J, Lin K, Li M, et al. Distribution and frequency of G119S mutation in ace-1 gene within *Anopheles sinensis* populations from Guangxi, China. *Malar J*. 2015;14:470.
- Zhou D, Liu X, Sun Y, Ma L, Shen B, Zhu C. Genomic analysis of detoxification supergene families in the mosquito *Anopheles sinensis*. *Plos One*. 2015;10(11):e0143387.
- Verhaeghen K, Van Bortel W, Trung HD, Sochantha T, Coosemans M. Absence of knockdown resistance suggests metabolic resistance in the main malaria vectors of the Mekong region. *Malar J*. 2009;8:84.
- Chareonviriyaphap T, Rongnoparut P, Chantarumporn P, Bangs MJ. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. *J Vector Ecol*. 2003;28(1):108–16.
- Pemo D, Komalamisra N, Sungvornyothisin S, Attrapadung S. Efficacy of three insecticides against *Anopheles dirus* and *Anopheles minimus*, the major malaria vectors, in Kanchanaburi Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2012;43(6):1339–45.
- Rodpradit P, Boonsuepsakul S, Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Rongnoparut P. Cytochrome P450 genes: molecular cloning and overexpression in a pyrethroid-resistant strain of *Anopheles minimus* mosquito. *J Am Mosq Control Assoc*. 2005;21(1):71–9.
- Syafuruddin D, Hidayati AP, Asih PB, Hawley WA, Sukowati S, Lobo NF. Detection of 1014 F kdr mutation in four major anopheline malaria vectors in Indonesia. *Malar J*. 2010;9:315.
- Rattanarithkul R, Harrison BA, Harbach RE, Panthusiri P, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. IV. *Anopheles*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006;37 Suppl 2:1–128.
- WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 2nd ed. Geneva: WHO; 2016.
- Chaumeau V, Andolina C, Fustec B, Tuikue Ndam N, Brengues C, Herder S, et al. Comparison of the performances of five primer sets for the detection and quantification of *Plasmodium* in anopheline vectors by Real-Time PCR. *Plos One*. 2016;11(7):e0159160.
- PRABI-Doua: CAP3 Sequence assembly program. <http://doua.prabi.fr/software/cap3> Accessed 27 Feb 2017.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, et al. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBL. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Web Server issue):W695–9.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947–8.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. Analysis tool web services from the EMBL-EBL. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Web Server issue):W597–600.
- 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(5):478–81.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403–10.
- Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *J Am Mosq Control Assoc*. 1987;3(2):302–3.
- Finney D. Probit analysis. 3rd edition edn. New York: Cambridge University Press; 1971.

47. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2016.
48. Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *Plos One*. 2013;8(1):e54092.
49. Lines JD, Nassor NS. DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. *Med Vet Entomol*. 1991;5(3):261–5.
50. Hodjati MH, Curtis CF. Effects of permethrin at different temperatures on pyrethroid-resistant and susceptible strains of *Anopheles*. *Med Vet Entomol*. 1999;13(4):415–22.
51. Tainchum K, Kongmee M, Manguin S, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. *Anopheles* species diversity and distribution of the malaria vectors of Thailand. *Trends Parasitol*. 2015;31(3):109–19.
52. Chareonviriyaphap T, Aum-Aung B, Ratanatham S. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999;30(1):184–94.
53. Ho LY, Zairi J. Species composition and pyrethroid susceptibility status of *Anopheles* mosquitoes from two different locations in Malaysia. *Trop Biomed*. 2013;30(1):125–30.
54. Rohani A, Aziz I, Zurainee MN, Rohana SH, Zamree I, Lee HL. Current insecticide susceptibility status of Malaysian *Anopheles maculatus* Theobald to malathion, permethrin, DDT and deltamethrin. *Trop Biomed*. 2014;31(1):159–65.
55. Asih PB, Syahrani L, Rozi IE, Pratama NR, Marantina SS, Arsyad DS, et al. Existence of the rdl mutant alleles among the *Anopheles* malaria vector in Indonesia. *Malar J*. 2012;11:57.
56. Perera MD, Hemingway J, Karunaratne SP. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malar J*. 2008;7:168.
57. Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, et al. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. *Parasit Vectors*. 2011;4:60.
58. Curtis CF, Miller JE, Hodjati MH, Kolaczinski JH, Kasumba I. Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bednets against malaria vectors? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998;353(1376):1769–75.
59. Djènontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C, Hougard JM, et al. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malar J*. 2009;8:233.
60. Pennetier C, Corbel V, Hougard JM. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(6):739–44.
61. Jones CM, Liyanapathirana M, Agossa FR, Weetman D, Ranson H, Donnelly MJ, et al. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(17):6614–9.
62. Duangkaew P, Kaewpa D, Rongnoparut P. Protective efficacy of *Anopheles minimus* CYP6P7 and CYP6AA3 against cytotoxicity of pyrethroid insecticides in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells. *Trop Biomed*. 2011;28(2):293–301.
63. Rongnoparut P, Boonsuepsakul S, Chareonviriyaphap T, Thanomsing N. Cloning of cytochrome P450, CYP6P5, and CYP6AA2 from *Anopheles minimus* resistant to deltamethrin. *J Vector Ecol*. 2003;28(2):150–8.

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](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Vector bionomics and malaria transmission along the Thailand-Myanmar border: a baseline entomological survey

N. Kwansomboon<sup>1</sup>, V. Chaumeau<sup>1,2,3</sup>, P. Kittiphanakun<sup>4</sup>, D. Cerqueira<sup>1,4</sup>, V. Corbel<sup>1,3</sup>, and T. Chareonviriyaphap<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, faasthc@ku.ac.th

<sup>2</sup>Centre hospitalier universitaire de Montpellier, Montpellier, France

<sup>3</sup>Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

<sup>4</sup>Shoklo Malaria Research Unit (SMRU), Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit (MORU), Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Mae Sot, Tak, Thailand

Received 27 August 2016; Accepted 16 December 2016

**ABSTRACT:** Baseline entomological surveys were conducted in four sentinel sites along the Thailand-Myanmar border to address vector bionomics and malaria transmission in the context of a study on malaria elimination. Adult *Anopheles* mosquitoes were collected using human-landing catch and cow-bait collection in four villages during the rainy season from May-June, 2013. Mosquitoes were identified to species level by morphological characters and by AS-PCR. Sporozoite indexes were determined on head/thoraces of primary and secondary malaria vectors using real-time PCR. A total of 4,301 anopheles belonging to 12 anopheline taxa were identified. *Anopheles minimus* represented >98% of the Minimus Complex members (n=1,683), whereas the *An. maculatus* group was composed of two dominant species, *An. sawadwongporni* and *An. maculatus*. Overall, 25 *Plasmodium*-positive mosquitoes (of 2,323) were found, representing a sporozoite index of 1.1% [95%CI 0.66-1.50]. The transmission intensity as measured by the EIR strongly varied according to the village (ANOVA, F=17.67, df=3, P<0.0001). Our findings highlight the diversity and complexity of the biting pattern of malaria vectors along the Thailand-Myanmar border that represent a formidable challenge for malaria control and elimination. *Journal of Vector Ecology* 42 (1): 84-93. 2017.

**Keyword Index:** Thailand-Myanmar border, malaria, vectors, *Plasmodium*, transmission, host seeking behavior.

### INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) reports that malaria continues to show ongoing transmission in 97 countries, leaving 3.2 billion people at risk. Africa traditionally has the highest burden with around 90% of the cases. Another region where malaria is a major public health problem is Southeast Asia (SEA), where over 1.3 billion people are at risk of malaria in ten malaria-endemic countries. The number of confirmed malaria cases decreased in the region from 2.9 to 1.6 million between 2000 and 2014. This is explained by several factors, including economic development, deforestation as well as preventive and curative strategies, including early diagnosis and prompt access to treatment, Artemisinin-based Combination Therapy (ACTs), and high coverage of long-lasting insecticidal-treated mosquito nets (LLINs). The SEA region has, however, become an area of major concern because of emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin derivatives and fear of the subsequent spread worldwide (Ashley et al. 2014, Tun et al. 2015).

In Thailand, malaria incidence has been reduced by 50-75% and the country is now entering the pre-elimination phase. Despite significant progress, malaria control remains difficult in foci located in forested areas and along the country borders with Myanmar and Cambodia due to complexities in scaling up malaria control interventions (Corbel et al. 2013). The Thailand-

Myanmar border accounts for 55% of malaria cases in Thailand, while Myanmar annually reports 20% of the total malaria cases in the SEA region. Malaria surveillance and control are difficult to implement due to the extensive population movements across the border, especially foreign workers who make disproportionate contributions to the malaria burden (Corbel et al. 2013). The mobile populations and remote locations make efforts much more challenging, especially if effective control measures are not appropriately deployed on both sides of the border (Carrara et al. 2013). The Thailand-Myanmar region is characterized by a forest and forest fringe area where local populations typically live in remote, hard-to-reach villages that place them in close proximity to very efficient anopheline vectors (Delacollette et al. 2009). At least 20 *Anopheles* species are known to play a role in malaria transmission along the border (Saeung 2012). Of these vectors, the most prominent belong to the Dirus and Minimus complexes and Maculatus group (Manguin et al. 2010). Within these complexes, the species that are deemed important malaria vectors are *An. dirus*, *An. baimaii*, *An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, *An. aconitus*, *An. pseudowillmori*, and *An. minimus* (Muenworn et al. 2009, Tananchai et al. 2012, Tisgratog et al. 2012, Tainchum et al. 2015). There is also suspicion of potential secondary vectors including *An. epiroticus*, *An. barbirostris*, and *An. philippinensis* (Saeung 2012). The abundance and role of these secondary vectors is largely undetermined due to the focus on primary vectors.

Understanding the behavior and ecology of malaria vector species is essential to better address malaria transmission.

Along the Thai-Myanmar border, there is recent evidence of foci of asymptomatic and submicroscopic carriers (Imwong et al. 2015), thus constituting a reservoir of parasites in a region where artemisinin resistance in *P. falciparum* has been documented (Phyo et al. 2012). The persistence of malaria due to submicroscopic parasitemia and the potential spread of artemisinin resistance to India and Africa are of concern, as they may challenge the control and elimination of malaria worldwide (Mok et al. 2015). With the support of the Wellcome Trust, the Bill and Melinda Gates Foundation, and the Global Fund Thailand, a pilot trial was initiated in four sentinel sites along the Thailand-Myanmar border to assess whether mass drug administration (MDA) using artemisinin-based combination therapies and single-dose primaquine could eliminate the parasite reservoir and contain *P. falciparum* artemisinin-resistance (Imwong et al. 2015).

In this context, we conducted baseline entomological surveys during the rainy season to address vector bionomics and transmission prior the introduction of MDA in the community. Research in this area offers a unique opportunity to better understand *Anopheles* composition and behavior with hosts and feeding patterns that will aid in the development of more effective vector control in this region.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

Mosquito collections were conducted in four sentinel sites located within 10 km of the Thailand border considered representative of the area in terms of environment, ecology, population, and behavior (Figure 1). Villages were Htoo Pyin Nyar or TPN (17° 14' N, 98° 29' E), Tar Au Ta or TOT (16° 36' N, 98° 57' E), Ka Nu Hta or KNH (17° 18' N, 98° 24' E), and Htee Kaw Taw or HKT (16° 85' N, 98° 47' E). The number of households in baseline at KNH, TOT, TPN, and HKT were 81, 138, 69, and 160, respectively. Houses were made essentially of wood and bamboo. The census population at the beginning of the study was 349, 745, 375, and 908 at KNH, TOT, TPN, and HKT, respectively (Imwong et al. 2015). Residents were mainly farmers and forest workers.

### Mosquito collection

Mosquito collections for this baseline survey were carried out in 2013 during the beginning of the rainy season, 23-27 April at TPN, 19-23 May at TOT, 11-15 June at KNH, and 23-27 June at HKT. Standard collection methods such as indoor and outdoor human-landing catch (HLC) and cow-bait collection (CBC) were used (Silver 2008). In each village, one catch site was used for CBC, whereas five sites were used for HLC (both inside and outside the same household). Collections were carried out from 18:00-06:00 for five consecutive nights (equivalent to 50 person-night collections for HLC and five cow-night collections for CBC). Indoor and outdoor human-landing collections were conducted by two teams of two people at each catch site. The first team worked from 18:00 to 24:00, followed by a second team from midnight to 06:00. Teams were rotated between catching sites on successive nights to mitigate potential collector bias. HLC lasted for 45 min each hour followed by a 15 min break for collectors.

Human catch sites were distant by minimum 50 m from each other to avoid potential bias in attracting mosquitoes. The CBC involved placing a single adult cow under a clean (untreated) cotton bed net measuring 3.6 m length x 3.3 m width x 2.0 m height, with the net suspended 30 cm above the ground level to allow mosquitoes to access inside (Alemayehu et al. 2013). The net trap was placed approximately 100 m from the nearest HLC to avoid interference with it. The cow was exposed to mosquitoes entering the net uninterrupted for 45 min each hour. Mosquitoes landing on humans or resting on the net at time of collection were caught individually by glass tubes to address their anthropophilic and zoophilic preferences. Collected mosquitoes were kept in a clean plastic cup covered with netting and provided with 10% sugar solution soaked on cotton. Cups were then brought back to the Shoklo Malaria Research Unit (SMRU), Mae Sot, Thailand, for morphological identification at genus level. All collection sites were geo-referenced using a Global Positioning System and extracted with ArcGIS ArcInfo 9.3 software.

### Morphological identification

Mosquito identification at genus level (*Anopheles*, *Culex*, and *Aedes*) was carried out at SMRU. All *Anopheles* females were labeled, put in 1.5 ml tubes containing silica gel, and kept at -20° C to prevent mosquito degradation. Mosquitoes were then sent to the Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, and identified to the species level using morphological keys for Southeast Asian anophelines (Rattananarithkul et al. 2006).

### Molecular identification of sibling species by Allele specific-PCR

All female *Anopheles* collected belonging to primary (*An. minimus* and *An. dirus* complexes and *An. maculatus* group) and secondary malaria vectors (*An. barbirostris* group, *An. aconitus s.l.*, *An. annularis s.l.*) were cut in two parts to separate the head-and-thorax from the abdomen-legs. Head and thorax were subjected to DNA extraction using the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson 1980). DNA was used for molecular detection of sibling species within the *Dirus* complex, *Maculatus* group, and *Minimus* complex assemblages by using an allele-specific multiplex assay (AS-PCR) examining the ITS-2 region of the DNA (Walton et al. 1999, Garros et al. 2004, Walton et al. 2007). The following modifications were added in the protocols: the amplification was carried out in a 25 µl reaction mixture containing 0.5 units of Goldstar® Taq DNA polymerase (Eurogentec), 200 µM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 400 nM of each primers, and 4 µl of DNA template at working concentration. For the *Minimus* complex, after an initial denaturation step at 94° C for two min, 40 cycles were programmed as follows: 94° C for 30 s, 45° C for 30 s, 72° C for 40 s, and a final extension step at 72° C for five min. For the *Maculatus* group, after an initial denaturation step at 94° C for two min, 35 cycles were programmed as follows: 94° C for one min, 55° C for 30 s, 72° C for 30 s, and a final extension step at 72° C for 10 min. For the *Dirus* complex, after an initial denaturation step at 94° C for two min, 35 cycles were programmed as follows: 94° C for one min, 55° C for 15 s, 72° C for 40 s, and a final extension step at 72° C for ten min. The PCR products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gel at

125v for 75 min and stained with ethidium bromide® (MO BIO Laboratories, Inc., 2746 Loker Avenue West, Carlsbad, CA).

#### qPCR assays for *Plasmodium* detection in the potential vectors

Real-time PCR was performed with a CFX-96® Biorad machine (CFX Manager 3.0 software) using universal-thermocycling protocol and intercalating dye for the detection of 18S subunit of ribosomal RNA of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* (Mangold et al. 2005). The sequences of the primers were produced by BioDesign® and were as follows: forward PL1473F18 [5-TAA CGA AGA ACG TCT TAA-3] and reverse PL1679R18 [5-GTT CCT CTA AGA AGC TTT-3]. The published protocol of the assays was optimized on the machine to ensure PCR efficiency >90% as described in (Chaumeau et al. 2016). Reactions were conducted using nine µl of EVAGreen® qPCR Mix Plus® (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and one µl of DNA template for a total reaction volume of ten µl; the thermocycling protocol was 95° C for 15 min followed by 45 amplification cycles at 95° C for 15 s, appropriate annealing temperature for 15 s and 72° C for 20 s; characterization of the PCR product was performed with the melt curve analysis of the amplicons (95° C for 15 s, 68° C for one min, 80° C for 15 s, 60° C for 15 s, then 60° C to 90° C with an increment of 0.2° C per s). All samples were tested in triplicate. DNA samples of *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* were provided by the SMRU and used as positive controls for the determination of the melting temperature (Tm) that are species-specific (Mangold et al. 2005). All positive samples were confirmed for Plasmodium species by sequencing (Macrogen®, Seoul, Korea).

#### Data analysis

The human-biting rate (HBR, the mean number of bites received per human per month) and the entomological inoculation rate (EIR, the number of infected bites received per man per month) were compared among villages using a one-way analysis of variance (ANOVA). The Median Catching Time (MCT), representing the time for which 50% of mosquitoes belonging to a given species were collected, was compared using a Kruskal-Wallis test and Dunn's test for multiple comparisons. Sporozoite indexes (SI) for *Pf* (Si<sub>Pf</sub>) and *Pv* (Si<sub>Pv</sub>) were compared among villages using a chi-square test at 95% confidence interval and Bonferoni's correction was applied for multiple comparisons and Yates's correction when sample size was <5. All data were analyzed by using GraphPad Prism software (version 5, San Diego, CA).

## RESULTS

#### Abundance, composition, and host-seeking preferences of malaria vectors

In the four selected villages, we collected a total of 20,809 mosquitoes, including *Culex* spp. (n=15,591 75%), *Anopheles* spp. (4,301, 21%), and *Aedes* spp. (n=917, 4%). Overall, twelve anopheline taxa were morphologically identified, subdivided in the subgenera *Cellia* (ten species) and *Anopheles* (two species). *Anopheles minimus* s.l. (43.5%, n=1,873), *An. subpictus* s.l. (18.6%, n=798), and *An. maculatus* s.l. (17.5%, n=754) were predominant in the study area (Table 1). *Anopheles minimus* s.l. was, by far, the most abundant anopheles mosquito (33.9%, n= 1,456) collected on humans, whereas *An. subpictus* s.l. was more abundant on the cow

Table 1. Abundance of *Anopheles* mosquitoes collected on the Thailand-Myanmar border according to the catching method.

Anopheline taxa	HLC <sup>a</sup>		CBC <sup>b</sup>		Total	
	N	%	N	%	N	%
† <i>An. minimus</i> s.l.	1,456	33.9	417	9.7	1,873	43.5
<i>An. subpictus</i> s.l.	9	0.2	789	18.3	798	18.6
† <i>An. maculatus</i> s.l.	303	7	451	10.5	754	17.5
<i>An. culicifacies</i> s.l.	18	0.4	225	5.2	243	5.6
<i>An. jamesii</i>	7	0.2	132	3.1	139	3.2
<i>An. tessellatus</i> s.l.	72	1.7	21	0.5	93	2.2
‡ <i>An. barbirostris</i> s.l.	28	0.7	26	0.6	54	1.3
† <i>An. dirus</i> s.l.	30	0.7	1	0	31	0.7
‡ <i>An. aconitus</i> s.l.	3	0.1	28	0.7	31	0.7
<i>An. kochi</i> s.l.	1	0	2	0	3	0.1
‡ <i>An. annularis</i> s.l.	0	0	2	0	2	0
<i>An. hyrcanus</i> s.l.	0	0	1	0	1	0
Unknown	26	0.6	253	5.9	279	6.5
Total	1,953	45.4	2,348	54.6	4,301	100

<sup>a</sup> *Anopheles* collected by Human-Landing Catch (HLC) technique, expressed in number of mosquito collected (N) and in percentage of the total number of anopheles collected (%).

<sup>b</sup> *Anopheles* collected by Cow-Bait Collection (CBC) technique, expressed in number of mosquito collected (N) and in percentage of the total number of anopheles collected (%).

† Primary malaria vectors in Thailand (see review in (Tainchum et al. 2015)).

‡ Secondary malaria vectors in Thailand (see review in (Tainchum et al. 2015)).

(18.3%, n=789). Species belonging to *An. dirus* s.l., *An. hyrcanus* s.l., *An. aconitus* s.l., and *An. annularis* s.l. were rare (<1%). About 6% (n=279) of anopheles could not be morphologically identified to species (missing legs or wings or damaged).

PCR technique was used for the identification of sibling species among malaria vector complexes and groups. *Anopheles minimus* (formerly A) represented >98% of the Minimus Complex members collected (n=1,683), with <0.1% identified as *An. harrisoni* (Figure 2). Other genetically related species were *An. aconitus* (n=3), *An. varuna* (n=18), and *An. pampanai* (n=9). Regarding the Maculatus group, four species, *An. sawadwongporni*, *An. maculatus*, *An. pseudowillmori*, and *An. dravidicus* were found in sympatry. *Anopheles sawadwongporni* was the predominant species, followed by *An. maculatus* (Figure 2). The relative proportion of *An. maculatus* was greater on humans (34%, 86/253) than on animal bait (19%, 78/422) (Figure 2). *Anopheles dirus* complex was found exclusively on humans and was made of *An. baimaii* only.

The host-seeking behavior of malaria vectors was investigated by estimating the zoophilic and exophagic preferences for *An. minimus*, *An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, and *An. pseudowillmori* (Figure 3). Overall, *An. minimus* and *An. pseudowillmori* showed a slight preference to feed outdoors (exophagic indexes of 0.57 and 0.58, respectively) compared to *An. maculatus* and *An. sawadwongporni* (EI of 0.76 for both species). All vector species showed a greater tendency to feed on the animal bait, but *An. minimus* showed the lowest zoophilic index (0.70) comparatively to *An. sawadwongporni*, *An. maculatus*, and *An. pseudowillmori* (0.96, 0.90, and 0.93, respectively) (Figure 3). *Anopheles baimaii* showed high anthropophagic rates, but the low sample size precludes interpretation of its host-biting preference.

The analysis of median catching time (MCT) showed a statistically significant difference in the hourly biting behavior among malaria vector species (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.0001$ ). *Anopheles sawadwongporni*, *An. maculatus*, and *An. pseudowillmori* collected on humans showed earlier biting activity (22:00-00:00) than *An. minimus* (01:00-02:00) (Dunn's multiple comparison test,  $p$ -value<0.001) (Figure 4). Some behavioral plasticity in relation to the host was noted for *An. sawadwongporni* and *An. maculatus*. Indeed, MCTs of these species were one h later when they were collected on the cow compared to humans (Dunn's multiple comparison test,  $p < 0.001$ ).

#### Biting rates, sporozoite index, and transmission intensity in the selected villages

The mosquito abundance and relative proportion of malaria vectors differed according to the site (Figure 5). HKT exhibited the largest number of *Anopheles* mosquitoes (n=1,670), followed by TPN (n=1,120), TOT (n=873), and KNH (n=638) (Figure 5A). Relative proportion of malaria vectors was greater at KNH (85%), TPN (74%), and HKT (61%) compared to TOT where only 37% of malaria vectors were found. *Anopheles minimus* was the predominant malaria vector species on humans at all sites (Figure 5B). With regards to cow-bait collection, *An. sawadwongporni* was predominant at TPN and KNH only (Figure 5C). *Anopheles dirus*, *An. barbirostris*, and *An. annularis* were found at very low densities. A much greater proportion of malaria vectors was collected with human-landing technique compared to cow-bait

collection.

A total of 2,323 *Anopheles* was tested for the presence of *Plasmodium* spp. in salivary glands. Overall, 25 mosquitoes were positive for *Plasmodium* spp., representing a sporozoite index (SI) of 1.08% [95%CI 0.66-1.50] (Figure 6). We noted a clear predominance for *Pv* infections (80%) over *Pf* infections (16%), with mixed infections representing 4% of the total. The infection rates for various *Anopheles* species are shown in the Figure 6. SI was 6.25% for *An. baimaii* (1 of 16), 1.4% for *An. minimus* (23 of 1,641), and 0.28% for *An. sawadwongporni* (1 of 361). Only malaria vector species collected on humans were found positive for *Plasmodium* infections. No secondary vectors were found infected with *Plasmodium* spp.

The modalities of malaria transmission in each village are summarized in Table 2. The results showed that the mean HBR (bites/person/month) of primary vectors was significantly higher at HKT (535 [428-641]) compared to TPN (257 [185-329]), KNH (237 [194-280]), and TOT (44 [27-62]) (ANOVA,  $F=33.35$ ,  $df=3$ ,  $P < 0.001$ ). The  $SI_{pv}$  was also greater at HKT (2.21%, 95%CI 1.2-3.2) compared to KNH (0.54%, 95%CI [0.0-1.3]) (Chi square test, adjusted  $P$  value=0.027). *Plasmodium falciparum* was only found at HKT with a prevalence ( $SI_{pf}$ ) of 0.6% ([0.07-1.09]). No *Pf* and *Pv*-infected mosquitoes were found at TOT and TPN. Malaria transmission, as measured by the entomological inoculation rates (EIR), varied according to the village (ANOVA,  $F=17.67$ ,  $df=3$ ,  $P < 0.0001$ ). At HKT there was a mean of 11.4 [5.4-17.4] and 3.0 [0.5-5.5] infective bites per human per month for *Pv* and *Pf*, respectively (Table 2). EIR was nil at TPN and TOT, but the low proportion of malaria vectors collected at TOT (n=326) may partially explain the outcomes. When considering the entire area (four villages), the mean  $EIR_{pf}$  and  $EIR_{pv}$  were 0.8 [0.1-1.4] and 3.2 [1.5-4.8] infected bites per human per month, respectively.

#### DISCUSSION

A better understanding of the vector composition, host-feeding preferences, and malaria transmission is essential for epidemiology studies and for the implementation of integrated vector control management. The main objective of this study was to characterize the vector bionomics and vector infectivity at four sentinel sites along the Thailand-Myanmar border prior to the implementation of mass drug administration for malaria elimination and artemisinin-resistance containment.

Our data showed that the mean sporozoite index (1.08%) and malaria transmission intensity (3.2 infected bites/man/month) were relatively high at the beginning of the rainy season. This is in agreement with clinical data showing a rise of malaria incidence in the study area with the onset of the rains in April-May (Lwin et al. 2015). We found predominance for *Pv* infections over *Pf* (*Pv/Pf* ratio of 0.8), which is consistent with the malaria epidemiology with predominance of *Pv* infections in western Thailand (Carrara et al. 2013). Widespread use of ACTs since the year 2000 is thought to be responsible for the progressive reduction of *Pf* incidence over *Pv* in both human and mosquito populations (Carrara et al. 2013). The proportion of mixed *Pf/Pv* infections was 4%, demonstrating that simultaneous inoculation of the two malaria species to humans does occur (Imwong et al. 2011).

Interestingly, similar *Plasmodium* infection rates in vectors

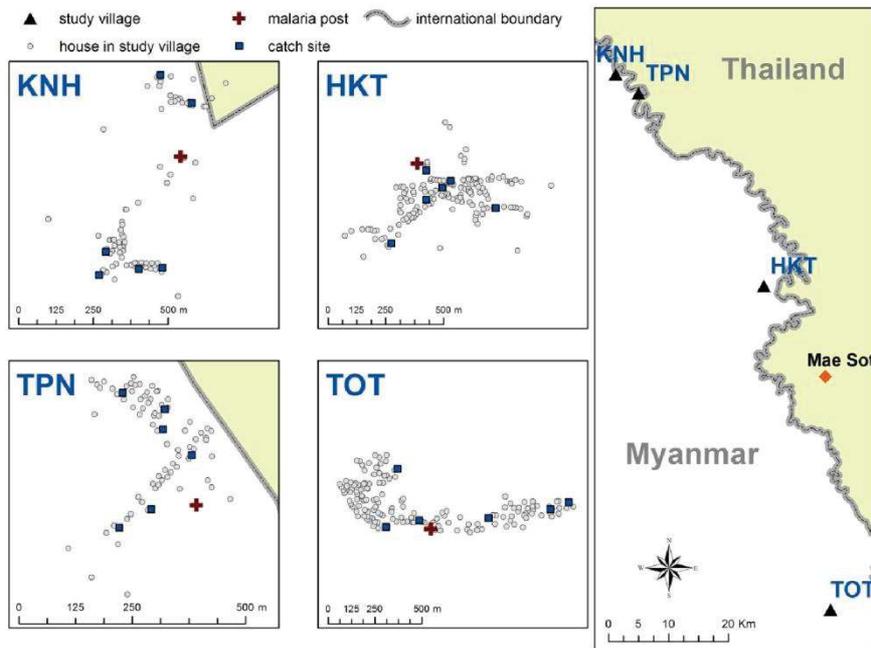


Figure 1. Map of the study area. The map shows the mosquito collection sites carried in four villages (TOT, TPN, KNH, and HKT) along the Thailand-Myanmar border. The map shows the malaria post (red cross), the catch sites (blue square), and households (grey circles).

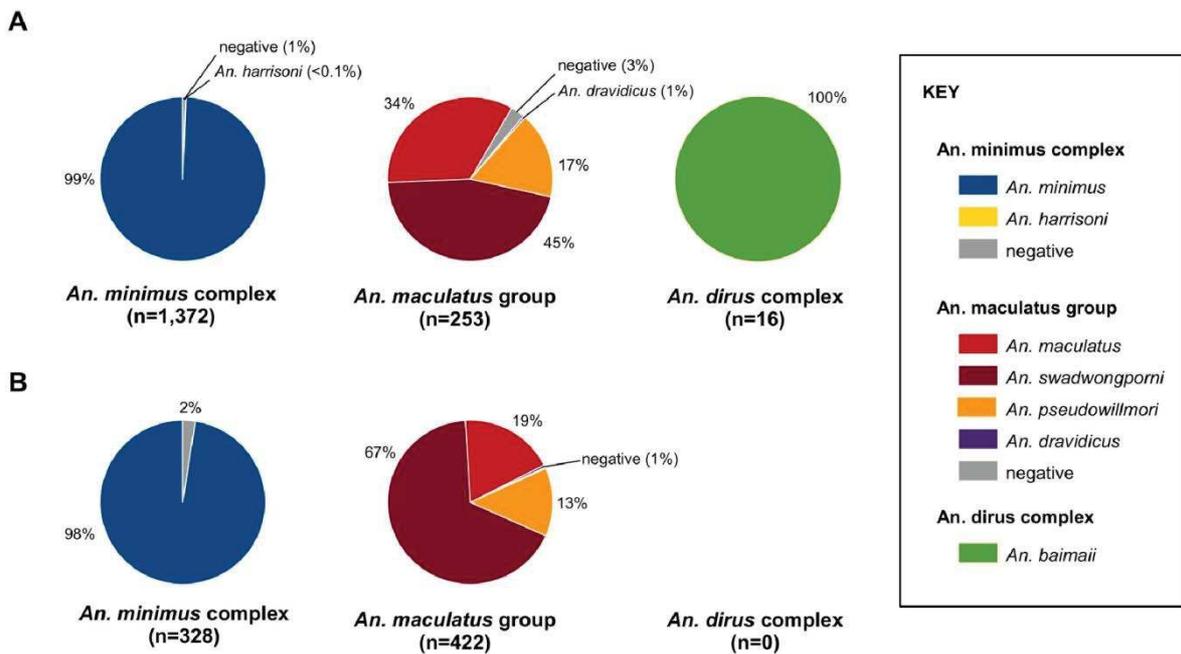


Figure 2. Identification of sibling species within primary malaria vectors species by AS-PCR. Vector composition among *An. minimus* complex, *An. maculatus* group, and *An. dirus* complex are presented according to the collection method; A) Human-Landing Catch (HLC) and B) Cow-Bait Collection (CBC). For *An. minimus* complex, pie charts include the species belonging strictly to the Complex members and not the related species (*An. varuna*, *An. pampanai*, *An. aconitus*). *Anopheles dirus* was caught on humans only.

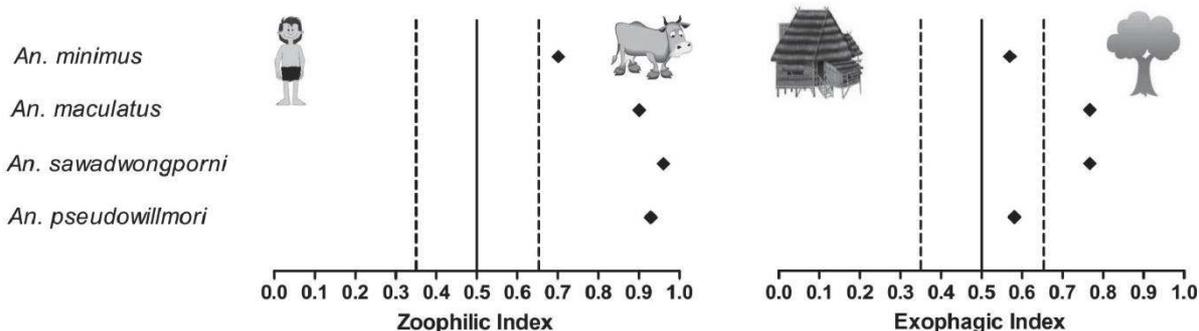


Figure 3. Host-biting preferences of primary malaria vectors according to the host and location. Calculating the zoophilic index (ZI) as the total number of bites received per cow for a given species compared to the total number of bites (cow + human). Calculating the exophagic index (EI) as the total number of bites received per human outdoors for a given species compared to the total number of bites received per human (indoors+outdoors). Results are presented for species having appropriate sample size to allow data analysis and interpretation.

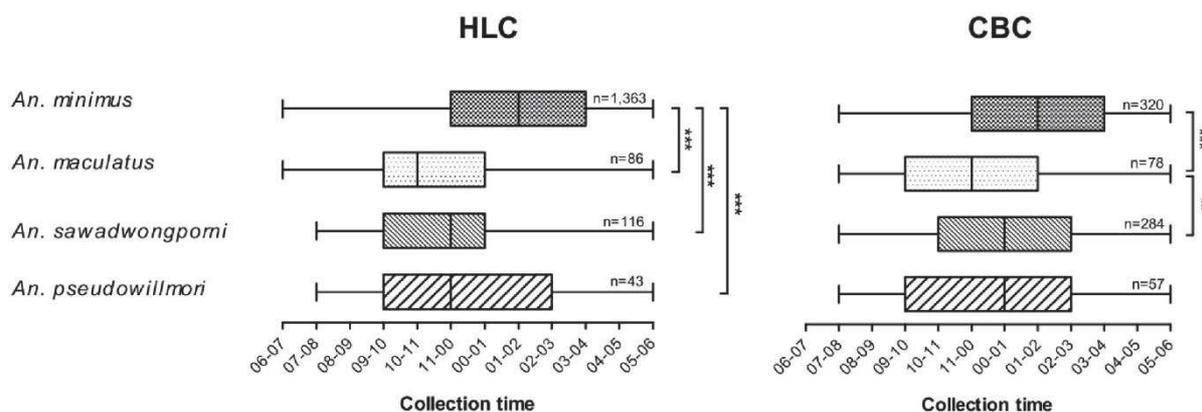


Figure 4. Median Catching Time (MCT) of malaria vectors. MCT was compared for *An. minimus*, *An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, and *An. pseudowillmori* collected by HLC and CBC and compared using Kruskal-Wallis test and Dunn’s multiple comparison test (P-value <0.01 are represented as \*\* and P-value <0.001 are represented as \*\*\*).

(0.8%) were recently reported in seven villages on the Thailand-Myanmar border, confirming the presence of multiple malaria hotspots in this area (Sriwichai et al. 2016). Even if our study was conducted once during the rainy season and cannot be used to extrapolate the magnitude of the transmission for the whole year, we demonstrated that malaria transmission greatly varied among villages. The heterogeneity of transmission together with low *Pf* sporozoite rates might then render difficult the evaluation of the impact of MDA on entomology endpoints. Additional entomological surveys will help to increase the sample size of potential malaria vectors and hence the chance to identify *Plasmodium*-infected mosquitoes. In our study, the highest sporozoite rate (6.25%) was recorded for *An. baimai* (Dirus complex), but results have to be taken with caution considering the small sample size (n=16). Due to its wide distribution, high

abundance, and high infection rate (1.4%), *An. minimus* can be considered as the main malaria vector species in the study area. The host-seeking and biting preferences of *An. minimus* greatly contribute to its role in transmission. Indeed, *An. minimus* showed higher anthropophilic and endophagic indexes compared to other malaria vector species and were able to bite humans all night. Our study identified *An. sawadwongporni* as another *Anopheles* species involved in malaria transmission. Our findings showed that *An. sawadwongporni* exhibits high zoophilic and exophagic behaviors with preferences for biting humans in early evening (from 22:00 to 24:00). Other authors showed that this species had a greater predilection for feeding on cattle than on humans (Muenworn et al. 2009, Sinka et al. 2011). Interestingly, we showed that *An. sawadwongporni* and, to a lesser extent, *An. maculatus* and *An. pseudowillmori* exhibited different night-biting patterns according

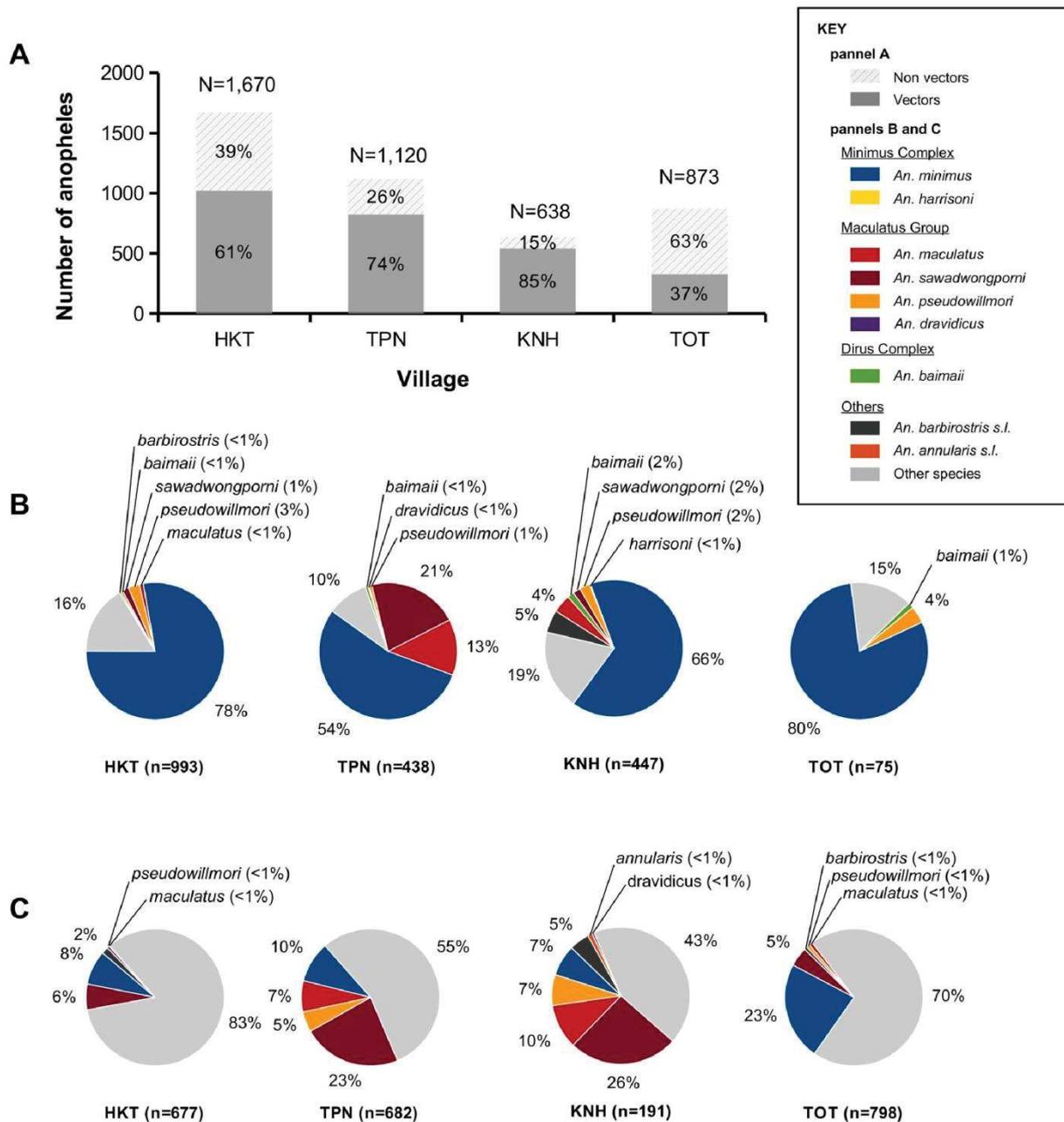


Figure 5. Abundance and diversity of malaria vectors according to villages and methods of collection. A) Abundance of *Anopheles* (malaria vectors and non-vectors) collected in each village; B) Diversity of malaria vector species using HLC; C) Diversity of malaria vector species using CBC.

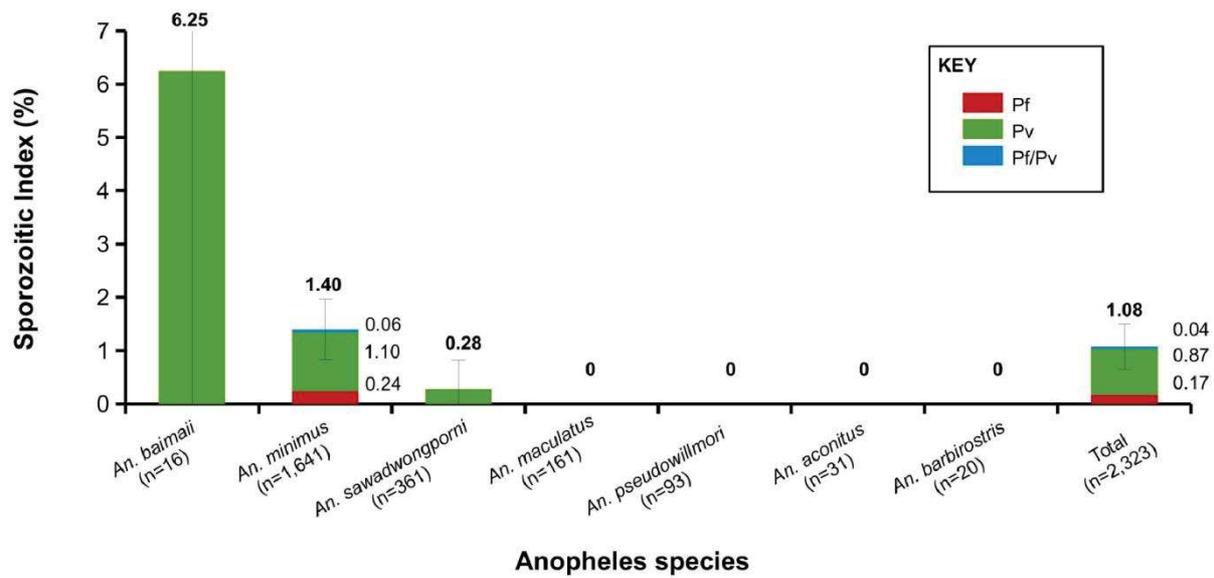


Figure 6. Sporozoite indexes for potential malaria vector species. Molecular detection of *Plasmodium* was performed in 2,323 *Anopheles* species identified as potential vectors of human plasmodium. Mosquitoes were collected either on humans (n=1,605) or cows (n=718). Sporozoites were detected in the salivary glands of 25 specimens collected on humans only and identified as *P. vivax* (n=20), *P. falciparum* (n=4), and *Pf/Pv mixed infection* (n=1).

Table 2. Summary of the entomological indexes of malaria transmission in the four villages.

Index	Value for the indicated village				
	HKT	TPN	KNH	TOT	All
Mean HBR [CI95] (in bites/person/month) <sup>a</sup>	535 [428-641]	257 [185-329]	237 [194-280]	44 [27-62]	268 [227-310]
Mean SI <sub>Pf</sub> [CI95] (per cent) <sup>b</sup>	0.58 [0.07-1.09]	0.0	0.0	0.0	0.29 [0.04-0.55]
Mean SI <sub>Pv</sub> [CI95] (per cent) <sup>b</sup>	2.21 [1.23-3.19]	0.0	0.54 [0.00-1.29]	0.0	1.22 [0.70-1.74]
Mean EIR <sub>Pf</sub> [CI95] (in infective bites/person/month) <sup>c</sup>	3.0 [0.5-5.5]	0.0	0.0	0.0	0.8 [0.1-1.4]
Mean EIR <sub>Pv</sub> [CI95] (in infective bites/person/month) <sup>c</sup>	11.4 [5.4-17.4]	0.0	1.2 [0.0-2.8]	0.0	3.2 [1.5-4.8]

<sup>a</sup>Mean Human-Biting Rate (HBR) and corresponding 95% Confidence Interval [CI95] expressed as a number of bites of primary vectors (*An. minimus* complex, *An. maculatus* group, and *An. dirus* complex.) received per person and per month.

<sup>b</sup>Mean Sporozoite Index for *P. falciparum* (SI<sub>Pf</sub>) and *P. vivax* (SI<sub>Pv</sub>) and corresponding 95% Confidence Interval [CI95], expressed as a number of mosquitoes infected with Pf or Pv sporozoites per 100 mosquitoes.

<sup>c</sup>Mean Entomological inoculation rate for *P. falciparum* (EIR<sub>Pf</sub>) and *P. vivax* (EIR<sub>Pv</sub>) and corresponding 95% Confidence Interval [CI95], expressed as a number of infective bites received per person and per month.

to the trapping method (MCTs were later with CBC than with HLC), suggesting some phenotypic plasticity in response to the availability of the vertebrate host. In this study, we were unable to properly address the host preferences and *Plasmodium* infection of secondary vectors due to the low number of specimens collected. This is unfortunate, considering that *An. barbirostris* and *An. annularis* were recently found infected with *P. falciparum* and *P. vivax* (as measured by enzyme-linked immunosorbent assay) along the Thailand-Myanmar border and they are likely to contribute to the transmission (Sriwichai et al. 2016).

The present study highlights the diversity and complexity of biting behavior of malaria vectors along the Thailand-Myanmar border that represent a formidable challenge for malaria control and elimination. Currently, the main vector control methods are still relying on LLINs and, to a lesser extent, indoor residual spraying. All these methods, however, target a small fraction of malaria vectors, the ones biting indoors and from 22:00 to 05:00 (that represents 21% of total anopheles). In addition, an important proportion of *Anopheles* is attracted by the animal bait (55% of total) and constitutes an important reservoir of potential malaria vectors within the village. Surprisingly, no *Plasmodium*-infected mosquitoes were found with cow-bait collection, suggesting the probable existence of vector population subgroups that may exhibit different host-seeking preferences. With the growing concern of malaria elimination along the Thailand-Myanmar border, innovative vector control methods based on vector characteristics and ecology should be deployed.

In conclusion, although transmission and mortality have declined over the past decade in the SEA region, progress is threatened by multi-drug resistance in *P. falciparum*, and this has prompted renewed efforts for elimination. Studies on vector ecology and behavior are essential to understand why the current control methods are ineffective at interrupting the residual transmission and will help identify the gaps in current vector control methods that must be addressed to achieve *P. falciparum* and *P. vivax* elimination.

#### Acknowledgments

We thank populations and volunteers of the study area and staff of Shoklo Malaria Research Unit (Francois Nosten, Lay Billion, Chiara Andolina, Daniel Parker, and Jordi Landier), Mae Sot and IRD, Thailand (Celine Montazeau, Bénédicte Fustec, and Selma Metaane) for their collaboration. We thank the Thailand International Development Cooperation Agency (TICA) from the Ministry of Foreign Affairs (through the STOPVEC programme) and the International Research Network (IRN58W0003), Thailand Research Fund Organization for their administrative assistance. Victor Chaumeau received a PhD scholarship from the Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier (CHRU Montpellier). SMRU is part of the Mahidol Oxford University Research Unit, supported by the Wellcome Trust of Great Britain. This work was supported by The Global Fund Thailand (THA-M-DDC) through the MAEL research project. The human and animal use protocols for this study were approved by the Ethics Review Committee for Research Involving Human Research Subjects, Health Science Group, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (No 096.1/56). All volunteers signed a written informed

consent before participating in mosquito collection.

#### REFERENCES CITED

- Alemayehu, S., K.C. Feghali, J. Cowden, J. Komisar, C.F. Ockenhouse, and E. Kamau. 2013. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malar. J.* 12: 277.
- Ashley, E. A., M. Dhorda, R.M. Fairhurst, C. Amaratunga, P. Lim, S. Suon, S. Sreng, J.M. Anderson, S. Mao, B. Sam, et al. 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 371: 411-423.
- Carrara, V.I., K.M. Lwin, A.P. Phyo, E. Ashley, J. Wiladphaingern, K. Sriprawat, M. Rijken, M. Boel, R. McGready, S. Proux, C. Chu, P. Singhasivanon, N. White, and F. Nosten. 2013. Malaria burden and artemisinin resistance in the mobile and migrant population on the Thai-Myanmar border, 1999-2011: an observational study. *PLoS Med.* 10: e1001398.
- Chaumeau V., C. Andolina, B. Fustec, N. Ndam, C. Brengue, S. Herder, D. Cerqueira, T. Chareonviriyaphap, F. Nosten, and V. Corbel. 2016. Comparison of the performances of five real-time PCR assays for the detection and quantification of *Plasmodium* infection in anopheline vectors. *PlosOne* 11(7): e0159160. doi: 10.1371/journal.pone.0159160.
- Corbel, V., F. Nosten, K. Thanispong, C. Luxemburger, M. Kongmee, and T. Chareonviriyaphap. 2013. Challenges and prospects for dengue and malaria control in Thailand, Southeast Asia. *Trends Parasitol.* 29: 623-633.
- Delacollette, C., C. D'Souza, E. Christophel, K. Thimasarn, R. Abdur, D. Bell, T.C. Dai, D. Gopinath, S. Lu, R. Mendoza, L. Ortega, R. Rastogi, C. Tantinimitkul, and J. Ehrenberg. 2009. Malaria trends and challenges in the Greater Mekong Subregion. *SE Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 40: 674-691.
- Garros, C., L.L. Koekemoer, M. Coetzee, M. Coosemans, and S. Manguin. 2004. A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 583-590.
- Imwong, M., S. Nakeesathit, N.P. Day, and N.J. White. 2011. A review of mixed malaria species infections in anopheline mosquitoes. *Malar. J.* 10: 253.
- Imwong, M., T.N. Nguyen, R. Tripura, T.J. Peto, S.J. Lee, K.M. Lwin, P. Suangkanarat, A. Jeeyapant, B. Vihokhern, K. Wongsan, et al. 2015. The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand-Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malar. J.* 14: 381.
- Lwin, K.M., M. Imwong, P. Suangkanarat, A. Jeeyapant, B. Vihokhern, K. Wongsan, G. Snounou, L. Keereecharoen, N.J. White, and F. Nosten. 2015. Elimination of *Plasmodium falciparum* in an area of multi-drug resistance. *Malar. J.* 14: 319.
- Mangold, K.A., R.U. Manson, E.S. Koay, L. Stephens, M. Regner, R.B. Thomson, Jr., L.R. Peterson, and K.L. Kaul. 2005. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2435-2440.
- Manguin, S., M.J. Bangs, J. Pothikasikorn, and T. Chareonviriyaphap. 2010. Review on global co-transmission

- of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infect. Genet. Evol.* 10: 159-177.
- Mok, S., E.A. Ashley, P.E. Ferreira, L. Zhu, Z. Lin, T. Yeo, K. Chotivanich, M. Imwong, S. Pukrittayakamee, M. Dhorada, et al. 2015. Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science* 347: 431-435.
- Muenworn, V., S. Sungvornyothin, M. Kongmee, S. Polsomboon, M.J. Bangs, P. Akrathanakul, S. Tanasinchayakul, A. Prabaripai, and T. Chareonviriyaphap. 2009. Biting activity and host preference of the malaria vectors *Anopheles maculatus* and *Anopheles sawadwongporni* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J. Vector Ecol.* 34: 62-69.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Phyo, A.P., S. Nkhoma, K. Stepniewska, E.A. Ashley, S. Nair, R. McGready, C. ler Moo, S. Al-Saai, A.M. Dondorp, K.M. Lwin, P. Singhasivanon, N.P. Day, N.J. White, T.J. Anderson, and F. Nosten. 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 379: 1960-1966.
- Rattananarithikul, R., B.A. Harrison, R.E. Harbach, P. Panthusiri, R.E. Coleman, and P. Panthusiri. 2006. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. IV. *Anopheles*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 37 Suppl 2: 1-128.
- Saeung, A. 2012. *Anopheles* (Diptera: Culicidae) species Complex in Thailand: identification, distribution, bionomics and malaria-vector importance. *International J. Parasitol. Res.* 4: 75-82.
- Silver, J. B. 2008. *Mosquito Ecology - Field Sampling Methods*, Springer Netherlands.
- Sinka, M. E., M. J. Bangs, S. Manguin, T. Chareonviriyaphap, A. P. Patil, W. H. Temperley, P. W. Gething, I. R. Elyazar, C.W. Kabaria, R.E. Harbach, and S.I. Hay. 2011. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit. Vectors* 4: 89.
- Sriwichai, P., Y. Samung, S. Sumruayphol, K. Kiattibutr, C. Kumpitak, A. Payakkapol, J. Kaewkungwal, G. Yan, L. Cui, and J. Sattabongkot. 2016. Natural human *Plasmodium* infections in major *Anopheles* mosquitoes in western Thailand. *Parasit. Vectors* 9: 17.
- Tainchum, K., M. Kongmee, S. Manguin, M. J. Bangs, and T. Chareonviriyaphap. 2015. *Anopheles* species diversity and distribution of the malaria vectors of Thailand. *Trends Parasitol.* 31: 109-119.
- Tananchai, C., R. Tisgratog, W. Juntarajumnong, J. P. Grieco, S. Manguin, A. Prabaripai, and T. Chareonviriyaphap. 2012. Species diversity and biting activity of *Anopheles dirus* and *Anopheles baimaii* (Diptera: Culicidae) in a malaria prone area of western Thailand." *Parasit. Vectors* 5: 211.
- Tisgratog, R., C. Tananchai, W. Juntarajumnong, S. Tuntakom, M.J. Bangs, V. Corbel, and T. Chareonviriyaphap. 2012. Host feeding patterns and preference of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) in a malaria endemic area of western Thailand: baseline site description. *Parasit. Vectors* 5: 114.
- Tun, K.M., M. Imwong, K.M. Lwin, A.A. Win, T.M. Hlaing, T. Hlaing, K. Lin, M.P. Kyaw, K. Plewes, M.A. Faiz, et al. 2015. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect. Dis.* 15: 415-421.
- Walton, C., J.M. Handley, C. Kuvangkadilok, F.H. Collins, R.E. Harbach, V. Baimai, and R.K. Butlin. 1999. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med. Vet. Entomol.* 13: 24-32.
- Walton, C., P. Somboon, S.M. O'Loughlin, S. Zhang, R.E. Harbach, Y.M. Linton, B. Chen, K. Nolan, S. Duong, M.Y. Fong, I. Vythilingum, Z.D. Mohammed, H.D. Trung, and R.K. Butlin. 2007. Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infect. Genet. Evol.* 7: 93-102.



## RESEARCH ARTICLE

# Safety and effectiveness of mass drug administration to accelerate elimination of artemisinin-resistant falciparum malaria: A pilot trial in four villages of Eastern Myanmar

Jordi Landier , Ladda Kajeechiwa, May Myo Thwin, Daniel M. Parker , Victor Chaumeau, Jacher Wiladphaingern, Mallika Imwong, Olivo Miotto, Krittaya Patumrat, Jureeporn Duanguppama, Dominique Cerqueira, Benoit Malleret, Laurent Rénia, Suphak Nosten, Lorenz von Seidlein, Clare Ling, Stéphane Proux, Vincent Corbel, Julie A. Simpson, Arjen M. Dondorp, Nicholas J. White, François H. Nosten  <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre for Tropical Medicine and Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, OX3 7BN, UK

<sup>2</sup>Shoklo Malaria Research Unit, Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Mae Sot, Thailand

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

<sup>4</sup>Maladies Infectieuses et Vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (IRD 224-CNRS 4280 UM1-UM2), Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France

<sup>5</sup>Department of Molecular Tropical Medicine and Genetics, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

<sup>6</sup>Mahidol Oxford Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

<sup>7</sup>Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, CB10 1SA, UK

<sup>8</sup>Centre for Genomics and Global Health, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, OX3 7BN, UK

<sup>9</sup>Singapore Immunology Network (SigN), Agency for Science & Technology, Singapore, 138632, Singapore

<sup>10</sup>Department of Microbiology & Immunology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, 119077, Singapore

<sup>11</sup>Centre for Epidemiology and Biostatistics, Melbourne School of Population and Global Health, The University of Melbourne, Melbourne, VIC, 3053, Australia

**v1** First published: N/A, N/A: N/A (doi: N/A)

Latest published: N/A, N/A: N/A (doi: N/A)

## Abstract

**Background:** Artemisinin and partner drug-resistant falciparum malaria is expanding over the Greater Mekong Sub-region (GMS). Eliminating falciparum malaria in the GMS while drugs still retain enough efficacy could prevent global spread of antimalarial resistance. Eliminating malaria rapidly requires targeting the reservoir of asymptomatic parasite carriers.

This pilot trial aimed to evaluate the acceptability, safety, feasibility and effectiveness of mass-drug administration (MDA) in reducing malaria in four villages in Eastern Myanmar.

**Methods:** Villages with  $\geq 30\%$  malaria prevalence were selected. Long-lasting insecticidal bednets (LLINs) and access to malaria early diagnosis and treatment (EDT) were provided. Two villages received MDA immediately and two were followed for 9 months pre-MDA. MDA consisted of a 3-day supervised course of dihydroartemisinin-piperaquine and single low-dose

## Open Peer Review

**Referee Status:** Awaiting Peer

Review

## Discuss this article

Comments (0)

primaquine administered monthly for three months. Adverse events (AE) were monitored by interviews and consultations. Malaria prevalence was assessed by ultrasensitive PCR quarterly for 24 months. Symptomatic malaria incidence, entomological indices, and antimalarial resistance markers were monitored.

**Results:** MDA was well tolerated. There were no serious AEs and mild to moderate AE were reported in 5.6%(212/3931) interviews. In the smaller villages, participation to three MDA courses was 61% and 57%, compared to 28% and 29% in the larger villages. Baseline prevalence was higher in intervention than in control villages (18.7% (95%CI=16.1-21.6) versus 6.8%(5.2-8.7),  $p<0.0001$ ) whereas 3 months after starting MDA, prevalence was lower in intervention villages (0.4%(0.04-1.3) versus 2.7%(1.7-4.1),  $p=0.0014$ ). After 9 months the difference was no longer significant (2.0%(1.0-3.5) versus 0.9%(0.04-1.8),  $p=0.10$ ). M0-M9 symptomatic falciparum incidence was similar between intervention and control. Before/after MDA comparisons showed that asymptomatic *P. falciparum* carriage and anopheline vector positivity decreased significantly whereas prevalence of the artemisinin-resistance molecular marker remained stable.

**Conclusions:** This MDA was safe and feasible, and when added to EDT and LLINs could accelerate elimination of *P. falciparum* when community participation was sufficient.

**Corresponding author:** Jordi Landier ([jordi.landier@gmail.com](mailto:jordi.landier@gmail.com))

**Author roles:** Landier J: Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing; Kajechiwa L: Investigation, Project Administration, Writing – Review & Editing; Thwin MM: Investigation, Project Administration, Writing – Review & Editing; Parker DM: Investigation, Visualization, Writing – Review & Editing; Chaumeau V: Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Writing – Review & Editing; Wiladphaingern J: Data Curation, Investigation, Writing – Review & Editing; Imwong M: Investigation, Resources, Writing – Review & Editing; Miotto O: Investigation, Methodology, Resources, Writing – Review & Editing; Patumrat K: Investigation, Writing – Review & Editing; Duanguppama J: Investigation, Writing – Review & Editing; Cerqueira D: Investigation, Supervision, Writing – Review & Editing; Malleret B: Resources; Rénia L: Resources, Writing – Review & Editing; Nosten S: Investigation, Project Administration, Writing – Review & Editing; von Seidlein L: Conceptualization, Methodology, Project Administration, Writing – Review & Editing; Ling C: Investigation, Project Administration, Supervision, Writing – Review & Editing; Proux S: Investigation, Project Administration, Supervision, Writing – Review & Editing; Corbel V: Conceptualization, Investigation, Project Administration, Supervision, Writing – Review & Editing; Simpson JA: Formal Analysis, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing; Dondorp AM: Conceptualization, Funding Acquisition, Project Administration, Supervision, Writing – Review & Editing; White NJ: Conceptualization, Funding Acquisition, Methodology, Project Administration, Supervision, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing; Nosten FH: Conceptualization, Funding Acquisition, Investigation, Project Administration, Supervision, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing

**Competing interests:** No competing interests were disclosed.

**How to cite this article:** Landier J, Kajechiwa L, Thwin MM *et al.* Safety and effectiveness of mass drug administration to accelerate elimination of artemisinin-resistant falciparum malaria: A pilot trial in four villages of Eastern Myanmar Wellcome Open Research , : (doi: [Sversion.doi](https://doi.org/10.1186/s13063-017-1488-1))

**Copyright:** © 2017 Landier J *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution Licence](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Grant information:** This work was supported by the Wellcome Trust [101148]; and the Bill and Melinda Gates Foundation [GH OPP 1081420]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**First published:** N/A, N/A: N/A (doi: N/A)

## Introduction

Recent progress in the control of malaria is now under threat because the two pillars of malaria control – antimalarial drugs and insecticides – are falling to resistance<sup>1</sup>. Historically, the Greater Mekong sub-region (GMS) has been the source of antimalarial drug resistance, and artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* has also emerged and recently spread in this region<sup>2</sup>. Artemisinin resistance has led to the failure of artemisinin based combination treatments (ACT)<sup>3,4</sup>, the cornerstone of uncomplicated *P. falciparum* malaria therapy worldwide. Without alternative medicines in the near future, the best option to prevent the spread to Africa is the rapid elimination of *P. falciparum* parasites from the GMS. Early detection and treatment of clinical cases at the community level is effective in preventing mortality and reduces *P. falciparum* transmission and the associated morbidity<sup>5–7</sup>. However this approach alone is unlikely to halt the rapid spread of artemisinin resistance because large foci where asymptomatic carriage of *P. falciparum* is common remain unaddressed. This persistent reservoir represents the main obstacle to the rapid elimination of falciparum malaria in the GMS, where transmission is low, seasonal and unstable<sup>8,9</sup>.

Systematic antimalarial drug treatment of the entire population of these foci may be the only method to achieve a rapid elimination of the parasite reservoir in the absence of a point-of-care test sensitive enough to allow mass screening and treatment of submicroscopic carriers<sup>10–12</sup>. Mass drug administration (MDA) in malaria remains controversial because of its varied history of success and failure<sup>13</sup>. MDA in the ACT era relies on piper-quinine, which provides approximately 1-month protection from reinfection. Adding single low-dose primaquine rapidly sterilises *P. falciparum* infections<sup>14</sup>. Promising short term results following MDA were recently obtained in Zambia, albeit in a context of generally decreasing malaria prevalence<sup>15</sup>. We present a 24 months pilot study of the safety and effectiveness of MDA in reducing *P. falciparum* incidence and prevalence in four villages with high prevalence of sub-microscopic infections located on the Thailand–Myanmar border, an area where artemisinin resistance is firmly established<sup>16,17</sup>.

## Methods

### Study design

This study was the pilot phase of a multicentre cluster-randomized control trial conducted in several sites in the GMS and therefore limited to a sample size of four villages. It is registered at ClinicalTrials.gov: [NCT01872702](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01872702).

The study was conducted in rural Eastern Kayin (Karen) state of Myanmar, a region endemic for *P. falciparum* and *P. vivax* malaria<sup>17</sup>. In early 2013, 12 villages were screened using a high volume ultra-sensitive qPCR assay method (uPCR) with the original intention of identifying villages with >30% malaria prevalence, of which >30% was *P. falciparum* (Supplementary File 1: Table S1). However, the *P. falciparum* prevalence was lower than expected, so after the survey the threshold proportion of *P. falciparum* for inclusion was lowered to 10%. Four villages fulfilling this revised entry criterion were selected after community engagement and agreement by the village leaders. A malaria post (MP) was set up at M0 in all four

villages and long lasting insecticidal nets (LLIN) were provided. Two villages (group A) were randomized (using a flipped coin) to receive anti-malarial MDA for three consecutive months (M0 to M2) immediately. The other two villages (group B) were monitored for a 9-month control period with MP and LLIN only. The control period was planned originally for 12 months, but MDA had to be expedited because of accessibility concerns during the rainy season, and was given from months 9 to 11 (M9 to M11). All four villages were followed for 24 months in total.

### Ethics statement

This study protocol was reviewed and approved by OxTREC (reference no. 1017–13 and 1015–13), by the Tak Community Advisory Board<sup>18</sup>, and by village committees. Participation in surveys and MDA activities was voluntary. In addition to group information during community engagement activities, participants received individual information in their language (Karen or Burmese) and provided written informed consent before inclusion in a survey or MDA. Participants under 18 years provided an assent in addition to the consent of their parent or guardian.

### Study participants

Participants were defined as individuals living in the village who provided information during home visits at any time point. Each participant was followed using a unique identification code to collect information on participation, adverse events, malaria carriage during surveys, clinical episodes of malaria, and mobility.

### Interventions

Before and during the study, community engagement (CE) activities were conducted (detailed in 19). Briefly, the aim of community engagement was to present the project to the community and involve its members to create understanding and buy-in of the population, and result in a high coverage of the interventions<sup>20</sup>. The different activities conducted were: workshops with authorities and local gatekeepers, meetings at different scale and with different population groups, health-related community incentives (ancillary care and health education; building of water catchment, distribution systems and public latrines in each of the study villages)<sup>19</sup>. Through this mutual understanding, the study activities could be conducted while respecting the life of the community and ensuring maximal benefit for the participants.

A population census was conducted, individuals were linked to houses (with both individual and house identification codes), and geographic references (latitude and longitude) were recorded for each house. Population movement in and out of villages was monitored by census during the quarterly surveys and by home visits. Newcomers intending to stay in the village for more than two weeks were enrolled after consenting to participate in the follow-up surveys. All newcomers arriving after MDA were offered a single curative treatment course of DP-primaquine, irrespective of disease or infection status.

A MP was set up at M0 in all four villages to provide early detection and treatment of clinical cases<sup>7</sup>. Fever cases were tested with SD Bioline Pf/Pv RDT. Uncomplicated *P. falciparum* cases were given weight-adjusted doses of dihydroartemisinin-piper-quinine

(DP) for three days and one 0.25mg base/kg dose of primaquine. Uncomplicated *P. vivax* cases were given weight-adjusted doses of chloroquine for three days. Severe illnesses were referred to the nearest clinic. LLINs were distributed to all households at M0.

Blood sampling surveys of the entire village population were conducted at months 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 24. Samples of 3 and 0.5 mL of blood were taken by venous puncture from survey participants over and under 5 years respectively. Malaria infection was detected in the laboratory by RDT, microscopy and by uPCR, which had an approximate limit of detection of 20 parasites/mL<sup>8,21</sup>.

Each MDA comprised a standard 3-day treatment course of DP (dihydroartemisinin (7mg/kg) and piperaquine (55 mg/kg, Guilin Pharmaceutical Co, Guilin, PRC) and one 0.25mg base/kg dose of primaquine given orally under supervision. Treatments were given three times at one-month intervals (M0 to M2 or M9 to M11).

#### Inclusion and exclusion criteria

Infants <6 months, individuals with a known allergy to any of the antimalarial drugs, and pregnant women in their first trimester were excluded from MDA participation. Pregnant women in their second or third trimester and breastfeeding mothers were eligible for DP, but excluded from primaquine treatment. Women of childbearing age were asked if they were or could be pregnant and a pregnancy test was offered if unsure. Infants <6 months were excluded from prevalence surveys.

#### Adverse event monitoring

Adverse events (AE) were monitored using a structured questionnaire on the second, third and 7th day after the start of the MDA treatment course. During the three months of MDA, a mobile clinic staffed with a medical assistant was available in the village to provide free consultations to all villagers and to assess MDA participants presenting with AEs. Serious adverse events (SAEs) were reported centrally.

#### Variable collection and definition

**Participant follow-up.** The individual follow-up time was defined as the number of days spent within the catchment area of the MP, i.e. the village and the surrounding farms.

**Participation in MDA.** Participation in MDA was measured as the total number of individuals completing one, two or three 3-day DP treatment courses divided by the total number of inhabitants present in the village at least once during the 3-month period, after excluding individuals who visited the village for two weeks or less. Individual participation in MDA was categorized in 3 groups: no MDA, 1 or 2 rounds (infection cured, but incomplete protection from reinfection by DP), and 3 rounds MDA (infection cured and 3-month protection).

**Malaria infection prevalence.** Prevalence of *P. falciparum* or *P. vivax* infection was defined as the proportion of individuals with a positive uPCR for each parasite divided by total number of individuals sampled. When the parasite species could not be determined (because of low parasite density) samples were attributed

to species based on the falciparum/vivax ratio measured in clinical cases in the village during the previous period<sup>8</sup>.

**Incidence of symptomatic malaria.** Symptomatic malaria cases were defined as individuals with fever (temperature  $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ ) or history of fever in the past 2 days and confirmed falciparum or vivax infection by RDT or microscopy. During the period between surveys, cases were detected passively at the MP and confirmed by RDT. During survey periods, individuals with fever or history of fever and a positive RDT or microscopy slide (with uPCR confirmation when available) were considered clinical cases. Incidence of clinical malaria episodes in the village was expressed in cases per 1000 persons per month (number of infections during the month/sum of individual follow-up time during the month). Patients residing in nearby villages and coming to the MP for diagnosis were excluded from the analysis. Mixed infections contributed to both *P. falciparum* and *P. vivax* incidence.

#### Detection of molecular markers of antimalarial resistance

**Assessment of mutations in *PfKelch13*.** Polymorphisms in the *PfKelch* gene were assessed by nested PCR amplification covering the full length of the gene (total 2181 bp)<sup>22</sup>, and followed by sequencing of the gene by ABI Sequencer (Macrogen Inc, South Korea). Cross contamination was monitored by adding negative control samples in every run. Sequencing results were aligned against *PfKelch13* of reference strain 3D7 (putative 9PF13\_0238 NCBI Reference Sequence (3D7): XM\_001350122.1), using Bioedit software (Abbott, CA, USA). Polymorphic patterns were assessed by two individuals blinded to the origin of the sample.

***PfPlasmepsin2* gene amplification.** *Pfplasmepsin2* copy number was quantified using Relative-quantitative Real-time PCR based on Taqman probe on a Corbett Rotor-Gene<sup>TM</sup> Q (Corbett Research, Australia). Primers and probes have been described previously<sup>23</sup>. Amplification was performed in triplicate on a total volume of 25  $\mu\text{L}$  as multiplex PCR using Quantitec Multiplex PCR no ROX (QIAGEN, Germany). Every amplification run contained 9 replicates of calibrators and triplicates without template as negative controls.  $\beta$ -tubulin served as an internal standard for the amount of sample DNA added to the reactions. Copy numbers were calculated using the formula: copy number =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  with  $\Delta\Delta C_t$  denoting the difference between  $\Delta C_t$  of the unknown sample and  $\Delta C_t$  of the reference sample.

#### Entomology

Entomological surveys to identify malaria vectors species and abundance were conducted monthly in each village for 5 nights per month, as described elsewhere<sup>23,24</sup>. Briefly, mosquitoes were collected using indoor and outdoor human landing catch (HLC) in 5 sites per village, yielding a total of 50 human.nights per survey. Infection of primary malaria vectors (*Anopheles minimus* s.l., *An. maculatus* s.l. and *An. dirus* s.l.) by Plasmodium parasites was determined using a quantitative real-time PCR (qPCR) assay, confirmed with a second assay amplifying a different DNA target<sup>25</sup>. The limit of detection of the whole procedure was 6 *P. falciparum* sporozoites per mosquito<sup>25</sup>. Main entomological indices - human biting rate (HBR), sporozoite index (SI), and entomological inoculation rate (EIR) - were calculated.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Stata 14.1 (StataCorp, USA). Binomial 95% confidence intervals (CIs) were calculated for prevalence and SI, and Poisson 95% CIs for incidence of clinical episodes, HBR, and EIR. Intervention and control group prevalence were compared using chi-square or Fisher's exact test, as appropriate.

### Pre-specified pilot trial endpoints

After being forced to evaluate the initial phase early, due to accessibility and logistic constraints, the revised primary endpoints were defined as the prevalence of asymptomatic *P. falciparum* infection 3 and 9 months after MDA. The secondary endpoints were defined as 1) safety and 2) acceptability of MDA, as evaluated by questionnaires. Additional outcome measures reported here are the incidence of clinical malaria over the first 9 months, number of people participating in MDA, and proportion of artemisinin-resistant *P. falciparum* infections.

### Before/after analysis

A post-hoc before/after analysis of the entire duration of follow-up was conducted to understand the factors influencing the impact of antimalarial MDA and the overall intervention. The effect of the intervention on *P. falciparum* carriage (recorded in prevalence surveys) was estimated using Generalised Estimating Equations (GEE) with a logit link to estimate Odds Ratios (ORs), an exchangeable correlation structure and robust standard errors to account for repeated measurements at individual level. The change in odds of *P. falciparum* carriage in the control period compared with after MDA was estimated, as well as comparisons of the two periods with the baseline survey. To assess the duration of MDA effect, time-dependent changes in the odds of *P. falciparum* carriage were estimated separately for the control and after MDA periods. Demographic characteristics, village, age group ( $\leq$  &  $>10$  years), sex and season, were included as covariates. The analysis was repeated to assess the effect of individual MDA participation. Baseline *P. falciparum* infection status was added as a covariate in addition to the demographic characteristics.

### Results

The study was conducted between May 2013 and June 2015 (Table 1). Of 3238 individuals recorded in the villages during the 24-month study period, 2941 participated in surveys or MDA at least once (Table 1). The population structure and mobility were typical of rural villages in this area (Supplementary File 1: Figure S2S2). There was substantial turnover of the population in all villages: at any time point, between 19 and 27% of the population corresponded to individuals with  $<12$  months follow-up (Table 1, Supplementary File 1: Figure S2 and Figure S3S3). Around 70% of people stayed in the village continuously during the three consecutive months of MDA.

### Mass antimalarial drug administration (MDA)

**MDA coverage.** The target population was 2392 residents of the four villages at the time of MDA. Overall 78% (1866/2392) of the target population received at least one 3-day course of DP and 38% (911/2392) received the full course of three treatments. Coverage

was much higher in the two small villages compared to the two larger villages, for uptake of at least one treatment (A1-KNH: 93%; 360/386 and B1-TPN: 92%; 339/367 compared to A2-TOT: 74%; 487/662 and B2-HKT: 70%; 680/977) and uptake of three treatments (A1-KNH: 61%; 236/386 and B1-TPN: 57%; 210/367 compared to A2-TOT: 28%; 185/662 and B2-HKT: 29%; 280/977) (Table 1; Figure 1).

**Safety and tolerability of MDA.** MDA was well accepted and well tolerated. In 3719 of 3931 (94.6%) complete structured interviews, no adverse events (AE) were reported. The majority of reported AE were dizziness (N=192) and pruritus (N=17). There were three reports of black urine. One G6PD-deficient male reported black urine before primaquine and one G6PD-normal male reported black urine 48h after primaquine. Neither were anaemic and both remained well. The third case, a G6PD heterozygote woman with normal G6PD activity, became anaemic but concomitant HIV and TB were considered contributory, as reported previously<sup>26</sup>. The proportions reporting AEs declined after each MDA round from 8.2% (114/1394) to 3.7% (49/1336). Among the 200 patients who presented at the mobile clinic over the 3-month MDA period, all AEs were mild or moderate and most (188/200, 94%) were rated as unrelated or unlikely to be related to treatment (Table 2). During the 24 months of the study, there were 23 reported severe AEs and 15 deaths; none were considered drug related (Supplementary File 1: Table S2). Haemoglobin decreases in G6PD-deficient individuals were minimal<sup>26</sup>.

### Malaria prevalence

There was a significant difference in baseline *P. falciparum* prevalence between intervention and control villages (18.7% (150/801) versus 6.8% (58/848);  $p<0.0001$ ).

The majority of malaria infections detected by uPCR during the cross-sectional surveys were asymptomatic (86%; 1769/2059) and 70% were not detected by microscopy or RDT (1432/2059) (Supplementary File 1: Table S3). Overall, of 217 individuals positive for *P. falciparum*, 17 (8%) were still positive in the following survey 3 months later, three were positive at 6 months and one at 9 months. DP was highly efficacious; no participant receiving at least one complete 3-day DP course was positive for *P. falciparum* in the survey following MDA (M3 or M12), irrespective of previous infection status (Supplementary File 1: Table S4 and Table S5). During the follow-up (excluding MDA intervention period), 69% (707/1018) of newcomers to the villages were included in the first survey after their arrival, of whom 1.6% (11/707) were positive for *P. falciparum*.

### Efficacy of MDA

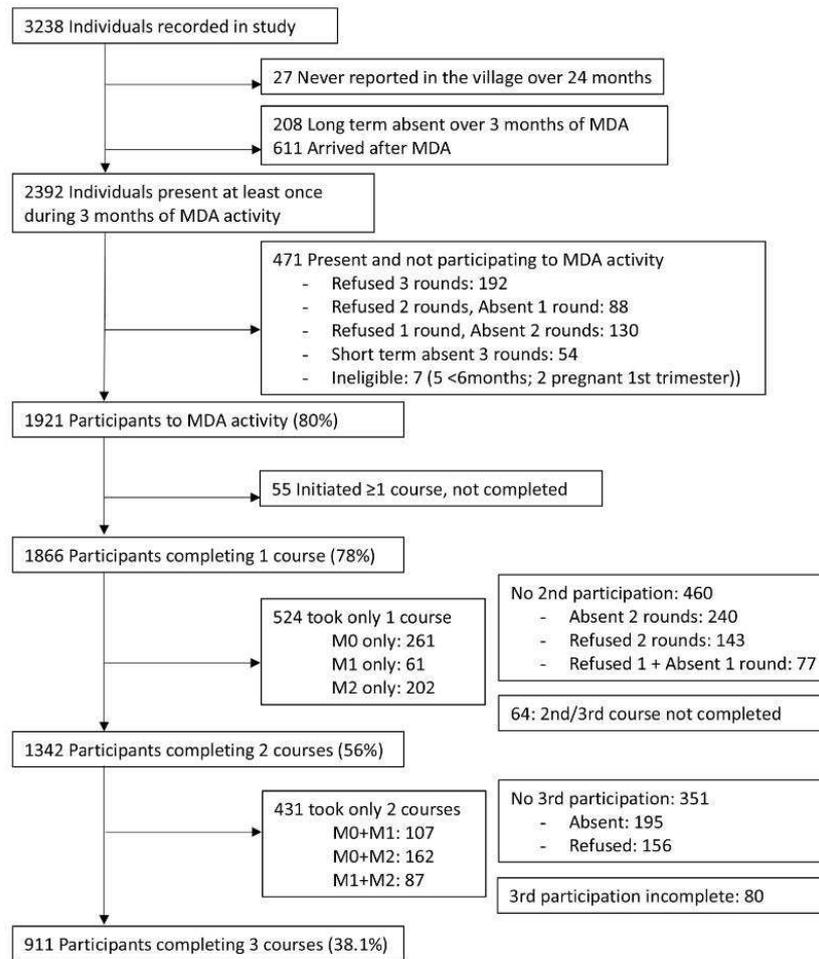
#### Pilot trial endpoints: MDA+MP/MP only comparison

**Prevalence.** At M3 the prevalence of asymptomatic *P. falciparum* infection had fallen to 0.4% (2/552; 95% CI 0.04 to 1.3), in intervention villages A1-KNH and A2-TOT, and 2.7% (22/812; 1.7 to 4.1) in non-intervention control villages, B1-TPN and B2-HKT ( $p=0.001$ ). Comparing M0 to M3, prevalence decreased by 98% in MDA villages compared to a 57% decrease in control villages. At M9, the difference in prevalence was no longer significant: 2.0%

**Table 1. Demographics, follow-up of participants, population coverage with mass drug administration (MDA) and duration of intervention, and access to malaria post of the four study villages in Eastern Kayah State, Myanmar.** A map of the villages is presented in [Supplementary File 1: Figure S1](#).

	A1-KNH	A2-TOT	B1-TPN	B2-HKT
<b>Village randomization information</b>				
Pilot survey <i>P. falciparum</i> prevalence: % (n/N)	16 (8/51)	7 (3/41)	4 (2/54)	15 (7/48)
Pilot survey malaria prevalence: % (n/N)	42 (22/51)	42 (17/41)	32 (17/54)	42 (20/48)
Randomization group	Intervention	Intervention	Control MOM9	Control MOM9
Study start date (M0)	12/06/2013	27/05/2013	20/05/2013	02/06/2013
Study end date (M24)	07/05/2015	25/04/2015	27/03/2015	04/06/2015
<b>Population and follow-up</b>				
Total population recorded over 24 months	494	940	488	1316
Participants over 24 months: n (%)	484 (98)	799 (85)	473 (97)	1185 (90)
Median age [IQR] (years)	23 [9–41]	19 [7–38]	20 [6–38]	19 [8–38]
Newcomers before MDA (n)	na	na	114	293
Newcomers during MDA (n)	83	75	7	112
Newcomers after MDA (n)	103	271	46	191
Newcomers taking 1 systematic treatment upon arrival, after MDA: n/N (%)	63/103 (61)	34/271 (13)	25/46 (54)	30/191 (16)
Prevalence of <i>P. falciparum</i> infection among newcomers after MDA: n/N (%)	2/78 (2.6)	3/150 (2.0)	0/32 (0)	1/170 (0.6)
<b>Average "real time" population composition: n (%)</b>				
Number of inhabitants‡	344	610	317	837
Female‡	163 (47)	301 (49)	147 (46)	395 (47)
Male‡	181 (53)	309 (51)	170 (54)	442 (53)
Participants with >12 months follow-up‡	277 (81)	463 (76)	257 (81)	613 (73)
Participants with 3–12 months follow-up‡	58 (17)	124 (20)	51 (16)	192 (23)
Participants with <3 months‡	9 (3)	23 (4)	9 (3)	32 (4)
<b>MDA implementation</b>				
MDA start date	12/06/2013	27/05/2013	28/01/2014	01/04/2014
Study month of MDA start	M0	M0	M9	M9
Duration of round 1; 2; 3 of MDA (days)	9; 10; 11	7; 14; 10	6; 9; 4	9; 9; 12
Duration to administer 3 doses to >90% of participants in 1 round: mean (days)	4	6	4	6
<b>Population during MDA period and MDA coverage: n (%)</b>				
Present at least once during the 3 MDA months	386 (100)	662 (100)	367 (100)	977 (100)
Present continuously during 3 MDA months	280 (73)	488 (74)	283 (77)	618 (63)
Taking 0 round of MDA	26 (7)	175 (26)	28 (8)	297 (30)
Taking 1 round of MDA	60 (16)	180 (27)	64 (17)	220 (23)
Taking 2 rounds of MDA	64 (17)	122 (18)	65 (18)	180 (18)
Taking 3 rounds of MDA	236 (61)	185 (28)	210 (57)	280 (29)
<b>Malaria Post access</b>				
Consultations from the village	575	770	513	1496
Consultations from study participants	515	603	488	889
<i>P. falciparum</i> malaria cases from the village	6	89	9	8
<i>P. vivax</i> malaria cases from the village	81	139	47	191
Consultations from outside the village	465	390	192	1242
<i>P. falciparum</i> malaria cases from outside the village	11	66	4	20
<i>P. vivax</i> malaria cases from outside the village	52	67	11	277
Total number of weeks of MP inactivity	6	17	5	4
Mean consultations per 100/active week	3.2	2.0	2.0	3.8

‡values presented are averages over 10 census occasions during surveys in the village.



**Figure 1.** Flow chart of the participation in antimalarial MDA in the four villages.

**Table 2.** Safety of mass drug administration (MDA) intervention in the participant population: severity and relation to drugs of adverse events (AE) investigated at the mobile clinic set up during the three months of MDA (M0–M3 or M9–M12). Severe AEs over the 24-month follow-up are detailed in [Supplementary File 1: Table S2](#).

Severity	Relationship to drug					Total
	Not related	Unlikely related	Possibly related	Probably related	Highly likely related	
<b>Mild</b>	134 Infection (71) Weakness (39) Dizziness (4) Allergy (1) Other (19)	49 Infection (5) Weakness (19) Dizziness (23) Allergy (1) Other (1)	7 Infection (2) Weakness (3) Dizziness (1) Allergy (1)	0	1 Allergy (1)	191
<b>Moderate</b>	5 Infection (4) Other (1)	0	4 Weakness (2) Allergy (2)	0	0	9
<b>Severe</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	139	49	11	0	1	200

(11/564; 1.0-3.5) in MDA villages, and 0.9% (9/959; 0.04-1.8) in control villages ( $p=0.10$ ). Comparing M0 to M9, MDA villages exhibited an 88% decrease in prevalence, compared to an 85% decrease in control villages.

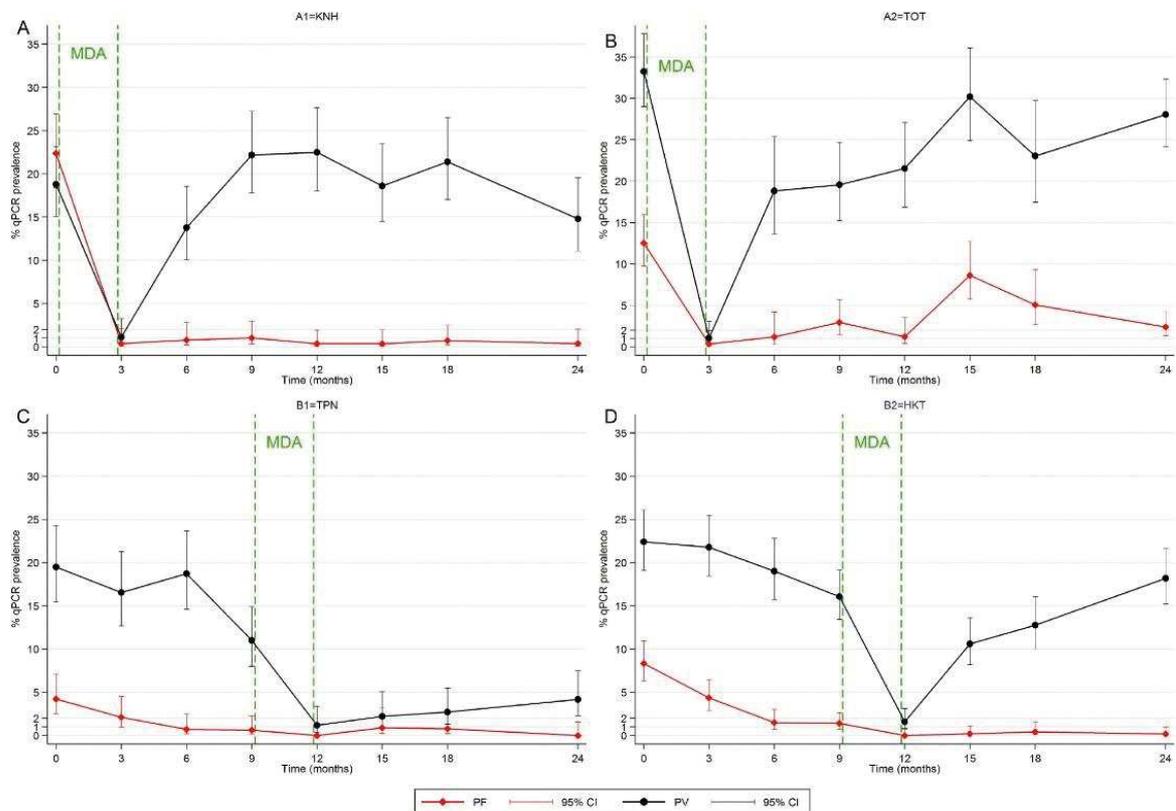
**Incidence.** Between M0 and M9, falciparum malaria incidence was 1.0 case/1000 person-months (95%CI=0.4-1.9) in MDA villages (8/8352) compared with 1.3 case/1000 person-months (0.6-2.5) in control villages (10/7469,  $p=0.49$ ). *P. vivax* malaria incidence was 8.6 cases/1000 person-months (6.8-10.9) in MDA villages (72/8352), compared with 5.6 cases/1000 person-months (4.1-7.6) in control villages (42/7469,  $p=0.03$ ).

#### Before/after MDA comparison

***P. falciparum* asymptomatic infection.** The impact of MDA on *P. falciparum* asymptomatic carriage was different in the two intervention villages. In A1-KNH, there was a rapid >95% reduction in *P. falciparum* prevalence, which was sustained from

M3 to M24 (Figure 2). In contrast, in village A2-TOT, prevalence fell between M0 and M3, to reach a peak at M15 during rainy season (Figure 2). In this village, prevalence was maintained around 5% among individuals who did not take MDA, from M3 to M24 (Supplementary File 1: Figure S4). Prevalence in the control villages decreased gradually over the control period, dropping at 0% at M12 immediately after MDA, and remained below after MDA (Figure 2).

Adjusting for age group, sex, village and season, MDA was associated with an overall 12-fold decrease in odds of *P. falciparum* carriage over the full observation period (21 month for intervention and 15 months for controls) compared to baseline (OR [95%CI]=0.08 [0.05-0.11]) (Table 3). The control period before MDA was also associated with a significant decrease in odds of *P. falciparum* carriage (0.4 [0.3-0.7]) (Table 3). This translated into a significant 5-fold odds reduction after MDA compared to control period (0.2 [0.1-0.3]).



**Figure 2.** Prevalence of *P. falciparum* and *P. vivax* carriage over 24 months measured by uPCR in quarterly cross sectional surveys conducted in the four study villages. A steep decrease in prevalence immediately followed MDA in all 4 villages. The reduction in *P. falciparum* prevalence was sustained in 3 of 4 villages stabilizing to a <1% prevalence after MDA. In contrast *P. vivax* prevalence rebounded in 3 of 4 villages. In village A2-TOT, *P. falciparum* prevalence increased at M15 and M18, mostly from clinical cases occurring while vector densities and thus transmission was increased (Table 5). A decrease in *P. falciparum* prevalence was observed in the control period (M0-M9) in villages B1 and B2, possibly attributable to the effect of early diagnosis and treatment provided by MP.

**Table 3. Multivariable analysis of factors associated with *Plasmodium falciparum* carriage during uPCR surveys over the 24-month study period and quantification of the impact of mass drug administration (MDA).** Two specifications of the MDA impact are presented showing overall impact by period (model 1) or including temporal trends (model 2). The impact of individual participation is presented in [Supplementary File 1: Table S7](#) (see also [Supplementary File 1: Table S6](#) for univariable analysis). The direct comparison between control and intervention adjusting for baseline *P. falciparum* infection is presented in [Supplementary File 1: Table S8](#) and [Supplementary File 1: Table S9](#). Baseline refers to M0 survey at the beginning of the study. Control period refers to the period between M0 and M9 in the two control villages after implementation of Malaria Post and LLIN distribution at M0. After MDA refers to the period where MDA had been conducted in addition to implementation of Malaria Post and LLIN distribution (M3 to M24 in intervention villages, M12 to M24 in control villages).

Variable	Categories	Adjusted OR	95%CI	p-value	
Age	≤10 years	1	Reference	<0.0001	
	>10 years	2.8	1.9–4.1		
Sex	Female	1	Reference	<0.0001	
	Male	2.3	1.7–3.2		
Village	B2–HKT	1	Reference	<0.0001	
	B1–TPN	0.8	0.4–1.4		
	A2–TOT	4.0	2.4–6.5		
	A1–KNH	2.8	1.9–4.0		
Season	Cold	1	Reference	<0.0001	
	Hot	1.0	0.6–1.6		
	Wet	2.5	1.6–4.1		
Model 1. Study period	Baseline (M0 survey)	1	Reference	<0.0001	
	Control period	0.4	0.3–0.7		
	After MDA period	0.08	0.05–0.11		
Model 2. Interaction between study period and time	Study period	Baseline (M0 survey)	1	Reference	<0.0001
		Control period	0.4	0.2–0.8	
		After MDA period	0.03	0.01–0.05	
	Time (for each additional month)	during control period	1.03	0.91–1.16	
		during period after MDA	1.08	1.03–1.12	

Compared to baseline, the decrease in odds of *P. falciparum* carriage was 30-fold immediately after MDA (0.03 [0.02–0.06]). Each additional month after MDA was associated with a minimal increase in odds of *P. falciparum* carriage (1.08 [1.03–1.12] for 1 additional month). For example, 12 months after MDA, a 15-fold reduction persisted (0.06 [0.04–0.09]). Similar results were obtained when estimating odds for each quarter instead of assuming a monthly linear trend ([Supplementary File 1: Figure S5](#)).

During the pre-MDA control period, individuals with baseline *P. falciparum* infections had a significantly increased odds of subsequent *P. falciparum* carriage compared to baseline uninfected individuals (17.2 [6.5–45.6]) ([Supplementary File 1: Table S8](#)). Irrespective from their baseline infection status, Individuals taking 1 or 2 rounds and individuals completing the 3 rounds of MDA had a significantly decreased odds of being infected with

*P. falciparum* compared to individuals in the control period (0.2 [0.1–0.6] and 0.1 [0.03–0.4] respectively). In contrast, individuals who did not receive MDA in villages allocated to it had no decrease in the odds of *P. falciparum* carriage (0.4 [0.1–1.9]) compared to the control period ([Supplementary File 1: Table S8](#)).

***P. falciparum* clinical malaria.** A total of 113 *P. falciparum* symptomatic infections were detected among study participants, of which 91 detected passively by the MP and 22 detected during surveys. An additional 19 cases were detected among non-participants (individuals who reported living in the village but were not recorded in the study, e.g. visitors).

In 3 out of 4 villages, the combined intervention of early diagnosis and treatment through the MP and MDA resulted in a dramatic and sustained decrease in the incidence rate of *P. falciparum*

clinical cases, which was close to zero after 12 months (Figure 3). Most of the clinical episodes (75/113, 66%) occurred during a 7-month period in village A2-TOT between July 2014 and January 2015 (M14 to M20), corresponding to the rainy and following cool seasons.

***P. vivax* clinical cases and asymptomatic carriage.** In 3 out of 4 villages, *P. vivax* prevalence was reduced only transiently by MDA (Figure 2). Even when MDA participation was high, *P. vivax* prevalence rebounded quickly to reach initial levels within 3 to 6 months. In village B1-TPN, *P. vivax* prevalence did not rebound as rapidly. *P. vivax* symptomatic malaria incidence was unaffected beyond the 3 months MDA period in 3 villages, with seasonal peaks of clinical cases during transmission seasons both before and after MDA (Figure 3). In village B1-TPN, the incidence did not return to pre-MDA levels.

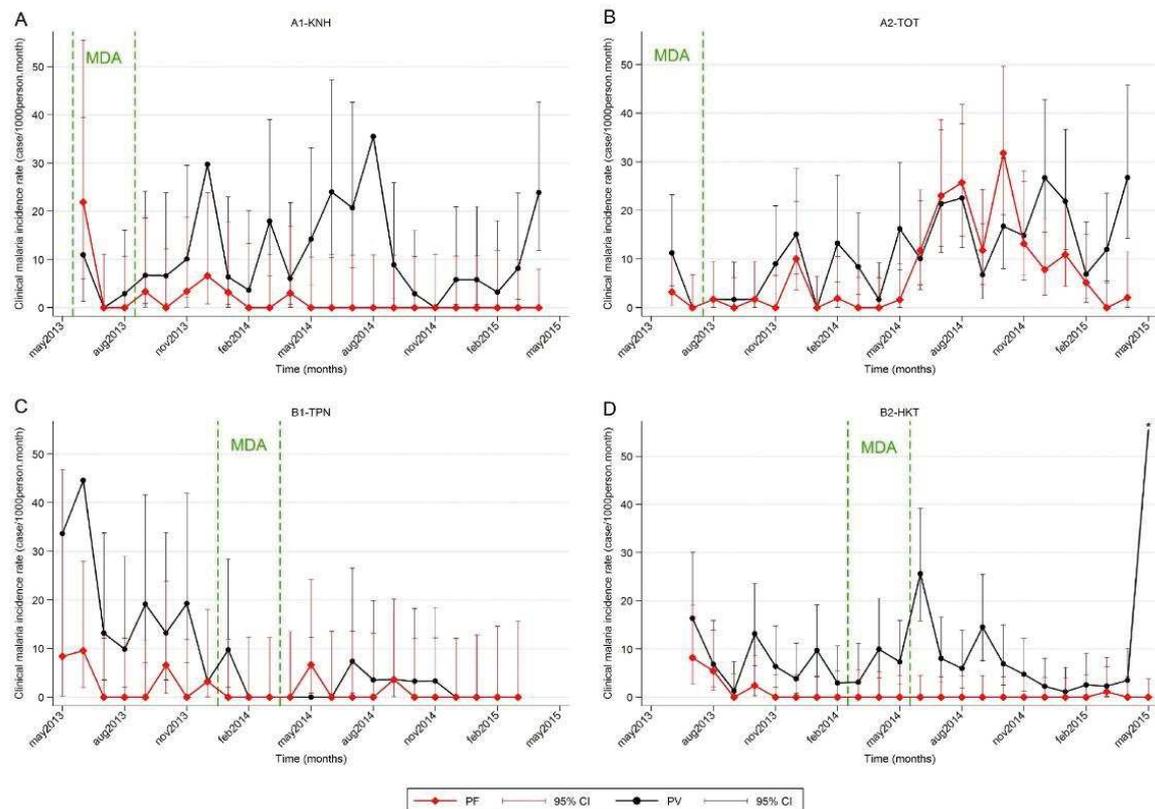
**Prevalence of molecular markers of antimalarial drug resistance**  
Data on the artemisinin resistance marker Pfk13 (PfK13) was available for 107 of 247 detected *P. falciparum* infections. The prevalence of PfK13 mutations was 77.6% (83/107) (Table 4). The most frequent mutations were C580Y (37.4%; 31/83) and G538V

(24.1%; 20/83). The prevalence of PfK13 mutants was 85.6% (95%CI=75.9–92.6) before, and 56.7% (37.4–74.5) after MDA.

No plasmepsin 2 amplification (the molecular marker of piperaquine resistance) was found in the 69 samples that could be analysed (53 before MDA and 16 after) (Table 4).

### Entomological findings

The main anopheline vectors in the villages belonged to the Minimum Complex (41% of total anopheles), Maculatus Group (11%) and Dirus Complex (1%). Overall, the SI of primary malaria vectors was 2.2/1000 for *P. vivax* and 0.4/1000 for *P. falciparum* (Table 5). During the period before MDA, the HBR was between 200 and 300 bites per human per month in all 4 villages. After MDA, the HBR was unchanged in A1-KNH and B2-HKT villages, decreased in B1-TPN, and increased in A2-TOT. In spite of these variations in abundance of vectors, SI and EIR were lower after MDA (SI [95%CI]=0.2 *P. falciparum* infected/1000 mosquitoes [0.05–0.4] and EIR [95%CI]=0.06 infective bites/human/month [0.02–0.15]) compared to before MDA period (SI [95%CI]=0.9 [0.5–1.6] and EIR [95%CI]=0.25[0.13–0.43];  $p=0.0001$  and  $0.005$ , respectively).



**Figure 3. Changes in the incidence of *P. falciparum* and *P. vivax* clinical cases.** Clinical falciparum malaria cases persisted up to 9 months in villages achieving stable <1% *P. falciparum* prevalence after MDA (A1, B1 and B2), before zero incidence was achieved. In village A2, where the intervention with MDA was not considered successful, a significant increase in incidence was observed during the rainy and cold seasons from July 2014 to January 2015.\* Incidence rate in B2-HKT for June 2015 was 100 cases/1000 person-month (95%CI=81–122).

**Table 4.** Detection of molecular markers of antimalarial resistance in *Plasmodium falciparum* positive samples according to period before and after mass drug administration (MDA).

	Before MDA	After MDA	Overall
PF positive samples by uPCR	191	56	247
Sample with Pfk13 result	77 (40.3%)	30 (53.6%)	107 (43.3%)
Samples with Pfk13 mutation	66	17	83
Pfk13 Mutation prevalence [95% CI]	85.6% [75.9–92.6]	56.7% [37.4–74.5]	77.6% [68.5–85.1]
Sample with Piperaquine resistance result	53 (27.7%)	16 (28.6%)	69 (27.9%)
Samples with Piperaquine resistance marker	0	0	0
Piperaquine resistance prevalence [95% CI]	0% [0–6.7]	0% [0–20.6]	0% [0–5.2]

**Table 5.** Human biting rate (HBR, bites/person/month), sporozoite index (SI, positive/1000) and entomological inoculation rate (EIR, infective bites/person/month) for primary malaria vectors (*Anopheles minimus*, *An. maculatus* and *An. dirus*) by study village according to period before and after mass drug administration (MDA) intervention.

		Before MDA‡			After MDA			All follow-up		
		n/N	index	95%CI	n/N	index	95%CI	n/N	index	95%CI
<b>A1-KNH</b>	Human.nights	200			850			1050		
	HBR	1615/6.67*	242	[231-254]	7803/28.33*	275	[269-282]	9418/35.00*	269	[264-275]
	Pf-SI	3/1574†	1.9	[0.4-5.6]	1/7307†	0.1	[0.004-0.8]	4/8881†	0.5	[0.1-1.2]
	Pf-EIR		0.46	[0.01-1.36]		0.04	[0.001-0.21]		0.12	[0.03-0.31]
<b>A2-TOT</b>	Human.nights	150			900			1050		
	HBR	1776/5.00*	355	[339-372]	22438/30.00*	748	[738-758]	24214/35.00*	692	[683-701]
	Pf-SI	3/1729†	1.7	[0.4-5.1]	3/20742†	0.1	[0.03-0.4]	6/22471†	0.3	[0.1-0.6]
	Pf-EIR		0.61	[0.13-1.88]		0.10	[0.02-0.30]		0.17	[0.07-0.39]
<b>B1-TPN</b>	Human.nights	600			400			1000		
	HBR	4500/20.00*	225	[218-232]	1419/13.33*	106	[101-112]	5919/33.33*	178	[173-182]
	Pf-SI	2/4265†	0.5	[0.1-1.7]	1/1271†	0.8	[0.02-4.4]	3/5536†	0.5	[0.1-0.6]
	Pf-EIR		0.12	[0.01-0.38]		0.08	[0.002-0.46]		0.11	[0.02-0.28]
<b>B2-HKT</b>	Human.nights	670			350			1020		
	HBR	6771/22.33*	302	[296-310]	3870/11.67*	332	[321-342]	10641/34.00*	312	[307-319]
	Pf-SI	5/6632†	0.8	[0.2-1.8]	0/3809†	0	[0-1]	5/10441†	0.5	[0.2-1.1]
	Pf-EIR		0.21	[0.07-0.54]		0	[0-0.36]		0.14	[0.05-0.36]
<b>4 villages</b>	Human.nights	1620			2500			4120		
	HBR	14662/54.00*	272	[267-276]	35530/83.33*	426	[422-431]	50192/137.33*	365	[362-369]
	Pf-SI	13/14200†	0.9	[0.5-1.6]	5/33129†	0.2	[0.05-0.4]	18/47329†	0.4	[0.2-0.6]
	Pf-EIR		0.25	[0.13-0.43]		0.06	[0.02-0.15]		0.14	[0.08-0.22]

‡ 1 to 2 surveys conducted during MDA intervention are included for each village

\* n captured/N person.time exposed (human.months)

† n positive/N tested

## Discussion

The rapid emergence of first artemisinin resistance and then ACT partner drug resistance in *P. falciparum* parasites in the GMS leaves few options to prevent worsening malaria and spread of resistance westwards, as has occurred before. This preliminary evaluation of the feasibility, safety and effectiveness of MDA in accelerating the elimination of artemisinin-resistant *P. falciparum* in communities with a high prevalence of asymptomatic malaria shows that MDA with DP and a single low dose of primaquine was safe and well accepted<sup>26</sup>. Most participants did not report any AE, and those who did reported only mild and transient AE which declined in frequency after each successive round. MP These essential components of malaria control, LLIN and access to diagnosis and treatment, were deployed at baseline and had a substantial impact on malaria, which was augmented by MDA. When coverage was high, MDA provided a marked and long-lasting impact on *P. falciparum* malaria prevalence and incidence, but these benefits were transient in one village (A2-TOT). Overall, the odds of *P. falciparum* carriage decreased by >95% immediately after MDA in comparison with baseline and an 80% decrease was maintained for 24 months.

The effect of these interventions on *P. vivax* malaria was substantially less important, as expected. The MDA did not target hypnozoites, so relapses of vivax were not prevented and *P. vivax* incidence and prevalence rose rapidly after the period of post treatment prophylaxis. Because of the relatively high prevalence of G6PD deficiency in this population and the unavailability of rapid testing, radical cure with primaquine was not used in *P. vivax* malaria treatment. Interestingly, in village B1-TPN only, the prevalence of *P. vivax* infection fell and did not rebound. This was probably related to the very low entomological indices in this village.

### Limitations of the study

The main limitation of this study is that, being a pilot investigation, it is underpowered to draw definitive conclusions on the overall benefit of this approach. The comparison between intervention and control is indeed strongly influenced by individual village characteristics: although the four villages had similar malaria prevalence in the pre-survey (Table 1, Supplementary File 1: Table S1), they were significantly different in the baseline exhaustive survey with a higher prevalence of asymptomatic malaria in the villages receiving MDA first.

A second limitation was that the beneficial effects of MDA could not be evaluated independently from the continuing effects of the malaria post and the LLINs. Their benefits are illustrated in the control villages where there was three-fold reduction in *P. falciparum* prevalence over a nine month observation period until MDA was conducted. As the two control villages had a relatively low baseline *P. falciparum* prevalence, the impact in a higher prevalence setting of instituting a malaria post and distributing LLIN without providing MDA cannot be predicted from these observations. Nevertheless providing MDA in these control villages after nine months reduced prevalence by 100% immediately after MDA, showing an additional effect of MDA to enhanced control measures, as shown recently in Zambia<sup>15</sup>.

Third, those who refused MDA were less likely to participate in surveys (as in village A2-TOT). This led to underestimation of the true prevalence of malaria, which was close to zero in the general survey population but 5% in the group of survey participants who did not take MDA. Individual participation in MDA was therefore included in the statistical models of impact to take this into account.

### Interpretation

The sustained reduction in *P. falciparum* prevalence in village A1-KNH, where MDA coverage was high, suggests a reduction of malaria transmission. This is supported by finding reductions of similar magnitude in *P. falciparum* SI and EIR, while HBR remained stable. By contrast, in A2-TOT, *P. falciparum* prevalence and incidence increased as vector abundance rose during the rainy and cold seasons of 2014, 14 to 20 months after MDA (Table 5). In this community broken by years of conflict, participation with MDA was low and the reservoir of sub-microscopic malaria parasite carriage was reduced only partially. The non-MDA participants may have contributed as a reservoir for *P. falciparum*, as indicated by a continuously high prevalence of asymptomatic *P. falciparum* carriage (5%) in this group. In addition, the MP was not functioning properly during the first year, with frequent interruptions of activity and the lowest rate of consultations among the four villages (Table 1 and Supplementary File 1: Figure S6). These observations illustrate the 'real-life' challenges that would confront a programme aiming for rapid elimination, and confirm the well described necessity of ensuring high coverage in any MDA campaign. They also underline the essential importance of providing diagnosis and effective treatment, both immediately after MDA and in an outbreak context as experienced in A2-TOT between M14 and 20. The low prevalence observed at M24 (2%) is likely the result of the adequate treatment of clinical episodes by the MP during the period M12 to M24, contrasting with the dysfunctions observed between M0 and M12.

Importantly this intervention does not appear to have modified the resistance profile of *P. falciparum* in the area. The prevalence of mutations in the artemisinin resistance marker PfPR13 did not increase and there was no indication that piperazine resistance was selected, although numbers were small. No markers of piperazine resistance were found either in >200 samples from clinics covering the same area and period, where DP was used for routine treatment of clinical cases (Miotto O, unpublished data).

### Conclusion

This pilot study shows that MDA with three rounds of a treatment course of DP and a single low dose of primaquine at one month interval is well tolerated, safe and feasible once the community has been successfully engaged in participation to activities and ownership of the program. It provides evidence that in a remote malaria endemic area, following implementation and support of a functioning MP, and distribution of LLIN, MDA eliminates the sub-microscopic parasite reservoir in those who take it. If a sufficiently high proportion of the community do participate and if early diagnosis and treatment of clinical episodes remains available, this has a long lasting effect on falciparum malaria reservoir. By contrast, *P. vivax* returns rapidly, presumably because of relapse, which occurs frequently in the GMS. These preliminary

findings need confirmation and exploration in further studies. Scaling up to provide MDA to larger populations will introduce new challenges of feasibility, but may improve overall effects as human migration from untreated areas becomes less likely. From a community perspective, elimination of malaria means elimination of all malaria, and to achieve that rapidly will require targeting the vivax hypnozoite reservoir.

#### Data availability

The data is available upon request to the Mahidol Oxford Tropical Medicine Research Unit Data Access Committee ([Supplementary File 2](#); <http://www.tropmedres.ac/data-sharing>) and following the Mahidol Oxford Tropical Medicine Research Unit data access policy ([http://www.tropmedres.ac/\\_asset/file/data-sharing-policy-v1-0.pdf](http://www.tropmedres.ac/_asset/file/data-sharing-policy-v1-0.pdf)).

#### Competing interests

No competing interests were disclosed.

#### Grant information

This work was supported by the Wellcome Trust [101148]; and the Bill and Melinda Gates Foundation [GH OPP 1081420].

*The sponsor of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.*

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the population from the communities of the four villages, the Karen Department of Health and Welfare and all Karen community-based organisations providing health services to these communities. The authors also thank the investigators of the other study sites for fruitful discussions and collaborations. The Shoklo Malaria Research Unit is part of the Mahidol Oxford University Research Unit supported by the Wellcome Trust of Great Britain.

#### Supplementary material

Supplementary File 1: Supplementary results.

[Click here to access the data.](#)

Supplementary File 2: Request form for Mahidol Oxford Tropical Medicine Research Unit Data Access Committee.

[Click here to access the data.](#)

#### References

- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, *et al.*: **Malaria**. *Lancet*. 2014; **383**(9918): 723–35.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, *et al.*: **Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria**. *N Engl J Med*. 2014; **371**(5): 411–23.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJC, *et al.*: **Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against *P. falciparum* Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003–2013): The Role of Parasite Genetic Factors**. *Clin Infect Dis*. 2016; **63**(6): 784–791.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Amaratunga C, Lim P, Suon S, *et al.*: **Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: A multisite prospective cohort study**. *Lancet Infect Dis*. 2016; **16**(3): 357–65.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Barnes KI, Chanda P, Ab Barnabas G: **Impact of the large-scale deployment of artemether/lumefantrine on the malaria disease burden in Africa: case studies of South Africa, Zambia and Ethiopia**. *Malar J*. 2009; **8**(suppl 1): S8.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Carrara VI, Sirilak S, Thonglairuam J, *et al.*: **Deployment of early diagnosis and mefloquine-artesunate treatment of falciparum malaria in Thailand: the Tak Malaria Initiative**. *PLoS Med*. 2006; **3**(6): e183.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Landier J, Parker DM, Thu AM, *et al.*: **The role of early detection and treatment in malaria elimination**. *Malar J*. *BioMed Central*; 2016; **15**: 363.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Imwong M, Stepniewska K, Tripura R, *et al.*: **Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria**. *J Infect Dis*. 2016; **213**(8): 1322–9.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Imwong M, Nguyen TN, Tripura R, *et al.*: **The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand-Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam**. *Malar J*. *BioMed Central*; 2015; **14**: 381.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- von Seidlein L, Dondorp A: **Fighting fire with fire: mass antimalarial drug administrations in an era of antimalarial resistance**. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015; **13**(6): 715–30.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Lwin KM, Imwong M, Suangkanarat P, *et al.*: **Elimination of *Plasmodium falciparum* in an area of multi-drug resistance**. *Malar J*. *BioMed Central*; 2015; **14**: 319.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Cook J, Xu W, Msellem M, *et al.*: **Mass screening and treatment on the basis of results of a *Plasmodium falciparum*-specific rapid diagnostic test did not reduce malaria incidence in Zanzibar**. *J Infect Dis*. 2015; **211**(9): 1476–83.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)

13. Newby G, Hwang J, Koita K, *et al.*: **Review of mass drug administration for malaria and its operational challenges.** *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 93(1): 125–134.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
14. Dicko A, Brown JM, Diawara H, *et al.*: **Primaquine to reduce transmission of *Plasmodium falciparum* malaria in Mali: a single-blind, dose-ranging, adaptive randomised phase 2 trial.** *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(6): 674–84.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
15. Eisele TP, Bennett A, Silumbe K, *et al.*: **Short-term Impact of Mass Drug Administration With Dihydroartemisinin Plus Piperaquine on Malaria in Southern Province Zambia: A Cluster-Randomized Controlled Trial.** *J Infect Dis.* 2016; 214(12): 1831–1839.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
16. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, *et al.*: **Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: A longitudinal study.** *Lancet.* Elsevier Ltd; 2012; 379(9830): 1960–1966.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
17. Carrara VI, Lwin KM, Phyo AP, *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(3): e1001398.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
18. Cheah PY, Lwin KM, Phaiphun L, *et al.*: **Community engagement on the Thai-Burmese border: rationale, experience and lessons learnt.** *Int Health.* 2010; 2(2): 123–9.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
19. Kajeewiwa L, Thwin MM, Nosten S, *et al.*: **Community engagement for the rapid elimination of malaria: the case of Kayin State, Myanmar [version 1; referees: 1 approved].** *Wellcome Open Res.* 2017; 2: 59.  
[Publisher Full Text](#)
20. Kajeewiwa L, Thwin MM, Shee PW, *et al.*: **The acceptability of mass administrations of anti-malarial drugs as part of targeted malaria elimination in villages along the Thai-Myanmar border.** *Malar J.* 2016; 15(1): 494.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
21. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, *et al.*: **High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias.** *J Clin Microbiol.* 2014; 52(9): 3303–9.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
22. Amato R, Lim P, Miotto O, *et al.*: **Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study.** *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(2): 164–173.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
23. Kwansomboon N, Chaumeau V, Kittiphanakun P, *et al.*: **Vector bionomics and malaria transmission along the Thailand-Myanmar border: a baseline entomological survey.** *J Vector Ecol.* 2017; 42(1): 84–93.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
24. Ya-umphan P, Cerqueria D, Parker DM, *et al.*: **Use of an Anopheles Salivary Biomarker to Assess Malaria Transmission Risk Along the Thailand-Myanmar Border.** *J Infect Dis.* 2017; 215(3): 396–404.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
25. Chaumeau V, Andolina C, Fustec B, *et al.*: **Comparison of the Performances of Five Primer Sets for the Detection and Quantification of *Plasmodium* in Anopheline Vectors by Real-Time PCR.** *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159160.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
26. Bancone G, Chowwiwat N, Somsakhaicharoen R, *et al.*: **Single Low Dose Primaquine (0.25 mg/kg) Does Not Cause Clinically Significant Haemolysis in G6PD Deficient Subjects.** *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151898.  
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)

## IX. CONCLUSION

---

En conclusion, notre étude a permis de démontrer l'efficacité du traitement de masse (TdM) pour interrompre rapidement le cycle de transmission de *Plasmodium falciparum* et donc son intérêt majeur dans le cadre de l'élimination. En effet, le principal déterminant de l'intensité de la transmission (mesurée par le taux d'inoculation entomologique) dans les villages *hotspots* est la prévalence de l'infection asymptomatique, généralement sous-microscopique dans cette zone de faible endémicité. Lorsque le réservoir sous-microscopique est éliminé par le TdM, le taux d'inoculation entomologique est divisé par un facteur quatre. La dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission dans le contexte du TdM est différente pour *P. falciparum* et *P. vivax*. Pour *P. falciparum*, le TdM a été associé à une diminution rapide de l'endémicité palustre, maintenue dans le temps par l'accès au diagnostic et au traitement précoce des cas symptomatiques incidents dispensé au poste palu. Pour *P. vivax*, l'effet du TdM est transitoire et s'estompe à mesure que la concentration sanguine de pipéraquline diminue (elle devient non significative un mois après la dernière prise du traitement). Ce résultat attendu est probablement lié au phénomène des rechutes car les hypnozoïtes (stade quiescents hépatiques) ne sont pas éliminés par le protocole thérapeutique utilisé pour le TdM. A long terme, l'effet sélectif du TdM sur l'intensité de la transmission de *P. falciparum* est reflété par l'évolution du rapport *P. falciparum* / *P. vivax* dans la population anophélienne : celui-ci est passé de 0.62 à 0.07 avant et après le TdM respectivement. Plusieurs facteurs ont été identifiés pour expliquer l'impact de l'intervention : la répétition du TdM trois fois à un mois d'intervalle, l'effet prophylactique post-traitement de la pipéraquline, la faible dose de primaquine, le taux de couverture du TdM et l'accès universel au diagnostic et au traitement précoce après l'intervention (poste palu). L'engagement communautaire est de ce fait un élément indispensable à la réussite du programme, il permet d'obtenir un taux de couverture suffisant pour le TdM et d'inciter les villageois à continuer de consulter au poste palu en cas de fièvre après l'intervention. Il est important de noter que le TdM n'a pas été associé à une aggravation des résistances médicamenteuses, qui sont restées stables au cours de l'étude. Ce travail a également permis de mieux caractériser les systèmes vectoriels en présence le long de la frontière, et pour lesquels il n'existait pas de données du côté birman de la frontière. Nous confirmons la

complexité des systèmes vectoriels en présence et l'importance de la transmission résiduelle dans la zone. En effet, la biodiversité de l'entomo-faune anophélienne est très élevée. Les vecteurs du paludisme sont multiples et ont des caractéristiques biologiques et écologiques différentes et complémentaires. Globalement, les vecteurs sont actifs tôt dans la soirée et/ou tard dans la matinée et sont préférentiellement exophages. Par conséquent, seulement 35% des piqûres infectantes sont potentiellement prévenues par les moustiquaires. Le caractère opportuniste des vecteurs en présence, qui peuvent piquer indifféremment l'homme ou le bétail en fonction de la disponibilité de l'hôte, est un élément supplémentaire pour expliquer l'absence d'effet des moustiquaires sur la dynamique des populations anophéliennes. De plus, des résistances aux insecticides (en particulier aux pyréthroïdes) ont été détectées chez plusieurs espèces d'anophèles, y compris certains vecteurs du paludisme. Elles constituent un obstacle supplémentaire à la lutte anti-vectorielle. Plusieurs perspectives et pistes de recherche ont été identifiées pour la suite du programme d'élimination. Tout d'abord, la mise en place d'une surveillance entomologique à grande échelle sera importante pour documenter l'élimination et apporter la preuve de l'absence de transmission localement. Ensuite, plus d'études sont nécessaires pour évaluer des stratégies de lutte anti-vectorielle complémentaires aux outils actuels (moustiquaires et pulvérisation intra-domiciliaire) et prévenir la transmission résiduelle. Concernant les résistances aux insecticides, il faudra produire plus de données sur la sensibilité des populations sauvages d'anophèles (en particulier à des classes d'insecticides autres que les pyréthroïdes), mieux décrire et comprendre les sources d'émergence et de sélection des résistances (agriculture vs lutte anti-vectorielle) et enfin étudier les mécanismes génétiques impliqués dans la résistance. Enfin, l'apport de l'entomologie est un prérequis indispensable à l'élimination de *P. vivax*, tant sur le plan fondamental (découverte de nouvelles molécules actives contre les hypnozoïtes) qu'appliqué (évaluation de l'apport de la lutte anti-vectorielle en complément des approches médicamenteuses).

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abbott, W. S. (1987) 'A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925', *J Am Mosq Control Assoc*, 3(2), pp. 302-3.
- Achee, N. L., Bangs, M. J., Farlow, R., Killeen, G. F., Lindsay, S., Logan, J. G., Moore, S. J., Rowland, M., Sweeney, K., Torr, S. J., Zwiebel, L. J. and Grieco, J. P. (2012) 'Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation', *Malar J*, 11, pp. 164.
- Adekunle, A. I., Pinkevych, M., McGready, R., Luxemburger, C., White, L. J., Nosten, F., Cromer, D. and Davenport, M. P. (2015) 'Modeling the dynamics of Plasmodium vivax infection and hypnozoite reactivation in vivo', *PLoS Negl Trop Dis*, 9(3), pp. e0003595.
- Agossa, F. R., Aikpon, R., Azondekon, R., Govoetchan, R., Padonnou, G. G., Oussou, O., Oke-Agbo, F. and Akogbeto, M. C. (2014) 'Efficacy of various insecticides recommended for indoor residual spraying: pirimiphos methyl, potential alternative to bendiocarb for pyrethroid resistance management in Benin, West Africa', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 108(2), pp. 84-91.
- Akim, N. I., Drakeley, C., Kingo, T., Simon, B., Senkoro, K. and Sauerwein, R. W. (2000) 'Dynamics of P. falciparum gametocytemia in symptomatic patients in an area of intense perennial transmission in Tanzania', *Am J Trop Med Hyg*, 63(3-4), pp. 199-203.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) 'Basic local alignment search tool', *J Mol Biol*, 215(3), pp. 403-10.
- Alves, F. P., Gil, L. H., Marrelli, M. T., Ribolla, P. E., Camargo, E. P. and Da Silva, L. H. (2005) 'Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon', *J Med Entomol*, 42(5), pp. 777-9.
- Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Mao, S., Sopha, C., Sam, B., Dek, D., Try, V., Amato, R., Blessborn, D., Song, L., Tullo, G. S., Fay, M. P., Anderson, J. M., Tarning, J. and Fairhurst, R. M. (2016) 'Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study', *Lancet Infect Dis*, 16(3), pp. 357-65.
- Amato, R., Lim, P., Miotto, O., Amaratunga, C., Dek, D., Pearson, R. D., Almagro-Garcia, J., Neal, A. T., Sreng, S., Suon, S., Drury, E., Jyothi, D., Stalker, J., Kwiatkowski, D. P. and Fairhurst, R. M. (2017) 'Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study', *Lancet Infect Dis*, 17(2), pp. 164-173.
- Anderson, T. J., Haubold, B., Williams, J. T., Estrada-Franco, J. G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I. D., Brockman, A. H., Nosten, F., Ferreira, M. U. and Day, K. P. (2000) 'Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite Plasmodium falciparum', *Mol Biol Evol*, 17(10), pp. 1467-82.
- Andruff, H., Carraro, N., Thompson, A., Gaudreau, P. and Louvet, B. (2009) 'Latent Class Growth Modelling: A Tutorial', *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology*, 5(1), pp. 11-24.
- Ansell, J., Hamilton, K. A., Pinder, M., Walraven, G. E. and Lindsay, S. W. (2002) 'Short-range attractiveness of pregnant women to Anopheles gambiae mosquitoes', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(2), pp. 113-6.
- Anstey, N. M., Russell, B., Yeo, T. W. and Price, R. N. (2009) 'The pathophysiology of vivax malaria', *Trends Parasitol*, 25(5), pp. 220-7.
- Apfalter, P., Reischl, U. and Hammerschlag, M. R. (2005) 'In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results?', *J Clin Microbiol*, 43(12), pp. 5835-41.

- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chhor, C. M., Bout, D. M., Menard, S., Rogers, W. O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J. C., Fairhurst, R. M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O. and Menard, D. (2014) 'A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria', *Nature*, 505(7481), pp. 50-5.
- Artzy-Randrup, Y., Alonso, D. and Pascual, M. (2010) 'Transmission intensity and drug resistance in malaria population dynamics: implications for climate change', *PLoS One*, 5(10), pp. e13588.
- Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J. M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chhor, C. M., Nguon, C., Sovannaroeth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., Runchaoren, R., Hien, T. T., Thuy-Nhien, N. T., Thanh, N. V., Phu, N. H., Htut, Y., Han, K. T., Aye, K. H., Mokuolu, O. A., Olaosebikan, R. R., Folaranmi, O. O., Mayxay, M., Khanthavong, M., Hongvanthong, B., Newton, P. N., Onyamboko, M. A., Fanello, C. I., Tshefu, A. K., Mishra, N., Valecha, N., Phyo, A. P., Nosten, F., Yi, P., Tripura, R., Borrmann, S., Bashraheil, M., Peshu, J., Faiz, M. A., Ghose, A., Hossain, M. A., Samad, R., Rahman, M. R., Hasan, M. M., Islam, A., Miotto, O., Amato, R., MacInnis, B., Stalker, J., Kwiatkowski, D. P., Bozdech, Z., Jeeyapant, A., Cheah, P. Y., Sakulthaew, T., Chalk, J., Intharabut, B., Silamut, K., Lee, S. J., Vihokhern, B., Kunasol, C., Imwong, M., Tarning, J., Taylor, W. J., Yeung, S., Woodrow, C. J., Flegg, J. A., Das, D., Smith, J., Venkatesan, M., Plowe, C. V., Stepniewska, K., Guerin, P. J., Dondorp, A. M., Day, N. P. and White, N. J. (2014) 'Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria', *N Engl J Med*, 371(5), pp. 411-23.
- Ashley, E. A. and White, N. J. (2014) 'The duration of *Plasmodium falciparum* infections', *Malar J*, 13, pp. 500.
- Asidi, A., N'Guessan, R., Akogbeto, M., Curtis, C. and Rowland, M. (2012) 'Loss of household protection from use of insecticide-treated nets against pyrethroid-resistant mosquitoes, benin', *Emerg Infect Dis*, 18(7), pp. 1101-6.
- Awab, G. R., Pukrittayakamee, S., Imwong, M., Dondorp, A. M., Woodrow, C. J., Lee, S. J., Day, N. P., Singhasivanon, P., White, N. J. and Kaker, F. (2010) 'Dihydroartemisinin-piperaquine versus chloroquine to treat vivax malaria in Afghanistan: an open randomized, non-inferiority, trial', *Malar J*, 9, pp. 105.
- Ayala, F. J. and Coluzzi, M. (2005) 'Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 Suppl 1, pp. 6535-42.
- Baird, J. K. and Hoffman, S. L. (2004) 'Primaquine therapy for malaria', *Clin Infect Dis*, 39(9), pp. 1336-45.
- Baker, E. Z., Beier, J. C., Meek, S. R. and Wirtz, R. A. (1987) 'Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections in Thai-Kampuchean *Anopheles* (Diptera: Culicidae) by enzyme-linked immunosorbent assay', *J Med Entomol*, 24(5), pp. 536-41.
- Bancone, G., Chowwiwat, N., Somsakchaichaoen, R., Poodpanya, L., Moo, P. K., Gornsawun, G., Kajeewiwa, L., Thwin, M. M., Rakthinthong, S., Nosten, S., Thinraow, S., Nyo, S. N., Ling, C. L., Wiladphaingern, J., Kirichaoen, N. L., Moore, K. A., White, N. J. and Nosten, F. (2016) 'Single Low Dose Primaquine (0.25mg/kg) Does Not Cause Clinically Significant Haemolysis in G6PD Deficient Subjects', *PLoS One*, 11(3), pp. e0151898.
- Bancone, G., Chu, C. S., Somsakchaichaoen, R., Chowwiwat, N., Parker, D. M., Charunwatthana, P., White, N. J. and Nosten, F. H. (2014) 'Characterization of G6PD genotypes and phenotypes on the northwestern Thailand-Myanmar border', *PLoS One*, 9(12), pp. e116063.
- Banks, S. D., Murray, N., Wilder-Smith, A. and Logan, J. G. (2014) 'Insecticide-treated clothes for the control of vector-borne diseases: a review on effectiveness and safety', *Med Vet Entomol*, 28 Suppl 1, pp. 14-25.
- Barcus, M. J., Basri, H., Picarima, H., Manyakori, C., Sekartuti, Elyazar, I., Bangs, M. J., Maguire, J. D. and Baird, J. K. (2007) 'Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria

- among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua', *Am J Trop Med Hyg*, 77(5), pp. 984-91.
- Barnes, K. I., Durrheim, D. N., Little, F., Jackson, A., Mehta, U., Allen, E., Dlamini, S. S., Tsoka, J., Bredenkamp, B., Mthembu, D. J., White, N. J. and Sharp, B. L. (2005) 'Effect of artemether-lumefantrine policy and improved vector control on malaria burden in KwaZulu-Natal, South Africa', *PLoS Med*, 2(11), pp. e330.
- Barnes, K. I. and White, N. J. (2005) 'Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*', *Acta Trop*, 94(3), pp. 230-40.
- Bastien, P., Procop, G. W. and Reischl, U. (2008) 'Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR', *J Clin Microbiol*, 46(6), pp. 1897-900.
- Beebe, N. W. and Saul, A. (1995) 'Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis', *Am J Trop Med Hyg*, 53(5), pp. 478-81.
- Beg, M. A., Sani, N., Mehraj, V., Jafri, W., Khan, M. A., Malik, A., Menezes, E., Hussain, R. and Smego, R., Jr. (2008) 'Comparative features and outcomes of malaria at a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan', *Int J Infect Dis*, 12(1), pp. 37-42.
- Beier, J. C., Muller, G. C., Gu, W., Arheart, K. L. and Schlein, Y. (2012) 'Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of *Anopheles malaria* vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms', *Malar J*, 11, pp. 31.
- Beier, J. C., Onyango, F. K., Ramadhan, M., Koros, J. K., Asiago, C. M., Wirtz, R. A., Koech, D. K. and Roberts, C. R. (1991) 'Quantitation of malaria sporozoites in the salivary glands of wild Afrotropical *Anopheles*', *Med Vet Entomol*, 5(1), pp. 63-70.
- Beier, J. C., Perkins, P. V., Wirtz, R. A., Whitmire, R. E., Mugambi, M. and Hockmeyer, W. T. (1987) 'Field evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Plasmodium falciparum* sporozoite detection in anopheline mosquitoes from Kenya', *Am J Trop Med Hyg*, 36(3), pp. 459-68.
- Bjorkman, A. and Phillips-Howard, P. A. (1990) 'The epidemiology of drug-resistant malaria', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(2), pp. 177-80.
- Bockarie, M. J. and Dagoro, H. (2006) 'Are insecticide-treated bednets more protective against *Plasmodium falciparum* than *Plasmodium vivax*-infected mosquitoes?', *Malar J*, 5, pp. 15.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. and White, J. S. (2009) 'Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution', *Trends Ecol Evol*, 24(3), pp. 127-35.
- Boreham, P. F. and Garrett-Jones, C. (1973) 'Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Favre)', *Bull World Health Organ*, 48(5), pp. 605-14.
- Boreham, P. F., Lenahan, J. K., Boulzaguet, R., Storey, J., Ashkar, T. S., Nambiar, R. and Matsushima, T. (1979) 'Studies on multiple feeding by *Anopheles gambiae* s.l. in a Sudan savanna area of north Nigeria', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 73(4), pp. 418-23.
- Bourgeois, N., Boutet, A., Bousquet, P. J., Basset, D., Douard-Enault, C., Charachon, S. and Lachaud, L. (2010) 'Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in *Plasmodium* sp. infection', *Clin Microbiol Infect*, 16(8), pp. 1305-11.
- Bousema, T., Kreuels, B. and Gosling, R. (2011) 'Adjusting for heterogeneity of malaria transmission in longitudinal studies', *J Infect Dis*, 204(1), pp. 1-3.
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I. and Drakeley, C. (2014) 'Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance', *Nat Rev Microbiol*, 12(12), pp. 833-40.
- Boussari, O., Moiroux, N., Iwaz, J., Djenontin, A., Bio-Bangana, S., Corbel, V., Fonton, N. and Ecochard, R. (2012) 'Use of a mixture statistical model in studying malaria vectors density', *PLoS One*, 7(11), pp. e50452.
- Boussari, O., Subtil, F., Moiroux, N., Djenontin, A., Iwaz, J., Corbel, V., Fonton, N., Garcia, A., Etard, J. F. and Ecochard, R. (2014) 'Modeling the seasonality of *Anopheles gambiae* s.s. biting rates in a South Benin sanitary zone', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 108(4), pp. 237-43.

- Boyd, M. (1949) *Malariaology*. Philadelphia: Saunders.
- Boyd, M. F. and Kitchen, S. F. (1936) 'The Comparative Susceptibility of *Anopheles Quadrimaculatus*, Say, and *Anopheles Punctipennis*, Say, to *Plasmodium Vivax*, Grassi and Feletti, and *Plasmodium Falciparum*, Welch', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-16(1), pp. 67-71
- Boyd, M. F. and Kitchen, S. F. (1937) 'On the Infectiousness of Patients Infected with *Plasmodium Vivax* and *Plasmodium Falciparum*', *Am J Trop Med Hyg*, S1-17(2), pp. 253-262.
- Bretscher, M. T., Griffin, J. T., Hugo, P., Baker, M., Ghani, A., Okell, L. and Group, T. A.-A. P.-T. P. S. (2014) 'A comparison of the duration of post-treatment protection of artemether-lumefantrine, dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine for the treatment of uncomplicated malaria.', *Malaria Journal*, 13(Suppl1), pp. 1.
- Brockman, A., Price, R. N., van Vugt, M., Heppner, D. G., Walsh, D., Sookto, P., Wimonwattawatee, T., Looareesuwan, S., White, N. J. and Nosten, F. (2000) 'Plasmodium falciparum antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(5), pp. 537-44.
- Brosseau, L., Drame, P. M., Besnard, P., Toto, J. C., Foumane, V., Le Mire, J., Mouchet, F., Remoue, F., Allan, R., Fortes, F., Carnevale, P. and Manguin, S. (2012) 'Human antibody response to *Anopheles saliva* for comparing the efficacy of three malaria vector control methods in Balombo, Angola', *PLoS One*, 7(9), pp. e44189.
- Bruce, M. C., Donnelly, C. A., Packer, M., Lagog, M., Gibson, N., Narara, A., Walliker, D., Alpers, M. P. and Day, K. P. (2000a) 'Age- and species-specific duration of infection in asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea', *Parasitology*, 121 ( Pt 3), pp. 247-56.
- Bruce, M. C., Galinski, M. R., Barnwell, J. W., Donnelly, C. A., Walmsley, M., Alpers, M. P., Walliker, D. and Day, K. P. (2000b) 'Genetic diversity and dynamics of plasmodium falciparum and P. vivax populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea', *Parasitology*, 121 ( Pt 3), pp. 257-72.
- Bruce-Chwatt, L. J. (1959) 'Malaria research and eradication in the USSR. A review of Soviet achievements in the field of malariology', *Bull World Health Organ*, 21, pp. 737-72.
- Buckling, A. and Read, A. F. (2001) 'The effect of partial host immunity on the transmission of malaria parasites', *Proc Biol Sci*, 268(1483), pp. 2325-30.
- Burkot, T. R., Graves, P. M., Cattan, J. A., Wirtz, R. A. and Gibson, F. D. (1987) 'The efficiency of sporozoite transmission in the human malarial, Plasmodium falciparum and P. vivax', *Bull World Health Organ*, 65(3), pp. 375-80.
- Burkot, T. R., Zavala, F., Gwadz, R. W., Collins, F. H., Nussenzweig, R. S. and Roberts, D. R. (1984) 'Identification of malaria-infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay', *Am J Trop Med Hyg*, 33(2), pp. 227-31.
- Burton, P., Gurrin, L. and Sly, P. (1998) 'Extending the simple linear regression model to account for correlated responses: an introduction to generalized estimating equations and multi-level mixed modelling', *Stat Med*, 17(11), pp. 1261-91.
- Bustin, S. A. (2010) 'Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE', *Methods*, 50(4), pp. 217-26.
- Cappellini, M. D. and Fiorelli, G. (2008) 'Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency', *Lancet*, 371(9606), pp. 64-74.
- Carrara, V. I., Lwin, K. M., Phyo, A. P., Ashley, E., Wiladphaingern, J., Sriprawat, K., Rijken, M., Boel, M., McGready, R., Proux, S., Chu, C., Singhasivanon, P., White, N. and Nosten, F. (2013) 'Malaria burden and artemisinin resistance in the mobile and migrant population on the Thai-Myanmar border, 1999-2011: an observational study', *PLoS Med*, 10(3), pp. e1001398.
- Carrara, V. I., Sirilak, S., Thonglairuam, J., Rojanawatsirivet, C., Proux, S., Gilbos, V., Brockman, A., Ashley, E. A., McGready, R., Krudsood, S., Leemingsawat, S., Looareesuwan, S., Singhasivanon, P., White, N. and Nosten, F. (2006) 'Deployment of early diagnosis and mefloquine-artesunate

- treatment of falciparum malaria in Thailand: the Tak Malaria Initiative', *PLoS Med*, 3(6), pp. e183.
- Carrara, V. I., Zwang, J., Ashley, E. A., Price, R. N., Stepniewska, K., Barends, M., Brockman, A., Anderson, T., McGready, R., Phaiphun, L., Proux, S., van Vugt, M., Hutagalung, R., Lwin, K. M., Phyto, A. P., Preechapornkul, P., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Singhasivanon, P., White, N. J. and Nosten, F. (2009) 'Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment', *PLoS One*, 4(2), pp. e4551.
- Carter, R. and Mendis, K. N. (2002) 'Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria', *Clin Microbiol Rev*, 15(4), pp. 564-94.
- Chaccour, C. and Killeen, G. F. (2016) 'Mind the gap: residual malaria transmission, veterinary endectocides and livestock as targets for malaria vector control', *Malaria Journal*, 15(1), pp. 24.
- Chanda, E., Remijo, C. D., Pasquale, H., Baba, S. P. and Lako, R. L. (2014) 'Scale-up of a programme for malaria vector control using long-lasting insecticide-treated nets: lessons from South Sudan', *Bull World Health Organ*, 92(4), pp. 290-6.
- Chareonviriyaphap, T., Aum-aung, B. and Ratanatham, S. (1999) 'Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 30(1), pp. 184-94.
- Chareonviriyaphap, T., Bangs, M. J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V. and Ngoen-Klan, R. (2013) 'Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand', *Parasit Vectors*, 6, pp. 280.
- Charlwood, J. D., Nenhep, S., Protopopoff, N., Sovannaroeth, S., Morgan, J. C. and Hemingway, J. (2016) 'Effects of the spatial repellent metofluthrin on landing rates of outdoor biting anophelines in Cambodia, Southeast Asia', *Med Vet Entomol*, 30(2), pp. 229-34.
- Charlwood, J. D., Smith, T., Kihonda, J., Heiz, B., Billingsley, P. F., Takken, W. i. a.-l. H. a. a. i. c. i. o.-d. s. t.-a. c. s. b.-s. b.-b., Opx, m., 23px, p. p. p. p., Opx, b., italic, f.-s., normal, f.-v.-l., normal, f.-v.-c., inherit, f.-v.-n., normal, f.-w., inherit, f.-s., 16px, l.-h., font-family: "Noto Sans", H., Roboto, Arial, sans-serif, 13px, f.-s., baseline, v.-a., pointer, c., auto, w., 17px, h., inline-block, d., url("../images/btn\_close\_small.svg"), b.-i., 1px, b.-p. p., no-repeat, b.-r., color: rgb(89, 89), normal, l.-s., 2, o., left, t.-a., Opx, t.-i., none, t.-t., normal, w.-s., 2, w., Opx, w.-s., Opx, -. w.-t.-s.-w., background-color: rgb(255, 255) and "> (1995) '**Density independent feeding success of malaria vectors (Diptera: Culicidae) in Tanzania**', *Bulletin of entomological research*, 85(1), pp. 29-35.
- Chaumeau, V., Andolina, C., Fustec, B., Tuikue Ndam, N., Brengues, C., Herder, S., Cerqueira, D., Chareonviriyaphap, T., Nosten, F. and Corbel, V. (2016) 'Comparison of the Performances of Five Primer Sets for the Detection and Quantification of Plasmodium in Anopheline Vectors by Real-Time PCR', *PLoS One*, 11(7), pp. e0159160.
- Chen, J. M., Cooper, D. N., Chuzhanova, N., Ferec, C. and Patrinos, G. P. (2007) 'Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease', *Nat Rev Genet*, 8(10), pp. 762-75.
- Churcher, T. S., Lissenden, N., Griffin, J. T., Worrall, E. and Ranson, H. (2016) 'The impact of pyrethroid resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa', *Elife*, 5.
- Churcher, T. S., Trape, J. F. and Cohuet, A. (2015) 'Human-to-mosquito transmission efficiency increases as malaria is controlled', *Nat Commun*, 6, pp. 6054.
- Ciceron, L., Jaureguiberry, G., Gay, F. and Danis, M. (1999) 'Development of a Plasmodium PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment', *J Clin Microbiol*, 37(1), pp. 35-8.
- Cohuet, A., Harris, C., Robert, V. and Fontenille, D. (2010) 'Evolutionary forces on Anopheles: what makes a malaria vector?', *Trends Parasitol*, 26(3), pp. 130-6.
- Coleman, R. E., Kumpitak, C., Ponlawat, A., Maneechai, N., Phunkitchar, V., Rachapaew, N., Zollner, G. and Sattabongkot, J. (2004) 'Infectivity of asymptomatic Plasmodium-infected human

- populations to *Anopheles dirus* mosquitoes in western Thailand', *J Med Entomol*, 41(2), pp. 201-8.
- Collins, F. H., Zavala, F., Graves, P. M., Cochrane, A. H., Gwadz, R. W., Akoh, J. and Nussenzweig, R. S. (1984) 'First field trial of an immunoradiometric assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes', *Am J Trop Med Hyg*, 33(4), pp. 538-43.
- Collins, W. E., Sullivan, J. S., Nace, D., Williams, T., Sullivan, J. J., Galland, G. G., Grady, K. K. and Bounngaseng, A. (2002) 'Experimental infection of *Anopheles farauti* with different species of *Plasmodium*', *J Parasitol*, 88(2), pp. 295-8.
- Corbel, V., Akogbeto, M., Damien, G. B., Djenontin, A., Chandre, F., Rogier, C., Moiroux, N., Chabi, J., Banganna, B., Padonou, G. G. and Henry, M. C. (2012) 'Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial', *Lancet Infect Dis*, 12(8), pp. 617-26.
- Corbel, V., Darriet, F., Chandre, F. and Hougaard, J. M. (2002) 'Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors', *Parasite*, 9(3), pp. 255-9.
- Corbel, V., Nosten, F., Thanispong, K., Luxemburger, C., Kongmee, M. and Chareonviriyaphap, T. (2013) 'Challenges and prospects for dengue and malaria control in Thailand, Southeast Asia', *Trends Parasitol*, 29(12), pp. 623-33.
- Corbel, V. and N'Guessan, R. (2013) 'Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review', in Manguin, S. (ed.) *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*: InTech.
- Cornelie, S., Remoue, F., Doucoure, S., Ndiaye, T., Sauvage, F. X., Boulanger, D. and Simondon, F. (2007) 'An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children', *Malar J*, 6, pp. 75.
- Costantini, C., Badolo, A. and Ilboudo-Sanogo, E. (2004) 'Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(11), pp. 644-52.
- Cunha, M. G., Medina, T. S., Oliveira, S. G., Marinho, A. N., Pova, M. M. and Ribeiro-dos-Santos, A. K. (2009) 'Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*', *Acta Trop*, 111(1), pp. 35-8.
- Curtis, C. F., Maxwell, C. A., Magesa, S. M., Rwegoshora, R. T. and Wilkes, T. J. (2006) 'Insecticide-treated bed-nets for malaria mosquito control', *J Am Mosq Control Assoc*, 22(3), pp. 501-6.
- Curtis, C. F., Miller, J. E., Hodjati, M. H., Kolaczinski, J. H. and Kasumba, I. (1998) 'Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bednets against malaria vectors?', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353(1376), pp. 1769-75.
- Curtis, C. F. and Mnzava, A. E. (2000) 'Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control', *Bull World Health Organ*, 78(12), pp. 1389-400.
- Davey, T. H. and Gordon, R. M. (1932) 'The Estimation of the Density of Infective Anophelines as a Method of Calculating the Relative Risk of Inoculation with Malaria from Different Species or in Different Localities', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 27(1), pp. 27-52.
- Dawes, E. J., Churcher, T. S., Zhuang, S., Sinden, R. E. and Basáñez, M. G. (2009) 'Anopheles mortality is both age- and *Plasmodium*-density dependent: implications for malaria transmission', *Malar J*, 8, pp. 228.
- de Meillon, B., Grab, B. and Sebastian, A. (1967) 'Evaluation of *Wuchereria bancrofti* infection in *Culex pipiens fatigans* in Rangoon, Burma\*', *Bull World Health Organ*, 36(1), pp. 91-100.
- Decludt, B., Pecoul, B., Biberson, P., Lang, R. and Imivithaya, S. (1991) 'Malaria surveillance among the displaced Karen population in Thailand April 1984 to February 1989, Mae Sot, Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 22(4), pp. 504-8.
- Detinova, T. S. (1962) 'Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria', *Monogr Ser World Health Organ*, 47, pp. 13-191.

- Dicko, A., Brown, J. M., Diawara, H., Baber, I., Mahamar, A., Soumare, H. M., Sanogo, K., Koita, F., Keita, S., Traore, S. F., Chen, I., Poirot, E., Hwang, J., McCulloch, C., Lanke, K., Pett, H., Niemi, M., Nosten, F., Bousema, T. and Gosling, R. (2016) 'Primaquine to reduce transmission of Plasmodium falciparum malaria in Mali: a single-blind, dose-ranging, adaptive randomised phase 2 trial', *Lancet Infect Dis*, 16(6), pp. 674-84.
- Dieme, C., Yssouf, A., Vega-Rua, A., Berenger, J. M., Failloux, A. B., Raoult, D., Parola, P. and Almeras, L. (2014) 'Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling', *Parasit Vectors*, 7, pp. 544.
- Djenontin, A., Aimihoue, O., Sezonlin, M., Damien, G. B., Osse, R., Soukou, B., Padonou, G., Chandre, F. and Akogbeto, M. (2013) 'The residual life of bendiocarb on different substrates under laboratory and field conditions in Benin, Western Africa', *BMC Res Notes*, 6, pp. 458.
- Djenontin, A., Chandre, F., Dabire, K. R., Chabi, J., N'Guessan, R., Baldet, T., Akogbeto, M. and Corbel, V. (2010) 'Indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long-lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors', *Am J Trop Med Hyg*, 83(2), pp. 266-70.
- Dolan, G., ter Kuile, F. O., Jacoutot, V., White, N. J., Luxemburger, C., Malankirri, L., Chongsuphajaisiddhi, T. and Nosten, F. (1993) 'Bed nets for the prevention of malaria and anaemia in pregnancy', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87(6), pp. 620-6.
- Domingo, G. J., Satyagraha, A. W., Anvikar, A., Baird, K., Bancone, G., Bansil, P., Carter, N., Cheng, Q., Culpepper, J., Eziefula, C., Fukuda, M., Green, J., Hwang, J., Lacerda, M., McGray, S., Menard, D., Nosten, F., Nuchprayoon, I., Oo, N. N., Bualombai, P., Pumpradit, W., Qian, K., Recht, J., Roca, A., Satimai, W., Sovannaroeth, S., Vestergaard, L. S. and Von Seidlein, L. (2013) 'G6PD testing in support of treatment and elimination of malaria: recommendations for evaluation of G6PD tests', *Malar J*, 12, pp. 391.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N. P., Lindegardh, N., Socheat, D. and White, N. J. (2009) 'Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria', *N Engl J Med*, 361(5), pp. 455-67.
- Dondorp, A. M. and Ringwald, P. (2013) 'Artemisinin resistance is a clear and present danger', *Trends Parasitol*, 29(8), pp. 359-60.
- Donnelly, B., Berrang-Ford, L., Ross, N. A. and Michel, P. (2015) 'A systematic, realist review of zooprophylaxis for malaria control', *Malar J*, 14, pp. 313.
- Douglas, N. M., Anstey, N. M., Angus, B. J., Nosten, F. and Price, R. N. (2010) 'Artemisinin combination therapy for vivax malaria', *Lancet Infect Dis*, 10(6), pp. 405-16.
- Douglas, N. M., Pontororing, G. J., Lampah, D. A., Yeo, T. W., Kenangalem, E., Poespoprodjo, J. R., Ralph, A. P., Bangs, M. J., Sugiarto, P., Anstey, N. M. and Price, R. N. (2014) 'Mortality attributable to Plasmodium vivax malaria: a clinical audit from Papua, Indonesia', *BMC Med*, 12, pp. 217.
- Douglas, N. M., Simpson, J. A., Phyto, A. P., Siswantoro, H., Hasugian, A. R., Kenangalem, E., Poespoprodjo, J. R., Singhasivanon, P., Anstey, N. M., White, N. J., Tjitra, E., Nosten, F. and Price, R. N. (2013) 'Gametocyte dynamics and the role of drugs in reducing the transmission potential of Plasmodium vivax', *J Infect Dis*, 208(5), pp. 801-12.
- Drake, T. L., Kyaw, S. S., Kyaw, M. P., Smithuis, F. M., Day, N. P., White, L. J. and Lubell, Y. (2015) 'Cost effectiveness and resource allocation of Plasmodium falciparum malaria control in Myanmar: a modelling analysis of bed nets and community health workers', *Malar J*, 14, pp. 376.
- Drakeley, C., Schellenberg, D., Kihonda, J., Sousa, C. A., Arez, A. P., Lopes, D., Lines, J., Mshinda, H., Lengeler, C., Armstrong Schellenberg, J., Tanner, M. and Alonso, P. (2003) 'An estimation of the entomological inoculation rate for Ifakara: a semi-urban area in a region of intense malaria transmission in Tanzania', *Trop Med Int Health*, 8(9), pp. 767-74.
- Drakeley, C. J., Secka, I., Correa, S., Greenwood, B. M. and Targett, G. A. (1999) 'Host haematological factors influencing the transmission of Plasmodium falciparum gametocytes to Anopheles gambiae s.s. mosquitoes', *Trop Med Int Health*, 4(2), pp. 131-8.

- Drame, P. M., Diallo, A., Poinsignon, A., Boussari, O., Dos Santos, S., Machault, V., Lalou, R., Cornelie, S., LeHesran, J. Y. and Remoue, F. (2013) 'Evaluation of the effectiveness of malaria vector control measures in urban settings of Dakar by a specific anopheles salivary biomarker', *PLoS One*, 8(6), pp. e66354.
- Drame, P. M., Poinsignon, A., Besnard, P., Le Mire, J., Dos-Santos, M. A., Sow, C. S., Cornelie, S., Foumane, V., Toto, J. C., Sembene, M., Boulanger, D., Simondon, F., Fortes, F., Carnevale, P. and Remoue, F. (2010) 'Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immunological epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control', *Am J Trop Med Hyg*, 83(1), pp. 115-21.
- Durnez, L., Mao, S., Denis, L., Roelants, P., Sochantha, T. and Coosemans, M. (2013) 'Outdoor malaria transmission in forested villages of Cambodia', *Malar J*, 12, pp. 329.
- Durnez, L., Van Bortel, W., Denis, L., Roelants, P., Veracx, A., Trung, H. D., Sochantha, T. and Coosemans, M. (2011) 'False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination', *Malar J*, 10, pp. 195.
- Duru, V., Khim, N., Leang, R., Kim, S., Domergue, A., Kloeung, N., Ke, S., Chy, S., Eam, R., Khean, C., Loch, K., Ken, M., Lek, D., Beghain, J., Arieu, F., Guerin, P. J., Huy, R., Mercereau-Puijalon, O., Witkowski, B. and Menard, D. (2015) 'Plasmodium falciparum dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperaquine in vitro assays: retrospective and prospective investigations', *BMC Med*, 13, pp. 305.
- Dye, C. (1986) 'Vectorial capacity: must we measure all its components?', *Parasitol Today*, 2(8), pp. 203-9.
- Ebenezer, A., Noutcha, A. E. and Okiwelu, S. N. (2016) 'Relationship of annual entomological inoculation rates to malaria transmission indices, Bayelsa State, Nigeria', *J Vector Borne Dis*, 53(1), pp. 46-53.
- Eyles, D. E., Young, M. D. and Burgess, R. W. (1948) 'Studies on imported malarias; infectivity to *Anopheles quadrimaculatus* of asymptomatic *Plasmodium vivax* parasitemias', *J Natl Malar Soc*, 7(2), pp. 125-33.
- Fairley, N. H. (1947) 'Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 40(5), pp. 621-76.
- Farinaud, M. E., Choumara, R. and WHO Expert Committee on Malaria. (1950) *Le paludisme dans les populations montagnardes du Sud-Indochinois, suivi d' autres renseignements sur l' efficacité du DDT employé par la méthode rémanente contre Anopheles minimus*. Genève: Organisation mondiale de la Santé.
- Finney, D. (1971) *Probit analysis*. 3rd edition edn. New York: Cambridge University Press.
- Fontenille, D., Lochouarn, L., Diagne, N., Sokhna, C., Lemasson, J. J., Diatta, M., Konate, L., Faye, F., Rogier, C. and Trape, J. F. (1997) 'High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal', *Am J Trop Med Hyg*, 56(3), pp. 247-53.
- Franco, A. O., Gomes, M. G., Rowland, M., Coleman, P. G. and Davies, C. R. (2014) 'Controlling malaria using livestock-based interventions: a one health approach', *PLoS One*, 9(7), pp. e101699.
- Freitas-Junior, L. H., Bottius, E., Pirrit, L. A., Deitsch, K. W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellems, T. E. and Scherf, A. (2000) 'Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*', *Nature*, 407(6807), pp. 1018-22.
- Galappaththy, G. N., Omari, A. A. and Tharyan, P. (2007) 'Primaquine for preventing relapses in people with *Plasmodium vivax* malaria', *Cochrane Database Syst Rev*, (1), pp. Cd004389.
- Garnham, P. C. (1988) 'Swellengrebel lecture. Hypnozoites and 'relapses' in *Plasmodium vivax* and in vivax-like malaria', *Trop Geogr Med*, 40(3), pp. 187-95.
- Garnham, P. C. C. (1966) *Malaria parasites and other haemosporidia*. Philadelphia: Davis.

- Garrett-Jones, C. and Shidrawi, G. R. (1969) 'Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology', *Bull World Health Organ*, 40(4), pp. 531-45.
- Garros, C., Koekemoer, L. L., Coetzee, M., Coosemans, M. and Manguin, S. (2004) 'A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups', *Am J Trop Med Hyg*, 70(6), pp. 583-90.
- Garros, C., Van Bortel, W., Trung, H. D., Coosemans, M. and Manguin, S. (2006) 'Review of the Minimus Complex of *Anopheles*, main malaria vector in Southeast Asia: from taxonomic issues to vector control strategies', *Trop Med Int Health*, 11(1), pp. 102-14.
- Gaye, A., Bousema, T., Libasse, G., Ndiath, M. O., Konate, L., Jawara, M., Faye, O. and Sokhna, C. (2015) 'Infectiousness of the human population to *Anopheles arabiensis* by direct skin feeding in an area hypoendemic for malaria in Senegal', *Am J Trop Med Hyg*, 92(3), pp. 648-52.
- Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J. C., Alpers, M. P. and Muller, I. (2008) 'Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea', *PLoS Med*, 5(6), pp. e127.
- Gerardin, J., Eckhoff, P. and Wenger, E. A. (2015) 'Mass campaigns with antimalarial drugs: a modelling comparison of artemether-lumefantrine and DHA-piperaquine with and without primaquine as tools for malaria control and elimination', *BMC Infect Dis*, 15, pp. 144.
- Gimnig, J. E., Vulule, J. M., Lo, T. Q., Kamau, L., Kolczak, M. S., Phillips-Howard, P. A., Mathenge, E. M., ter Kuile, F. O., Nahlen, B. L., Hightower, A. W. and Hawley, W. A. (2003) 'Impact of permethrin-treated bed nets on entomologic indices in an area of intense year-round malaria transmission', *Am J Trop Med Hyg*, 68(4 Suppl), pp. 16-22.
- Gingrich, J. B., Weatherhead, A., Sattabongkot, J., Pilakasiri, C. and Wirtz, R. A. (1990) 'Hyperendemic malaria in a Thai village: dependence of year-round transmission on focal and seasonally circumscribed mosquito (Diptera: Culicidae) habitats', *J Med Entomol*, 27(6), pp. 1016-26.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. and Lopez, R. (2010) 'A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI', *Nucleic Acids Res*, 38(Web Server issue), pp. W695-9.
- Gould, D., Esah, S. and Pranith, U. (1967) 'Relation of *Anopheles aconitus* to malaria transmission in the central plain of Thailand. ', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, pp. 441-442.
- Govella, N. J., Maliti, D. F., Mlwale, A. T., Masallu, J. P., Mirzai, N., Johnson, P. C., Ferguson, H. M. and Killeen, G. F. (2016) 'An improved mosquito electrocuting trap that safely reproduces epidemiologically relevant metrics of mosquito human-feeding behaviours as determined by human landing catch', *Malar J*, 15, pp. 465.
- Green, C. A., Rattanarithikul, R., Pongparit, S., Sawadwongporn, P. and Baimai, V. (1991) 'A newly-recognized vector of human malarial parasites in the Oriental region, *Anopheles* (*Cellia*) *pseudowillmori* (Theobald, 1910)', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(1), pp. 35-6.
- Greenwood, B. (2004) 'The use of anti-malarial drugs to prevent malaria in the population of malaria-endemic areas', *Am J Trop Med Hyg*, 70(1), pp. 1-7.
- Grietens, K. P., Xuan, X. N., Ribera, J., Duc, T. N., Bortel, W., Ba, N. T., Van, K. P., Xuan, H. L., D'Alessandro, U. and Erhart, A. (2012) 'Social determinants of long lasting insecticidal hammock use among the Ra-glai ethnic minority in Vietnam: implications for forest malaria control', *PLoS One*, 7(1), pp. e29991.
- Gryseels, C., Peeters Grietens, K., Dierickx, S., Xuan, X. N., Uk, S., Bannister-Tyrrell, M., Trienekens, S., Ribera, J. M., Hausmann-Muela, S., Gerrets, R., D'Alessandro, U., Sochantha, T., Coosemans, M. and Erhart, A. (2015a) 'High Mobility and Low Use of Malaria Preventive Measures Among the Jarai Male Youth Along the Cambodia-Vietnam Border', *Am J Trop Med Hyg*, 93(4), pp. 810-8.
- Gryseels, C., Uk, S., Sluydts, V., Durnez, L., Phoeuk, P., Suon, S., Set, S., Heng, S., Siv, S., Gerrets, R., Tho, S., Coosemans, M. and Peeters Grietens, K. (2015b) 'Factors influencing the use of topical

- repellents: implications for the effectiveness of malaria elimination strategies', *Sci Rep*, 5, pp. 16847.
- Hall, R. (1998) *The plate tectonics of the Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea*. Leiden: Backhuys Publishers.
- Hamad, A. A., El Hassan, I. M., El Khalifa, A. A., Ahmed, G. I., Abdelrahim, S. A., Theander, T. G. and Arnot, D. E. (2000) 'Chronic Plasmodium falciparum infections in an area of low intensity malaria transmission in the Sudan', *Parasitology*, 120 ( Pt 5), pp. 447-56.
- Hanley, J. A., Negassa, A., Edwardes, M. D. and Forrester, J. E. (2003) 'Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation', *Am J Epidemiol*, 157(4), pp. 364-75.
- Harbach, R. E., Gingrich, J. B. and Pang, L. W. (1987) 'Some entomological observations on malaria transmission in a remote village in northwestern Thailand', *J Am Mosq Control Assoc*, 3(2), pp. 296-301.
- Harvey, S. A., Lam, Y., Martin, N. A. and Olortegui, M. P. (2017) 'Multiple entries and exits and other complex human patterns of insecticide-treated net use: a possible contributor to residual malaria transmission?', *Malar J*, 16(1), pp. 265.
- Hawkes, F., Manin, B. O., Ng, S. H., Torr, S. J., Drakeley, C., Chua, T. H. and Ferguson, H. M. (2017) 'Evaluation of electric nets as means to sample mosquito vectors host-seeking on humans and primates', *Parasit Vectors*, 10(1), pp. 338.
- Hay, S. I., Rogers, D. J., Toomer, J. F. and Snow, R. W. (2000) 'Annual Plasmodium falciparum entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, Internet access and review', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(2), pp. 113-27.
- Heaney, L. R. (1991) 'A synopsis of climatic and vegetational change in Southeast Asia.', *Climatic Change*, 19 pp. 53-61.
- Heng, S., Sluydts, V., Durnez, L., Mean, V., Polo, K., Tho, S., Coosemans, M. and van Griensven, J. (2017) 'Safety of a topical insect repellent (picaridin) during community mass use for malaria control in rural Cambodia', *PLoS One*, 12(3), pp. e0172566.
- Hii, J. L. (1984) 'Insecticide susceptibility studies of three cryptic species of the Anopheles balabacensis complex', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 15(1), pp. 104-11.
- Hinterberg, K., Mattei, D., Wellems, T. E. and Scherf, A. (1994) 'Interchromosomal exchange of a large subtelomeric segment in a Plasmodium falciparum cross', *Embo j*, 13(17), pp. 4174-80.
- Hiscox, A., Homan, T., Mwera, C. K., Maire, N., Di Pasquale, A., Masiga, D., Oria, P. A., Alaii, J., Leeuwis, C., Mukabana, W. R., Takken, W. and Smith, T. A. (2016) 'Mass mosquito trapping for malaria control in western Kenya: study protocol for a stepped wedge cluster-randomised trial', *Trials*, 17, pp. 356.
- Hofmann, N., Mwingira, F., Shekalaghe, S., Robinson, L. J., Mueller, I. and Felger, I. (2015) 'Ultra-sensitive detection of Plasmodium falciparum by amplification of multi-copy subtelomeric targets', *PLoS Med*, 12(3), pp. e1001788.
- Hoglund, R. M., Adam, I., Hanpithakpong, W., Ashton, M., Lindegardh, N., Day, N. P., White, N. J., Nosten, F. and Tarning, J. (2012) 'A population pharmacokinetic model of piperazine in pregnant and non-pregnant women with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Sudan', *Malar J*, 11, pp. 398.
- Hughes, A. C., Satasook, C., Bates, P. J. J., Bumrungsri, S. and G., J. (2011) 'Explaining the causes of the zoogeographic transition around the Isthmus of Kra: using bats as a case study.', *Journal of Biogeography* 38, pp. 2362-2372.
- Human Rights Documentation Unit (2004) *Human rights yearbook Burma 2003-04*. Available at: <http://www.ibiblio.org/obl/docs/HRDU2003-04/The%20Situation%20of%20Migrant%20Workers.htm>.
- Human Welfare Foundation (2010) *The Persecuted Minorities in Burma*. Available at: <http://www.helpwithoutfrontiers.org/about-us/mission/minorities> (Accessed: 03/08/2017).

- Imperato, P. J. (1986) 'Malaria parasitemia in healthy Africans in North Mara, Tanzania', *J Community Health*, 11(2), pp. 92-7.
- Imwong, M., Hanchana, S., Malleret, B., Renia, L., Day, N. P., Dondorp, A., Nosten, F., Snounou, G. and White, N. J. (2014) 'High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias', *J Clin Microbiol*, 52(9), pp. 3303-9.
- Imwong, M., Nakeesathit, S., Day, N. P. and White, N. J. (2011) 'A review of mixed malaria species infections in anopheline mosquitoes', *Malar J*, 10, pp. 253.
- Imwong, M., Nguyen, T. N., Tripura, R., Peto, T. J., Lee, S. J., Lwin, K. M., Suangkanarat, P., Jeeyapant, A., Vihokhern, B., Wongsanen, K., Van Hue, D., Dong le, T., Nguyen, T. U., Lubell, Y., von Seidlein, L., Dhorda, M., Promnarate, C., Snounou, G., Malleret, B., Renia, L., Keereecharoen, L., Singhasivanon, P., Sirithiranont, P., Chalk, J., Nguon, C., Hien, T. T., Day, N., White, N. J., Dondorp, A. and Nosten, F. (2015a) 'The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand-Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam', *Malar J*, 14, pp. 381.
- Imwong, M., Stepniewska, K., Tripura, R., Peto, T. J., Lwin, K. M., Vihokhern, B., Wongsanen, K., von Seidlein, L., Dhorda, M., Snounou, G., Keereecharoen, L., Singhasivanon, P., Sirithiranont, P., Chalk, J., Nguon, C., Day, N. P., Nosten, F., Dondorp, A. and White, N. J. (2015b) 'The numerical distributions of parasite densities in asymptomatic malaria', *J Infect Dis*.
- Imwong, M., Stepniewska, K., Tripura, R., Peto, T. J., Lwin, K. M., Vihokhern, B., Wongsanen, K., von Seidlein, L., Dhorda, M., Snounou, G., Keereecharoen, L., Singhasivanon, P., Sirithiranont, P., Chalk, J., Nguon, C., Day, N. P., Nosten, F., Dondorp, A. and White, N. J. (2016) 'Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria', *J Infect Dis*, 213(8), pp. 1322-9.
- Ismail, I. A., Notananda, V. and Schepens, J. (1974) 'Studies on malaria and responses of *Anopheles balabacensis balabacensis* and *Anopheles minimus* to DDT residual spraying in Thailand. I. Pre-spraying observations', *Acta Trop*, 31(2), pp. 129-64.
- Ismail, I. A., Phinichpongse, S. and Boonrasri, P. (1978) 'Responses of *Anopheles minimus* to DDT residual spraying in a cleared forested foothill area in central Thailand', *Acta Trop*, 35(1), pp. 69-82.
- Ismail, I. A. H., Notananda, V., Schepens, J. and World Health Organization. (1975) *Studies on malaria and responses of *Anopheles balabacensis balabacensis* and *Anopheles minimus* to DDT residual spraying in Thailand*. Geneva: World Health Organization.
- Janis, M. C. (1993) 'Tertiary mammal evolution in the context of changing climates, vegetation, and tectonic events.', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, pp. 467-500.
- Jawara, M., Awolola, T. S., Pinder, M., Jeffries, D., Smallegange, R. C., Takken, W. and Conway, D. J. (2011) 'Field testing of different chemical combinations as odour baits for trapping wild mosquitoes in The Gambia', *PLoS One*, 6(5), pp. e19676.
- Jeffery, G. M. (1952) 'The infection of mosquitoes by *Plasmodium vivax* (Chesson strain) during the early primary parasitemias', *Am J Trop Med Hyg*, 1(4), pp. 612-7.
- Jeffery, G. M. (1960) 'Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* under various conditions', *Am J Trop Med Hyg*, 9, pp. 315-20.
- Jeffery, G. M. and Eyles, D. E. (1955) 'Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* as related to gametocyte density and duration of infection', *Am J Trop Med Hyg*, 4(5), pp. 781-9.
- John, G. K., Douglas, N. M., von Seidlein, L., Nosten, F., Baird, J. K., White, N. J. and Price, R. N. (2012) 'Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature', *Malar J*, 11, pp. 280.
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D. and Ellis, M. D. (2013) 'Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*)', *PLoS One*, 8(1), pp. e54092.
- Kabiru, E. W., Mbogo, C. M., Muiruri, S. K., Ouma, J. H., Githure, J. I. and Beier, J. C. (1997) 'Sporozoite loads of naturally infected *Anopheles* in Kilifi District, Kenya', *J Am Mosq Control Assoc*, 13(3), pp. 259-62.

- Kankaew, P., Krasaesub, S. and Sithiprasasna, R. (2005) 'Soil analysis around anopheline breeding habitats in north-western Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 36(5), pp. 1153-61.
- Kawada, H., Yen, N. T., Hoa, N. T., Sang, T. M., N, V. A. N. D. and Takagi, M. (2005) 'Field evaluation of spatial repellency of metofluthrin impregnated plastic strips against mosquitoes in Hai Phong City, Vietnam', *Am J Trop Med Hyg*, 73(2), pp. 350-3.
- Kelly-Hope, L. A. and McKenzie, F. E. (2009) 'The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa', *Malar J*, 8, pp. 19.
- Kengluetcha, A., Rongnoparut, P., Boonsuepsakul, S., Sithiprasasna, R., Rodpradit, P. and Baimai, V. (2005) 'Geographical distribution of Anopheles minimus species A and C in western Thailand', *J Vector Ecol*, 30(2), pp. 225-30.
- Khantikul, N., Butraporn, P., Kim, H. S., Leemingsawat, S., Tempongko, M. A. and Suwonkerd, W. (2009) 'Adherence to antimalarial drug therapy among vivax malaria patients in northern Thailand', *J Health Popul Nutr*, 27(1), pp. 4-13.
- Kiattibutr, K., Roobsoong, W., Sriwichai, P., Saeseu, T., Rachaphaew, N., Suansomjit, C., Buates, S., Obadia, T., Mueller, I., Cui, L., Nguitrageol, W. and Sattabongkot, J. (2016) 'Infectivity of symptomatic and asymptomatic Plasmodium vivax infections to a Southeast Asian vector, Anopheles dirus', *Int J Parasitol*.
- Killeen, G. F. (2014) 'Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission', *Malar J*, 13, pp. 330.
- Kitchen, S. (1949a) 'Symptomatology: general considerations and falciparum malaria.', in Boyd, M. (ed.) *Malariology*. Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 996-1017.
- Kitchen, S. (1949b) 'Vivax malaria.', in Boyd, M. (ed.) *Malariology*. Philadelphia: W. B. Saunders, pp. 1027-1045.
- Knols, B. G. (1996) 'On human odour, malaria mosquitoes, and limburger cheese', *Lancet: Vol. 9037*. England, pp. 1322.
- Knols, B. G., de Jong, R. and Takken, W. (1995) 'Differential attractiveness of isolated humans to mosquitoes in Tanzania', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89(6), pp. 604-6.
- Koch, R. (1900) 'Zusammenfassende darstellung der ergebnisse der Malaria expedition.', *Dtsch Med Wsch*, 26, pp. 781-801
- Kochar, D. K., Das, A., Kochar, S. K., Saxena, V., Sirohi, P., Garg, S., Kochar, A., Khatri, M. P. and Gupta, V. (2009) 'Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India', *Am J Trop Med Hyg*, 80(2), pp. 194-8.
- Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V. and Das, A. (2005) 'Plasmodium vivax malaria', *Emerg Infect Dis*, 11(1), pp. 132-4.
- Kongmee, M., Achee, N. L., Lerthusnee, K., Bangs, M. J., Chowpongpan, S., Prabaripai, A. and Charoenviriyaphap, T. (2012) 'Seasonal abundance and distribution of Anopheles larvae in a riparian malaria endemic area of western Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 43(3), pp. 601-13.
- Kouznetsov, R. L. (1976) 'Malaria control by application of indoor spraying of residual insecticides in Tropical Africa and its impact on population health'. Geneva: World Health Organization.
- Kwansomboon, N., Chaumeau, V., Kittiphanakun, P., Cerqueira, D., Corbel, V. and Chareonviriyaphap, T. (2017) 'Vector bionomics and malaria transmission along the Thailand-Myanmar border: a baseline entomological survey', *J Vector Ecol*, 42(1), pp. 84-93.
- Landier, J., Kajeewiwa, L., Thwin, M. M., Parker, D. M., Chaumeau, V., Wiladphaingern, J., Imwong, M., Miotto, O., Patumrat, K., Duanguppama, J., Cerqueira, D., Malleret, B., Rénia, L., Nosten, S., von Seidlein, L., Ling, C., Proux, S., Corbel, V., Simpson, J. A., Dondorp, A. M., White, N. J. and Nosten, F. H. (2017) 'Safety and effectiveness of mass drug administration to accelerate elimination of artemisinin-resistant falciparum malaria: A pilot trial in four villages of Eastern Myanmar [version 1; referees: 1 approved]', *Wellcome Open Res*, 2(81).

- Laroche, M., Almeras, L., Pecchi, E., Bechah, Y., Raoult, D., Viola, A. and Parola, P. (2017) 'MALDI-TOF MS as an innovative tool for detection of Plasmodium parasites in Anopheles mosquitoes', *Malar J*, 16(1), pp. 5.
- Leang, R., Taylor, W. R., Bouth, D. M., Song, L., Tarning, J., Char, M. C., Kim, S., Witkowski, B., Duru, V., Domergue, A., Khim, N., Ringwald, P. and Menard, D. (2015) 'Evidence of Plasmodium falciparum Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment', *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), pp. 4719-26.
- Limrat, D., Rojruthai, B., Apiwathnasorn, C., Samung, Y. and Prommongkol, S. (2001) 'Anopheles barbirostris/campestris as a probable vector of malaria in Aranyaprathet, Sa Kaeo Province', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 32(4), pp. 739-44.
- Lin, J. T., Saunders, D. L. and Meshnick, S. R. (2014) 'The role of submicroscopic malaria in malaria transmission: what is the evidence?', *Trends Parasitol*, 30(4), pp. 183-90.
- Lin, J. T., Ubalee, R., Lon, C., Balasubramanian, S., Kuntawunginn, W., Rahman, R., Saingam, P., Heng, T. K., Vy, D., San, S., Nuom, S., Burkly, H., Chanarat, N., Ponsa, C., Levitz, L., Parobek, C., Chuor, C. M., Somethy, S., Spring, M., Lanteri, C., Gosi, P., Meshnick, S. R. and Saunders, D. L. (2015) 'Microscopic Plasmodium falciparum Gametocytemia and Infectivity to Mosquitoes in Cambodia', *J Infect Dis*.
- Lin, J. T., Ubalee, R., Lon, C., Balasubramanian, S., Kuntawunginn, W., Rahman, R., Saingam, P., Heng, T. K., Vy, D., San, S., Nuom, S., Burkly, H., Chanarat, N., Ponsa, C., Levitz, L., Parobek, C., Chuor, C. M., Somethy, S., Spring, M., Lanteri, C., Gosi, P., Meshnick, S. R. and Saunders, D. L. (2016) 'Microscopic Plasmodium falciparum Gametocytemia and Infectivity to Mosquitoes in Cambodia', *J Infect Dis*, 213(9), pp. 1491-4.
- Lindsay, S., Ansell, J., Selman, C., Cox, V., Hamilton, K. and Walraven, G. (2000) 'Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes', *Lancet: Vol. 9219*. England, pp. 1972.
- Lindsay, S. W., Ewald, J. A., Samung, Y., Apiwathnasorn, C. and Nosten, F. (1998) 'Thanaka (Limonia acidissima) and deet (di-methyl benzamide) mixture as a mosquito repellent for use by Karen women', *Med Vet Entomol*, 12(3), pp. 295-301.
- Lindsay, S. W., Snow, R. W., Broomfield, G. L., Janneh, M. S., Wirtz, R. A. and Greenwood, B. M. (1989) 'Impact of permethrin-treated bednets on malaria transmission by the Anopheles gambiae complex in The Gambia', *Med Vet Entomol*, 3(3), pp. 263-71.
- Liu, Y. L., Wu, K. S., Jia, J. X., Jiang, W. K., Wang, K. A., Pan, J. Y., He, J. J., Luo, M. Z., Zhang, J. Y., Zhang, Y. G. and et al. (1986) '[Integrated approach in malaria control including environmental management to reduce man-mosquito contact and the reduction of infection source in Huanghuai Plain]', *Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 4(4), pp. 246-50.
- Londono-Renteria, B., Drame, P. M., Weitzel, T., Rosas, R., Gripping, C., Cardenas, J. C., Alvares, M., Wesson, D. M., Poinsignon, A., Remoue, F. and Colpitts, T. M. (2015) 'An. gambiae gSG6-P1 evaluation as a proxy for human-vector contact in the Americas: a pilot study', *Parasit Vectors*, 8, pp. 533.
- Looareesuwan, S., Harinasuta, T. and Chongsuphajaisiddhi, T. (1992) 'Drug resistant malaria, with special reference to Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 23(4), pp. 621-34.
- Luxemburger, C., Perea, W. A., Delmas, G., Pruja, C., Pecoul, B. and Moren, A. (1994) 'Permethrin-impregnated bed nets for the prevention of malaria in schoolchildren on the Thai-Burmese border', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(2), pp. 155-9.
- Luxemburger, C., Ricci, F., Nosten, F., Raimond, D., Bathet, S. and White, N. J. (1997) 'The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91(3), pp. 256-62.
- Luxemburger, C., Thwai, K. L., White, N. J., Webster, H. K., Kyle, D. E., Maelankirri, L., Chongsuphajaisiddhi, T. and Nosten, F. (1996) 'The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(2), pp. 105-11.

- MacDonald (1926) 'Malaria in the children of Freetown, Sierra Leone.', *Ann. trop. Med. Parasit.*, 20, pp. 239.
- Macdonald, G. (1952) 'The analysis of equilibrium in malaria', *Trop Dis Bull*, 49(9), pp. 813-29.
- Magesa, S. M., Wilkes, T. J., Mnzava, A. E., Njunwa, K. J., Myamba, J., Kivuyo, M. D., Hill, N., Lines, J. D. and Curtis, C. F. (1991) 'Trial of pyrethroid impregnated bednets in an area of Tanzania holoendemic for malaria. Part 2. Effects on the malaria vector population', *Acta Trop*, 49(2), pp. 97-108.
- Maia, M. F., Abonuusum, A., Lorenz, L. M., Clausen, P. H., Bauer, B., Garms, R. and Kruppa, T. (2012) 'The effect of deltamethrin-treated net fencing around cattle enclosures on outdoor-biting mosquitoes in Kumasi, Ghana', *PLoS One*, 7(9), pp. e45794.
- Maia, M. F., Kreppel, K., Mbeyela, E., Roman, D., Mayagaya, V., Lobo, N. F., Ross, A. and Moore, S. J. (2016) 'A crossover study to evaluate the diversion of malaria vectors in a community with incomplete coverage of spatial repellents in the Kilombero Valley, Tanzania', *Parasit Vectors*, 9, pp. 451.
- Maia, M. F. and Moore, S. J. (2011) 'Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing', *Malar J: Vol. Suppl 1*, pp. S11.
- Malaria Elimination Initiative (2014) *Review of mass drug administration and primaquine use.*: Bill and Melinda Gates Foundation. Available at: [http://www.usaidami.org/extras/mei\\_reviewofmdaandprimaquine.pdf](http://www.usaidami.org/extras/mei_reviewofmdaandprimaquine.pdf) (Accessed: 29/09/2017 2017).
- Malaria Elimination Task Force (2017) *Activity Report (May 2014-December 2016)*. Available at: [http://www.shoklo-unit.com/sites/default/files/reports/malaria-elimination-task-force/metf\\_report\\_may\\_14\\_dec\\_16.pdf](http://www.shoklo-unit.com/sites/default/files/reports/malaria-elimination-task-force/metf_report_may_14_dec_16.pdf) (Accessed: 29/09/2017 2017).
- Mangold, K. A., Manson, R. U., Koay, E. S., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R. B., Jr., Peterson, L. R. and Kaul, K. L. (2005) 'Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp', *J Clin Microbiol*, 43(5), pp. 2435-40.
- Manguin, S. and Boëte, C. (2011) 'Global impact of mosquito biodiversity, human vector- borne diseases and environmental change.', in Pujol, J.L. (ed.) *The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity*. . Winchester, UK InTech, pp. 27-50.
- Manh, C. D., Beebe, N. W., Van, V. N., Quang, T. L., Lein, C. T., Nguyen, D. V., Xuan, T. N., Ngoc, A. L. and Cooper, R. D. (2010) 'Vectors and malaria transmission in deforested, rural communities in north-central Vietnam', *Malar J*, 9, pp. 259.
- Matowo, N. S., Koekemoer, L. L., Moore, S. J., Mmbando, A. S., Mapua, S. A., Coetzee, M. and Okumu, F. O. (2016) 'Combining Synthetic Human Odours and Low-Cost Electrocuting Grids to Attract and Kill Outdoor-Biting Mosquitoes: Field and Semi-Field Evaluation of an Improved Mosquito Landing Box', *PLoS One*, 11(1), pp. e0145653.
- Matowo, N. S., Moore, J., Mapua, S., Madumla, E. P., Moshi, I. R., Kaindoa, E. W., Mwangungulu, S. P., Kavishe, D. R., Sumaye, R. D., Lwetoijera, D. W. and Okumu, F. O. (2013) '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', *Parasit Vectors*, 6, pp. 137.
- Mbogo, C. M., Mwangangi, J. M., Nzovu, J., Gu, W., Yan, G., Gunter, J. T., Swalm, C., Keating, J., Regens, J. L., Shililu, J. I., Githure, J. I. and Beier, J. C. (2003) 'Spatial and temporal heterogeneity of Anopheles mosquitoes and Plasmodium falciparum transmission along the Kenyan coast', *Am J Trop Med Hyg*, 68(6), pp. 734-42.
- McCullagh, P. and Nelder, J. A. (1989) *Generalized linear models, second edition. Monographs on Statistics & Applied Probability* USA: Chappman & Hall.
- McDaniel, L. S., Henderson, N. C. and Rathouz, P. J. (2013) 'Fast pure R implementation of GEE: application of the Matrix package', *The R journal*, 5(1), pp. 181-187.
- McGready, R., Boel, M., Rijken, M. J., Ashley, E. A., Cho, T., Moo, O., Paw, M. K., Pimanpanarak, M., Hkiriareon, L., Carrara, V. I., Lwin, K. M., Phyto, A. P., Turner, C., Chu, C. S., van Vugt, M., Price, R. N., Luxemburger, C., ter Kuile, F. O., Tan, S. O., Proux, S., Singhasivanon, P., White, N. J. and

- Nosten, F. H. (2012) 'Effect of early detection and treatment on malaria related maternal mortality on the north-western border of Thailand 1986-2010', *PLoS One*, 7(7), pp. e40244.
- McKenzie, F. E., Jeffery, G. M. and Collins, W. E. (2002) 'Plasmodium vivax blood-stage dynamics', *J Parasitol*, 88(3), pp. 521-35.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. and Lopez, R. (2013a) 'Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI', *Nucleic Acids Res*, 41(Web Server issue), pp. W597-600.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. and Lopez, R. (2013b) 'Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI', *Nucleic Acids Res*, 41(2), pp. W597-600.
- Meek, S. R., Doberstyn, E. B., Gauzere, B. A., Thanapanich, C., Nordlander, E. and Phuphaisan, S. (1986) 'Treatment of falciparum malaria with quinine and tetracycline or combined mefloquine/sulfadoxine/pyrimethamine on the Thai-Kampuchean border', *Am J Trop Med Hyg*, 35(2), pp. 246-50.
- Mendis, K., Sina, B. J., Marchesini, P. and Carter, R. (2001) 'The neglected burden of Plasmodium vivax malaria', *Am J Trop Med Hyg*, 64(1-2 Suppl), pp. 97-106.
- Moiroux, N., Bio-Bangana, A. S., Djenontin, A., Chandre, F., Corbel, V. and Guis, H. (2013) 'Modelling the risk of being bitten by malaria vectors in a vector control area in southern Benin, west Africa', *Parasit Vectors*, 6, pp. 71.
- Moiroux, N., Chandre, F., Hougard, J. M., Corbel, V. and Pennetier, C. (2017) 'Remote Effect of Insecticide-Treated Nets and the Personal Protection against Malaria Mosquito Bites', *PLoS One*, 12(1), pp. e0170732.
- Moiroux, N., Damien, G. B., Egrot, M., Djenontin, A., Chandre, F., Corbel, V., Killeen, G. F. and Pennetier, C. (2014a) 'Human exposure to early morning Anopheles funestus biting behavior and personal protection provided by long-lasting insecticidal nets', *PLoS One*, 9(8), pp. e104967.
- Moiroux, N., Djenontin, A., Bio-Bangana, A. S., Chandre, F., Corbel, V. and Guis, H. (2014b) 'Spatio-temporal analysis of abundances of three malaria vector species in southern Benin using zero-truncated models', *Parasit Vectors*, 7, pp. 103.
- Moiroux, N., Gomez, M. B., Pennetier, C., Elanga, E., Djenontin, A., Chandre, F., Djegbe, I., Guis, H. and Corbel, V. (2012) 'Changes in Anopheles funestus biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin', *J Infect Dis*, 206(10), pp. 1622-9.
- Mok, S., Imwong, M., Mackinnon, M. J., Sim, J., Ramadoss, R., Yi, P., Mayxay, M., Chotivanich, K., Liong, K. Y., Russell, B., Socheat, D., Newton, P. N., Day, N. P., White, N. J., Preiser, P. R., Nosten, F., Dondorp, A. M. and Bozdech, Z. (2011) 'Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum is associated with an altered temporal pattern of transcription', *BMC Genomics*, 12, pp. 391.
- Molineaux, L. and Dietz, K. (1999) 'Review of intra-host models of malaria', *Parassitologia*, 41(1-3), pp. 221-31.
- Moore, S. J., Min, X., Hill, N., Jones, C., Zaixing, Z. and Cameron, M. M. (2008) 'Border malaria in China: knowledge and use of personal protection by minority populations and implications for malaria control: a questionnaire-based survey', *BMC Public Health*, 8, pp. 344.
- Morgan, K. (2009) *Determining the processes generating biodiversity in Southeast Asia using Anopheles mosquitoes*. PhD, University of Manchester.
- Morgan, K., Linton, Y. M., Somboon, P., Saikia, P., Dev, V., Socheat, D. and Walton, C. (2010) 'Inter-specific gene flow dynamics during the Pleistocene-dated speciation of forest-dependent mosquitoes in Southeast Asia', *Mol Ecol*, 19(11), pp. 2269-85.
- Morgan, K., O'Loughlin, S. M., Chen, B., Linton, Y. M., Thongwat, D., Somboon, P., Fong, M. Y., Butlin, R., Verity, R., Prakash, A., Htun, P. T., Hlaing, T., Nambanya, S., Socheat, D., Dinh, T. H. and Walton, C. (2011) 'Comparative phylogeography reveals a shared impact of pleistocene environmental change in shaping genetic diversity within nine Anopheles mosquito species across the Indo-Burma biodiversity hotspot', *Mol Ecol*, 20(21), pp. 4533-49.

- Morgan, K., Somboon, P. and Walton, C. (2013) 'Understanding Anopheles Diversity in Southeast Asia and Its Applications for Malaria Control', in Manguin, S. (ed.) *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 327-356.
- Muenworn, V., Sungvornyothin, S., Kongmee, M., Polsomboon, S., Bangs, M. J., Akrathanakul, P., Tanasinchayakul, S., Prabaripai, A. and Chareonviriyaphap, T. (2009) 'Biting activity and host preference of the malaria vectors *Anopheles maculatus* and *Anopheles sawadwongporni* (Diptera: Culicidae) in Thailand', *J Vector Ecol*, 34(1), pp. 62-9.
- Mulamba, C., Irving, H., Riveron, J. M., Mukwaya, L. G., Birungi, J. and Wondji, C. S. (2014) 'Contrasting Plasmodium infection rates and insecticide susceptibility profiles between the sympatric sibling species *Anopheles parensis* and *Anopheles funestus* s.s: a potential challenge for malaria vector control in Uganda', *Parasites & Vectors*, 7(1), pp. 71.
- Muller, G. C., Beier, J. C., Traore, S. F., Toure, M. B., Traore, M. M., Bah, S., Doumbia, S. and Schlein, Y. (2010) 'Successful field trial of attractive toxic sugar bait (ATSB) plant-spraying methods against malaria vectors in the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa', *Malar J*, 9, pp. 210.
- Muller, G. C. and Schlein, Y. (2008) 'Efficacy of toxic sugar baits against adult cistern-dwelling *Anopheles claviger*', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(5), pp. 480-4.
- Muller, P., Pfluger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F. and Lengeler, C. (2013) 'Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling', *PLoS One*, 8(2), pp. e57486.
- Murphy, M. W., Dunton, R. F., Perich, M. J. and Rowley, W. A. (2001) 'Attraction of *Anopheles* (Diptera: culicidae) to volatile chemicals in Western Kenya', *J Med Entomol*, 38(2), pp. 242-4.
- Muthen, B. and Muthen, L. K. (2000) 'Integrating person-centered and variable-centered analyses: growth mixture modeling with latent trajectory classes', *Alcohol Clin Exp Res*, 24(6), pp. 882-91.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. and Kent, J. (2000) 'Biodiversity hotspots for conservation priorities', *Nature*, 403(6772), pp. 853-8.
- N'Guessan, R., Corbel, V., Akogbéto, M. and Rowland, M. (2007) 'Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin', *Emerg Infect Dis*, 13(2), pp. 199-206.
- Nair, S., Nkhoma, S. C., Serre, D., Zimmerman, P. A., Gorena, K., Daniel, B. J., Nosten, F., Anderson, T. J. and Cheeseman, I. H. (2014) 'Single-cell genomics for dissection of complex malaria infections', *Genome Res*, 24(6), pp. 1028-38.
- Nambozi, M., Kabuya, J. B., Hachizovu, S., Mwakazanga, D., Mulenga, J., Kasongo, W., Buyze, J., Mulenga, M., Van Geertruyden, J. P. and D'Alessandro, U. (2017) 'Artemisinin-based combination therapy in pregnant women in Zambia: efficacy, safety and risk of recurrent malaria', *Malar J*, 16(1), pp. 199.
- Nambozi, M., Mulenga, M., Halidou, T., Tagbor, H., Mwapasa, V., Phiri, L. K., Kalanda, G., Valea, I., Traore, M., Mwakazanga, D., Claeys, Y., Schurmans, C., De Crop, M., Menten, J., Ravinetto, R., Thriemer, K., Van Geertruyden, J. P., Mutabingwa, T., D'Alessandro, U. and Group, P. (2015) 'Safe and efficacious artemisinin-based combination treatments for African pregnant women with malaria: a multicentre randomized control trial', *Reprod Health*, 12, pp. 5.
- Nambozi, M., Van Geertruyden, J. P., Hachizovu, S., Chaponda, M., Mukwamataba, D., Mulenga, M., Ubben, D. and D'Alessandro, U. (2011) 'Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperazine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Zambian children', *Malar J*, 10, pp. 50.
- Nebbak, A., Koumare, S., Willcox, A. C., Berenger, J. M., Raoult, D., Almeras, L. and Parola, P. (2017) 'Field application of MALDI-TOF MS on mosquito larvae identification', *Parasitology*, pp. 1-11.
- Nedelman, J. (1983) 'A negative binomial model for sampling mosquitoes in a malaria survey', *Biometrics*, 39(4), pp. 1009-20.
- Newby, G., Hwang, J., Koita, K., Chen, I., Greenwood, B., von Seidlein, L., Shanks, G. D., Slutsker, L., Kachur, S. P., Wegbreit, J., Ippolito, M. M., Poirot, E. and Gosling, R. (2015) 'Review of mass

- drug administration for malaria and its operational challenges', *Am J Trop Med Hyg*, 93(1), pp. 125-34.
- Njunwa, K. J., Lines, J. D., Magesa, S. M., Mnzava, A. E., Wilkes, T. J., Alilio, M., Kivumbi, K. and Curtis, C. F. (1991) 'Trial of pyrethroid impregnated bednets in an area of Tanzania holoendemic for malaria. Part 1. Operational methods and acceptability', *Acta Trop*, 49(2), pp. 87-96.
- Nosten, F. (2016) 'Elimination in South-East Asia ? The role of antimalarial drugs.', *Bulletin de l'académie nationale de médecine*, 200(3), pp. 467-476.
- Nosten, F., Imvithaya, S., Vincenti, M., Delmas, G., Lebihan, G., Hausler, B. and White, N. (1987) 'Malaria on the Thai-Burmese border: treatment of 5192 patients with mefloquine-sulfadoxine-pyrimethamine', *Bull World Health Organ*, 65(6), pp. 891-6.
- Nosten, F., McGready, R., Simpson, J. A., Thwai, K. L., Balkan, S., Cho, T., Hkirijaroen, L., Looareesuwan, S. and White, N. J. (1999) 'Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy', *Lancet*, 354(9178), pp. 546-9.
- Nosten, F., ter Kuile, F., Chongsuphajaisiddhi, T., Luxemburger, C., Webster, H. K., Edstein, M., Phaipun, L., Thew, K. L. and White, N. J. (1991a) 'Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border', *Lancet*, 337(8750), pp. 1140-3.
- Nosten, F., ter Kuile, F., Maelankirri, L., Decludt, B. and White, N. J. (1991b) 'Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(4), pp. 424-9.
- Nosten, F., van Vugt, M., Price, R., Luxemburger, C., Thway, K. L., Brockman, A., McGready, R., ter Kuile, F., Looareesuwan, S. and White, N. J. (2000) 'Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of Plasmodium falciparum malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study', *Lancet*, 356(9226), pp. 297-302.
- Nosten, F. and White, N. J. (2007) 'Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria', *Am J Trop Med Hyg*, 77(6 Suppl), pp. 181-92.
- Noukpo, M. H., Damien, G. B., Elanga-N'Dille, E., Sagna, A. B., Drame, P. M., Chaffa, E., Boussari, O., Corbel, V., Akogbéto, M. and Remoue, F. (2016) 'Operational Assessment of Long-Lasting Insecticidal Nets by Using an Anopheles Salivary Biomarker of Human-Vector Contact', *Am J Trop Med Hyg*, 95(6), pp. 1376-1382.
- Onori, E. and Grab, B. (1980) 'Indicators for the forecasting of malaria epidemics', *Bull World Health Organ*, 58(1), pp. 91-8.
- Onyamboko, M. A., Fanello, C. I., Wongsan, K., Tarning, J., Cheah, P. Y., Tshefu, K. A., Dondorp, A. M., Nosten, F., White, N. J. and Day, N. P. (2014) 'Randomized comparison of the efficacies and tolerabilities of three artemisinin-based combination treatments for children with acute Plasmodium falciparum malaria in the Democratic Republic of the Congo', *Antimicrob Agents Chemother*, 58(9), pp. 5528-36.
- Ouedraogo, A. L., Goncalves, B. P., Gneme, A., Wenger, E. A., Guelbeogo, M. W., Ouedraogo, A., Gerardin, J., Bever, C. A., Lyons, H., Pitroipa, X., Verhave, J. P., Eckhoff, P. A., Drakeley, C., Sauerwein, R., Luty, A. J., Kouyate, B. and Bousema, T. (2016) 'Dynamics of the Human Infectious Reservoir for Malaria Determined by Mosquito Feeding Assays and Ultrasensitive Malaria Diagnosis in Burkina Faso', *J Infect Dis*, 213(1), pp. 90-9.
- Ouédraogo, A. L., Gonçalves, B. P., Gnémé, A., Wenger, E. A., Guelbeogo, M. W., Ouédraogo, A., Gerardin, J., Bever, C. A., Lyons, H., Pitroipa, X., Verhave, J. P., Eckhoff, P. A., Drakeley, C., Sauerwein, R., Luty, A. J., Kouyaté, B. and Bousema, T. (2016) 'Dynamics of the Human Infectious Reservoir for Malaria Determined by Mosquito Feeding Assays and Ultrasensitive Malaria Diagnosis in Burkina Faso', *J Infect Dis*, 213(1), pp. 90-9.
- Overgaard, H. J., Sandve, S. R. and Suwonkerd, W. (2005) 'Evidence of anopheline mosquito resistance to agrochemicals in northern Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 36 Suppl 4, pp. 152-7.
- Oxford Burma Alliance (2017) *Ethnic nationalities of Burma*. Available at: <http://www.oxfordburmaalliance.org/ethnic-groups.html> (Accessed: 29/09/2017).

- Paluch, G., Bartholomay, L. and Coats, J. (2010) 'Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction', *Pest Manag Sci*, 66(9), pp. 925-35.
- Pekyi, D., Ampromfi, A. A., Tinto, H., Traore-Coulibaly, M., Tahita, M. C., Valea, I., Mwapasa, V., Kalilani-Phiri, L., Kalanda, G., Madanitsa, M., Ravinetto, R., Mutabingwa, T., Gbekor, P., Tagbor, H., Antwi, G., Menten, J., De Crop, M., Claeys, Y., Schurmans, C., Van Overmeir, C., Thriemer, K., Van Geertruyden, J. P., D'Alessandro, U., Nambozi, M., Mulenga, M., Hachizovu, S., Kabuya, J. B. and Mulenga, J. (2016) 'Four Artemisinin-Based Treatments in African Pregnant Women with Malaria', *N Engl J Med*, 374(10), pp. 913-27.
- Pennetier, C., Corbel, V., Boko, P., Odjo, A., N'Guessan, R., Lapied, B. and Hougard, J. M. (2007) 'Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*', *Malar J*, 6, pp. 38.
- Perandin, F., Manca, N., Calderaro, A., Piccolo, G., Galati, L., Ricci, L., Medici, M. C., Arcangeletti, M. C., Snounou, G., Dettori, G. and Chezzi, C. (2004) 'Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis', *J Clin Microbiol*, 42(3), pp. 1214-9.
- Phuc, B. Q., Rasmussen, C., Duong, T. T., Dong, L. T., Loi, M. A., Ménard, D., Tarning, J., Bustos, D., Ringwald, P., Galappaththy, G. L. and Thieu, N. Q. (2017) 'Treatment Failure of Dihydroartemisinin/Piperaquine for *Plasmodium falciparum* Malaria, Vietnam', *Emerg Infect Dis*, 23(4), pp. 715-717.
- Phyo, A. P., Ashley, E. A., Anderson, T. J. C., Bozdech, Z., Carrara, V. I., Sriprawat, K., Nair, S., White, M. M., Dziekan, J., Ling, C., Proux, S., Konghahong, K., Jeeyapant, A., Woodrow, C. J., Imwong, M., McGready, R., Lwin, K. M., Day, N. P. J., White, N. J. and Nosten, F. (2016) 'Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against *P. falciparum* Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors', *Clin Infect Dis*, 63(6), pp. 784-791.
- Phyo, A. P., Lwin, K. M., Price, R. N., Ashley, E. A., Russell, B., Sriprawat, K., Lindegardh, N., Singhasivanon, P., White, N. J. and Nosten, F. (2011) 'Dihydroartemisinin-piperaquine versus chloroquine in the treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand: a randomized controlled trial', *Clin Infect Dis*, 53(10), pp. 977-84.
- Poche, R. M., Burruss, D., Polyakova, L., Poche, D. M. and Garlapati, R. B. (2015) 'Treatment of livestock with systemic insecticides for control of *Anopheles arabiensis* in western Kenya', *Malar J*, 14, pp. 351.
- Poespoprodjo, J. R., Fobia, W., Kenangalem, E., Lampah, D. A., Hasanuddin, A., Warikar, N., Sugiarto, P., Tjitra, E., Anstey, N. M. and Price, R. N. (2009) 'Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy', *Clin Infect Dis*, 48(12), pp. 1704-12.
- Poespoprodjo, J. R., Fobia, W., Kenangalem, E., Lampah, D. A., Warikar, N., Seal, A., McGready, R., Sugiarto, P., Tjitra, E., Anstey, N. M. and Price, R. N. (2008) 'Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant *plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections are endemic', *Clin Infect Dis*, 46(9), pp. 1374-81.
- Poinsignon, A., Cornelie, S., Ba, F., Boulanger, D., Sow, C., Rossignol, M., Sokhna, C., Cisse, B., Simondon, F. and Remoue, F. (2009) 'Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites', *Malar J*, 8, pp. 198.
- Poinsignon, A., Cornelie, S., Mestres-Simon, M., Lanfrancotti, A., Rossignol, M., Boulanger, D., Cisse, B., Sokhna, C., Arca, B., Simondon, F. and Remoue, F. (2008) 'Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites', *PLoS One*, 3(6), pp. e2472.
- Poinsignon, A., Samb, B., Doucoure, S., Drame, P. M., Sarr, J. B., Sow, C., Cornelie, S., Maiga, S., Thiam, C., Rogerie, F., Guindo, S., Hermann, E., Simondon, F., Dia, I., Riveau, G., Konate, L. and Remoue, F. (2010) 'First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites', *Trop Med Int Health*, 15(10), pp. 1198-203.

- Pongtavornpinyo, W., Yeung, S., Hastings, I. M., Dondorp, A. M., Day, N. P. and White, N. J. (2008) 'Spread of anti-malarial drug resistance: mathematical model with implications for ACT drug policies', *Malar J*, 7, pp. 229.
- Ponlawat, A., Kankaew, P., Chanaimongkol, S., Pongsiri, A., Richardson, J. H. and Evans, B. P. (2016) 'Semi-Field Evaluation of Metofluthrin-Impregnated Nets on Host-Seeking *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus*', *J Am Mosq Control Assoc*, 32(2), pp. 130-8.
- Port, G. R., Boreham, P. F. L. and Bryan, J. H. (1980) 'The relationship of host size to feeding by mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae)', *Bulletin of entomological research*, 70(1), pp. 133-144.
- Prapanthadara, L., Koottathep, S., Promtet, N., Suwonkerd, W., Ketterman, A. J. and Somboon, P. (2000) 'Correlation of glutathione S-transferase and DDT dehydrochlorinase activities with DDT susceptibility in *Anopheles* and *Culex* mosquitos from northern Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 31 Suppl 1, pp. 111-8.
- Price, R., Luxemburger, C., van Vugt, M., Nosten, F., Kham, A., Simpson, J., Looareesuwan, S., Chongsuphajaisiddhi, T. and White, N. J. (1998) 'Artesunate and mefloquine in the treatment of uncomplicated multidrug-resistant hyperparasitaemic falciparum malaria', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92(2), pp. 207-11.
- Price, R., Nosten, F., Simpson, J. A., Luxemburger, C., Phaipun, L., ter Kuile, F., van Vugt, M., Chongsuphajaisiddhi, T. and White, N. J. (1999) 'Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria', *Am J Trop Med Hyg*, 60(6), pp. 1019-23.
- Price, R. N., Douglas, N. M. and Anstey, N. M. (2009) 'New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance', *Curr Opin Infect Dis*, 22(5), pp. 430-5.
- Price, R. N. and Nosten, F. (2014) 'Single-dose radical cure of *Plasmodium vivax*: a step closer', *Lancet*, 383(9922), pp. 1020-1.
- Price, R. N., Nosten, F., Luxemburger, C., ter Kuile, F. O., Paiphun, L., Chongsuphajaisiddhi, T. and White, N. J. (1996) 'Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility', *Lancet*, 347(9016), pp. 1654-8.
- Price, R. N., Simpson, J. A., Nosten, F., Luxemburger, C., Hkirjaroen, L., ter Kuile, F., Chongsuphajaisiddhi, T. and White, N. J. (2001) 'Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria', *Am J Trop Med Hyg*, 65(5), pp. 614-22.
- Price, R. N., Tjitra, E., Guerra, C. A., Yeung, S., White, N. J. and Anstey, N. M. (2007) 'Vivax malaria: neglected and not benign', *Am J Trop Med Hyg*, 77(6 Suppl), pp. 79-87.
- Pringle, G. (1966) 'A quantitative study of naturally-acquired malaria infections in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in a highly malarious area of East Africa', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 60(5), pp. 626-32.
- Pukrittayakamee, S., Supanaranond, W., Looareesuwan, S., Vanijanonta, S. and White, N. J. (1994) 'Quinine in severe falciparum malaria: evidence of declining efficacy in Thailand', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(3), pp. 324-7.
- Qualls, W. A., Muller, G. C., Revay, E. E., Allan, S. A., Arheart, K. L., Beier, J. C., Smith, M. L., Scott, J. M., Kravchenko, V. D., Hausmann, A., Yefremova, Z. A. and Xue, R. D. (2014) 'Evaluation of attractive toxic sugar bait (ATSB)-Barrier for control of vector and nuisance mosquitoes and its effect on non-target organisms in sub-tropical environments in Florida', *Acta Trop*, 131, pp. 104-10.
- Qualls, W. A., Muller, G. C., Traore, S. F., Traore, M. M., Arheart, K. L., Doumbia, S., Schlein, Y., Kravchenko, V. D., Xue, R. D. and Beier, J. C. (2015) 'Indoor use of attractive toxic sugar bait (ATSB) to effectively control malaria vectors in Mali, West Africa', *Malar J*, 14, pp. 301.
- Author (2016) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Available at: <https://www.R-project.org/>.
- Rahman, W. A., Abu Hassan, A., Adanan, C. R. and Rashid, M. R. (1993) 'The prevalence of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in relation to *Anopheles maculatus* densities in a Malaysian village', *Acta Trop*, 55(4), pp. 231-5.

- Ratanatham, S., Upatham, E. S., Prasittisuk, C., Rojanasunan, W., Theerasilp, N., Tremongkol, A. and Viyanant, V. (1988) 'Bionomics of Anopheles minimus and its role in malaria transmission in Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 19(2), pp. 283-9.
- Ratcliff, A., Siswantoro, H., Kenangalem, E., Maristela, R., Wuwung, R. M., Laihada, F., Ebsworth, E. P., Anstey, N. M., Tjitra, E. and Price, R. N. (2007) 'Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resistant falciparum and vivax malaria in Papua, Indonesia: an open-label randomised comparison', *Lancet*, 369(9563), pp. 757-65.
- Rattanarithikul, R., Harrison, B. A., Harbach, R. E., Panthusiri, P. and Coleman, R. E. (2006) 'Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. IV. Anopheles', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37 Suppl 2, pp. 1-128.
- Rattanarithikul, R., Konishi, E. and Linthicum, K. J. (1996) 'Detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum circumsporozoite antigen in anopheline mosquitoes collected in southern Thailand', *Am J Trop Med Hyg*, 54(2), pp. 114-21.
- Remoue, F., Cisse, B., Ba, F., Sokhna, C., Herve, J. P., Boulanger, D. and Simondon, F. (2006) 'Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100(4), pp. 363-70.
- Revay, E. E., Schlein, Y., Tsabari, O., Kravchenko, V., Qualls, W., De-Xue, R., Beier, J. C., Traore, S. F., Doumbia, S., Hausmann, A. and Muller, G. C. (2015) 'Formulation of attractive toxic sugar bait (ATSB) with safe EPA-exempt substance significantly diminishes the Anopheles sergentii population in a desert oasis', *Acta Trop*, 150, pp. 29-34.
- Rijken, M. J., McGready, R., Boel, M. E., Barends, M., Proux, S., Pimanpanarak, M., Singhasivanon, P. and Nosten, F. (2008) 'Dihydroartemisinin-piperaquine rescue treatment of multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria in pregnancy: a preliminary report', *Am J Trop Med Hyg*, 78(4), pp. 543-5.
- Rodriguez-Morales, A. J., Benitez, J. A. and Arria, M. (2008) 'Malaria mortality in Venezuela: focus on deaths due to Plasmodium vivax in children', *J Trop Pediatr*, 54(2), pp. 94-101.
- Rodriguez-Morales, A. J., Sanchez, E., Vargas, M., Piccolo, C., Colina, R., Arria, M. and Franco-Paredes, C. (2006) 'Is anemia in Plasmodium vivax malaria more frequent and severe than in Plasmodium falciparum?', *Am J Med: Vol. 11*. United States, pp. e9-10.
- Rohani, A., Zamree, I., Lim, L. H., Rahini, H., David, L. and Kamilan, D. (2006) 'Comparative field evaluation of residual-sprayed deltamethrin WG and deltamethrin WP for the control of malaria in Pahang, Malaysia', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37(6), pp. 1139-48.
- Roper, C., Pearce, R., Nair, S., Sharp, B., Nosten, F. and Anderson, T. (2004) 'Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria', *Science*, 305(5687), pp. 1124.
- Rosenberg, R. (1982) 'Forest malaria in Bangladesh. III. Breeding habits of anopheles dirus', *Am J Trop Med Hyg*, 31(2), pp. 192-201.
- Rosenberg, R. (2007) 'Plasmodium vivax in Africa: hidden in plain sight?', *Trends Parasitol*, 23(5), pp. 193-6.
- Rosenberg, R., Andre, R. G., Ngampatom, S., Hatz, C. and Burge, R. (1990a) 'A stable, oligosymptomatic malaria focus in Thailand', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(1), pp. 14-21.
- Rosenberg, R., Andre, R. G. and Somchit, L. (1990b) 'Highly efficient dry season transmission of malaria in Thailand', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(1), pp. 22-8.
- Rosenberg, R. and Maheswary, N. P. (1982) 'Forest malaria in Bangladesh. II. Transmission by Anopheles dirus', *Am J Trop Med Hyg*, 31(2), pp. 183-91.
- Round, P. D., Hughes, J. B. and D.S., W. (2003) 'Latitudinal range limits of resident forest birds in Thailand and the Indochinese-Sundaic zoogeographic transition.', *Natural History Bulletin of the Siam Society* 51, pp. 69-96.
- Rowland, M., Boko, P., Odjo, A., Asidi, A., Akogbeto, M. and N'Guessan, R. (2013) 'A new long-lasting indoor residual formulation of the organophosphate insecticide pirimiphos methyl for prolonged control of pyrethroid-resistant mosquitoes: an experimental hut trial in Benin', *PLoS One*, 8(7), pp. e69516.

- Rozendaal, J. A. (1997) *Vector control: methods used by individuals and communities*. Geneva: W.H.O.
- Russell, T. L., Govella, N. J., Azizi, S., Drakeley, C. J., Kachur, S. P. and Killeen, G. F. (2011) 'Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania', *Malar J*, 10, pp. 80.
- Saeung, A. (2012) 'Anopheles (Diptera: Culicidae) species Complex in Thailand: identification, distribution, bionomics and malaria-vector importance.', *International Journal of Parasitology Research*, 4(1), pp. 75-82.
- Saeung, A., Baimai, V., Otsuka, Y., Rattanarithikul, R., Somboon, P., Junkum, A., Tuetun, B., Takaoka, H. and Choochote, W. (2008) 'Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the Anopheles barbirostris Form A (Diptera:Culicidae) in Thailand', *Parasitol Res*, 102(3), pp. 499-507.
- Sagna, A. B., Sarr, J. B., Gaayeb, L., Drame, P. M., Ndiath, M. O., Senghor, S., Sow, C. S., Poinsignon, A., Seck, M., Hermann, E., Schacht, A. M., Faye, N., Sokhna, C., Remoue, F. and Riveau, G. (2013) 'gSG6-P1 salivary biomarker discriminates micro-geographical heterogeneity of human exposure to Anopheles bites in low and seasonal malaria areas', *Parasit Vectors*, 6, pp. 68.
- Sallum, M. A., Peyton, E. L. and Wilkerson, R. C. (2005) 'Six new species of the Anopheles leucosphyrus group, reinterpretation of An. elegans and vector implications', *Med Vet Entomol*, 19(2), pp. 158-99.
- Samarakoon, U., Regier, A., Tan, A., Desany, B. A., Collins, B., Tan, J. C., Emrich, S. J. and Ferdig, M. T. (2011) 'High-throughput 454 resequencing for allele discovery and recombination mapping in Plasmodium falciparum', *BMC Genomics*, 12, pp. 116.
- San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H. (2008) 'Mechanism of eukaryotic homologous recombination', *Annu Rev Biochem*, 77, pp. 229-57.
- Sangoro, O., Kelly, A. H., Mtali, S. and Moore, S. J. (2014) 'Feasibility of repellent use in a context of increasing outdoor transmission: a qualitative study in rural Tanzania', *Malar J*, 13, pp. 347.
- Saunders, D. L., Vanachayangkul, P., Lon, C., Program, U. S. A. M. M. R., National Center for Parasitology, E. t., and Malaria Control (CNM) and Forces, R. C. A. (2014) 'Dihydroartemisinin-piperaquine failure in Cambodia', *N Engl J Med*, 371(5), pp. 484-5.
- Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J. and Riviere, L. (2008) 'Antigenic variation in Plasmodium falciparum', *Annu Rev Microbiol*, 62, pp. 445-70.
- Schneider, P., Bousema, J. T., Gouagna, L. C., Otieno, S., van de Vegte-Bolmer, M., Omar, S. A. and Sauerwein, R. W. (2007) 'Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte densities frequently result in mosquito infection', *Am J Trop Med Hyg*, 76(3), pp. 470-4.
- Scott, C. J. (2009) *The Art of Not Being Governed: An Anarchist History of Upland Southeast Asia*. Yale Agrarian Studies Series New Heaven & London: Yale University Press, p. 416.
- Shan Women Action Network (2003) *Shan Refugees:Dispelling the Myths*. Available at: [www.shanwomen.org/tai/images/reports/dispelling\\_the\\_myths.pdf](http://www.shanwomen.org/tai/images/reports/dispelling_the_myths.pdf).
- Shanks, G. D. and White, N. J. (2013) 'The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases', *Lancet Infect Dis*, 13(10), pp. 900-6.
- Shilane, D., Evans, S. N. and Hubbard, A. E. (2010) 'Confidence intervals for negative binomial random variables of high dispersion', *Int J Biostat*, 6(1), pp. Article 10.
- Shute, P. G. and Maryon, M. E. (1960) *Laboratory technique for the study of malaria*. J. & A. Churchill, p. 86.
- Sidavong, B., Vythilingam, I., Phetsouvanh, R., Chan, S. T., Phonemixay, T., Hakim, S. L. and Phompida, S. (2004) 'Malaria transmission by Anopheles dirus in Attapeu Province, Lao PDR', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 35(2), pp. 309-15.
- Silver, J. B. (2008) *Mosquito Ecology - Field Sampling Methods*. Springer Netherlands.
- Singh, M., Brown, G. and Rogerson, S. J. (2013) 'Ownership and use of insecticide-treated nets during pregnancy in sub-Saharan Africa: a review', *Malar J*, 12, pp. 268.
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Chareonviriyaphap, T., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Elyazar, I. R., Kabaria, C. W., Harbach, R. E. and Hay, S. I. (2011) 'The dominant Anopheles

- vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis', *Parasit Vectors*, 4, pp. 89.
- Sithiprasasna, R., Jaichapor, B., Chanaimongkol, S., Khongtak, P., Lealsirivattanukul, T., Tiang-Trong, S., Burkett, D. A., Perich, M. J., Wirtz, R. A. and Coleman, R. E. (2004) 'Evaluation of candidate traps as tools for conducting surveillance for Anopheles mosquitoes in a malaria-endemic area in western Thailand', *J Med Entomol*, 41(2), pp. 151-7.
- Sithiprasasna, R., Linthicum, K. J., Liu, G. J., Jones, J. W. and Singhasivanon, P. (2003) 'Some entomological observations on temporal and spatial distribution of malaria vectors in three villages in northwestern Thailand using a geographic information system', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34(3), pp. 505-16.
- Sluydts, V., Durnez, L., Heng, S., Gryseels, C., Canier, L., Kim, S., Van Roey, K., Kerkhof, K., Khim, N., Mao, S., Uk, S., Sovannaroeth, S., Grietens, K. P., Sochantha, T., Menard, D. and Coosemans, M. (2016) 'Efficacy of topical mosquito repellent (picaridin) plus long-lasting insecticidal nets versus long-lasting insecticidal nets alone for control of malaria: a cluster randomised controlled trial', *Lancet Infect Dis*, 16(10), pp. 1169-77.
- Smith, D. L., Drakeley, C. J., Chiyaka, C. and Hay, S. I. (2010) 'A quantitative analysis of transmission efficiency versus intensity for malaria', *Nat Commun*, 1, pp. 108.
- Smith, D. L., Dushoff, J., Snow, R. W. and Hay, S. I. (2005) 'The entomological inoculation rate and Plasmodium falciparum infection in African children', *Nature*, 438(7067), pp. 492-5.
- Smith, M. 1994. Ethnic groups in Burma: development, democracy and human rights. Anne-Marie Sharman ed. London: Anti-Slavery International.
- Smith, T., Maire, N., Dietz, K., Killeen, G. F., Vounatsou, P., Molineaux, L. and Tanner, M. (2006) 'Relationship between the entomologic inoculation rate and the force of infection for Plasmodium falciparum malaria', *Am J Trop Med Hyg*, 75(2 Suppl), pp. 11-8.
- Smithuis, F. M., Kyaw, M. K., Phe, U. O., van der Broek, I., Katterman, N., Rogers, C., Almeida, P., Kager, P. A., Stepniewska, K., Lubell, Y., Simpson, J. A. and White, N. J. (2013a) 'Entomological determinants of insecticide-treated bed net effectiveness in Western Myanmar', *Malar J*, 12, pp. 364.
- Smithuis, F. M., Kyaw, M. K., Phe, U. O., van der Broek, I., Katterman, N., Rogers, C., Almeida, P., Kager, P. A., Stepniewska, K., Lubell, Y., Simpson, J. A. and White, N. J. (2013b) 'The effect of insecticide-treated bed nets on the incidence and prevalence of malaria in children in an area of unstable seasonal transmission in western Myanmar', *Malar J*, 12, pp. 363.
- Snounou, G., Pinheiro, L., Goncalves, A., Fonseca, L., Dias, F., Brown, K. N. and do Rosario, V. E. (1993) 'The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87(6), pp. 649-53.
- Sochantha, T., Van Bortel, W., Savonnaroeth, S., Marcotty, T., Speybroeck, N. and Coosemans, M. (2010) 'Personal protection by long-lasting insecticidal hammocks against the bites of forest malaria vectors', *Trop Med Int Health*, 15(3), pp. 336-41.
- Somboon, P. (1993) *Forest malaria vectors in northwest Thailand and a trial of control with pyrethroid-treated bednets*. PhD, Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London [Online] Available at: <http://researchonline.lshtm.ac.uk/id/eprint/682346> (Accessed).
- Somboon, P., Aramrattana, A., Lines, J. and Webber, R. (1998) 'Entomological and epidemiological investigations of malaria transmission in relation to population movements in forest areas of north-west Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 29(1), pp. 3-9.
- Somboon, P., Lines, J., Aramrattana, A., Chitprarop, U., Prajakwong, S. and Khamboonruang, C. (1995) 'Entomological evaluation of community-wide use of lambda-cyhalothrin-impregnated bed nets against malaria in a border area of north-west Thailand', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89(3), pp. 248-54.

- Somboon, P., Prapanthadara, L. A. and Suwonkerd, W. (2003) 'Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus* s.l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34(1), pp. 87-93.
- Spencer, T. E. (1966) 'Haemoglobin levels in the D'Entrecasteaux Islands in relation to malaria and nutrition', *Med J Aust*, 2(23), pp. 1093-7.
- Spring, M. D., Lin, J. T., Manning, J. E., Vanachayangkul, P., Somethy, S., Bun, R., Se, Y., Chann, S., Ittiverakul, M., Sia-ngam, P., Kuntawunginn, W., Arsanok, M., Buathong, N., Chaorattanakawee, S., Gosi, P., Ta-aksorn, W., Chanarat, N., Sundrakes, S., Kong, N., Heng, T. K., Nou, S., Teja-isavadharm, P., Pichyangkul, S., Phann, S. T., Balasubramanian, S., Juliano, J. J., Meshnick, S. R., Chour, C. M., Prom, S., Lanteri, C. A., Lon, C. and Saunders, D. L. (2015) 'Dihydroartemisinin-piperaquine failure associated with a triple mutant including kelch13 C580Y in Cambodia: an observational cohort study', *Lancet Infect Dis*, 15(6), pp. 683-91.
- Sriwichai, P., Karl, S., Samung, Y., Kiattibutr, K., Sirichaisinthop, J., Mueller, I., Cui, L. and Sattabongkot, J. (2017) 'Imported *Plasmodium falciparum* and locally transmitted *Plasmodium vivax*: cross-border malaria transmission scenario in northwestern Thailand', *Malar J*, 16(1), pp. 258.
- Sriwichai, P., Samung, Y., Sumruayphol, S., Kiattibutr, K., Kumpitak, C., Payakkapol, A., Kaewkungwal, J., Yan, G., Cui, L. and Sattabongkot, J. (2016a) 'Natural human *Plasmodium* infections in major *Anopheles* mosquitoes in western Thailand', *Parasit Vectors*, 9, pp. 17.
- Sriwichai, P., Samung, Y., Sumruayphol, S., Kiattibutr, K., Kumpitak, C., Payakkapol, A., Kaewkungwal, J., Yan, G., Cui, L. and Sattabongkot, J. (2016b) 'Natural human *Plasmodium* infections in major *Anopheles* mosquitoes in western Thailand', *Parasit Vectors*, 9(1), pp. 17.
- St Laurent, B., Miller, B., Burton, T. A., Amaratunga, C., Men, S., Sovannaroeth, S., Fay, M. P., Miotto, O., Gwadz, R. W., Anderson, J. M. and Fairhurst, R. M. (2015) 'Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* clinical isolates can infect diverse mosquito vectors of Southeast Asia and Africa', *Nat Commun*, 6, pp. 8614.
- Stephens, J. and Christophers, S. (1900) 'Malaria Infection in native children', *Report of the Malaria Commission of the Royal Society*, 3.
- Stepniewska, K., Price, R. N., Sutherland, C. J., Drakeley, C. J., von Seidlein, L., Nosten, F. and White, N. J. (2008) '*Plasmodium falciparum* gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity', *Malar J*, 7, pp. 249.
- Sterkers, Y., Varlet-Marie, E., Cassaing, S., Brenier-Pinchart, M. P., Brun, S., Dalle, F., Delhaes, L., Filisetti, D., Pelloux, H., Yera, H. and Bastien, P. (2010) 'Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens', *J Clin Microbiol*, 48(9), pp. 3216-22.
- Stone, C., Chitnis, N. and Gross, K. (2016) 'Environmental influences on mosquito foraging and integrated vector management can delay the evolution of behavioral resistance', *Evol Appl*, 9(3), pp. 502-17.
- Strode, C., Donegan, S., Garner, P., Enayati, A. A. and Hemingway, J. (2014) 'The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis', *PLoS Med*, 11(3), pp. e1001619.
- Su, X., Ferdig, M. T., Huang, Y., Huynh, C. Q., Liu, A., You, J., Wootton, J. C. and Wellems, T. E. (1999) 'A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*', *Science*, 286(5443), pp. 1351-3.
- Suwonkerd, W., Ritthison, W., Ngo, C. T., Tainchum, K., Bangs, M. J. and Chareonviriyaphap, T. (2013) 'Vector Biology and Malaria Transmission in Southeast Asia', in Manguin, S. (ed.) *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Rejeki: InTech, pp. 273-326.
- Syafuruddin, D., Bangs, M. J., Sidik, D., Elyazar, I., Asih, P. B., Chan, K., Nurleila, S., Nixon, C., Hendarto, J., Wahid, I., Ishak, H., Bøgh, C., Grieco, J. P., Achee, N. L. and Baird, J. K. (2014) 'Impact of a Spatial Repellent on Malaria Incidence in Two Villages in Sumba, Indonesia', *Am J Trop Med Hyg*, 91(6), pp. 1079-87.

- Syafruddin, D., Hidayati, A. P., Asih, P. B., Hawley, W. A., Sukowati, S. and Lobo, N. F. (2010) 'Detection of 1014F kdr mutation in four major Anopheline malaria vectors in Indonesia', *Malar J*, 9, pp. 315.
- Taai, K. and Harbach, R. E. (2017) 'Systematics of the *Anopheles barbirostris* species complex (Diptera: Culicidae: Anophelinae) in Thailand', *Zoological Journal of the Linnean Society*, 174(2), pp. 244-264.
- Tainchum, K., Kongmee, M., Manguin, S., Bangs, M. J. and Chareonviriyaphap, T. (2015) 'Anopheles species diversity and distribution of the malaria vectors of Thailand', *Trends Parasitol*, 31(3), pp. 109-19.
- Tainchum, K., Ritthison, W., Chuaycharoensuk, T., Bangs, M. J., Manguin, S. and Chareonviriyaphap, T. (2014) 'Diversity of *Anopheles* species and trophic behavior of putative malaria vectors in two malaria endemic areas of northwestern Thailand', *J Vector Ecol*, 39(2), pp. 424-36.
- Talisuna, A. O., Okello, P. E., Erhart, A., Coosemans, M. and D'Alessandro, U. (2007) 'Intensity of malaria transmission and the spread of *Plasmodium falciparum* resistant malaria: a review of epidemiologic field evidence', *Am J Trop Med Hyg*, 77(6 Suppl), pp. 170-80.
- Tananchai, C., Tisgratog, R., Juntarajumnong, W., Grieco, J. P., Manguin, S., Prabaripai, A. and Chareonviriyaphap, T. (2012) 'Species diversity and biting activity of *Anopheles dirus* and *Anopheles baimaii* (Diptera: Culicidae) in a malaria prone area of western Thailand', *Parasit Vectors*, 5, pp. 211.
- Tassanakajon, A., Boonsaeng, V., Wilairat, P. and Panyim, S. (1993) 'Polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* in mosquitoes', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87(3), pp. 273-5.
- ter Kuile, F. O., Dolan, G., Nosten, F., Edstein, M. D., Luxemburger, C., Phaipun, L., Chongsuphajaisiddhi, T., Webster, H. K. and White, N. J. (1993) 'Halofantrine versus mefloquine in treatment of multidrug-resistant *falciparum* malaria', *Lancet*, 341(8852), pp. 1044-9.
- Thanh, N. V., Thuy-Nhien, N., Tuyen, N. T., Tong, N. T., Nha-Ca, N. T., Dong, L. T., Quang, H. H., Farrar, J., Thwaites, G., White, N. J., Wolbers, M. and Hien, T. T. (2017) 'Rapid decline in the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to dihydroartemisinin-piperaquine in the south of Vietnam', *Malar J*, 16(1), pp. 27.
- The Border Consortium (2017) *Refugee and IDP Camp Populations: June 2017*. Available at: <http://www.theborderconsortium.org/resources/key-resources/>.
- Thomson, D. (1911) 'A research into the production, life and death of crescents in malignant tertian malaria, in treated and untreated cases, by an enumerative method.', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 5, pp. 57-86.
- Thongsahuan, S., Baimai, V., Junkum, A., Saeung, A., Min, G. S., Joshi, D., Park, M. H., Somboon, P., Suwonkerd, W., Tippawangkosol, P., Jariyapan, N. and Choochote, W. (2011) 'Susceptibility of *Anopheles campestris*-like and *Anopheles barbirostris* species complexes to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Thailand', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(1), pp. 105-12.
- Tisgratog, R., Tananchai, C., Juntarajumnong, W., Tuntakom, S., Bangs, M. J., Corbel, V. and Chareonviriyaphap, T. (2012) 'Host feeding patterns and preference of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) in a malaria endemic area of western Thailand: baseline site description', *Parasit Vectors*, 5, pp. 114.
- Tjitra, E., Anstey, N. M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., Lampah, D. A. and Price, R. N. (2008) 'Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia', *PLoS Med*, 5(6), pp. e128.
- Toma, T., Miyagi, I., Okazawa, T., Kobayashi, J., Saita, S., Tuzuki, A., Keomanila, H., Nambanya, S., Phompida, S., Uza, M. and Takakura, M. (2002) 'Entomological surveys of malaria in Khammouane Province, Lao PDR, in 1999 and 2000', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 33(3), pp. 532-46.
- Trape, J. F. (2001) 'The public health impact of chloroquine resistance in Africa', *Am J Trop Med Hyg*, 64(1-2 Suppl), pp. 12-7.

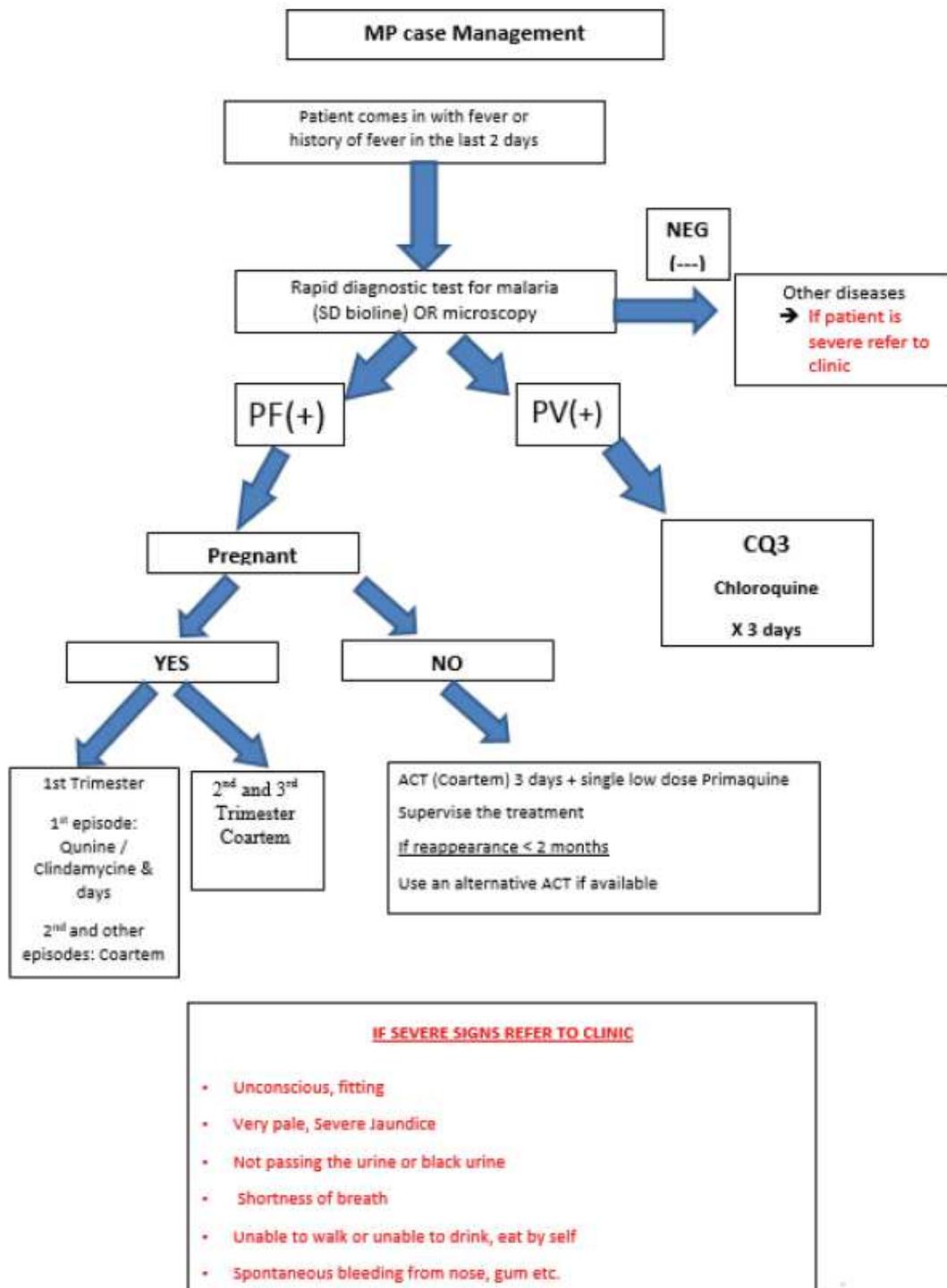
- Trape, J. F., Tall, A., Diagne, N., Ndiath, O., Ly, A. B., Faye, J., Dieye-Ba, F., Roucher, C., Bouganali, C., Badiane, A., Sarr, F. D., Mazenot, C., Touré-Baldé, A., Raoult, D., Druilhe, P., Mercereau-Puijalon, O., Rogier, C. and Sokhna, C. (2011) 'Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study', *Lancet Infect Dis*, 11(12), pp. 925-32.
- Trung, H. D., Bortel, W. V., Sochantha, T., Keokenchanh, K., Briet, O. J. and Coosemans, M. (2005) 'Behavioural heterogeneity of Anopheles species in ecologically different localities in Southeast Asia: a challenge for vector control', *Trop Med Int Health*, 10(3), pp. 251-62.
- Trung, H. D., Van Bortel, W., Sochantha, T., Keokenchanh, K., Quang, N. T., Cong, L. D. and Coosemans, M. (2004) 'Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia', *Trop Med Int Health*, 9(2), pp. 230-7.
- Tun, K. M., Imwong, M., Lwin, K. M., Win, A. A., Hlaing, T. M., Hlaing, T., Lin, K., Kyaw, M. P., Plewes, K., Faiz, M. A., Dhorda, M., Cheah, P. Y., Pukrittayakamee, S., Ashley, E. A., Anderson, T. J., Nair, S., McDew-White, M., Flegg, J. A., Grist, E. P., Guerin, P., Maude, R. J., Smithuis, F., Dondorp, A. M., Day, N. P., Nosten, F., White, N. J. and Woodrow, C. J. (2015) 'Spread of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker', *Lancet Infect Dis*, 15(4), pp. 415-21.
- Tusting, L. S., Bousema, T., Smith, D. L. and Drakeley, C. (2014) 'Measuring changes in Plasmodium falciparum transmission: precision, accuracy and costs of metrics', *Adv Parasitol*, 84, pp. 151-208.
- Tusting, L. S., Thwing, J., Sinclair, D., Fillinger, U., Gimnig, J., Bonner, K. E., Bottomley, C. and Lindsay, S. W. (2013) 'Mosquito larval source management for controlling malaria', *Cochrane Database Syst Rev*, (8), pp. Cd008923.
- United Nation Working Group on Migration in Thailand (2014) *Thailand migration report 2014*: United Nations Thematic Working Group on Migration in Thailand.
- Upatham, E. S., Prasittisuk, C., Ratanatham, S., Green, C. A., Rojanasunan, W., Setakana, P., Theerasilp, N., Tremongkol, A., Viyanant, V. and Pantuwatana, S. (1988) 'Bionomics of Anopheles maculatus complex and their role in malaria transmission in Thailand', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 19(2), pp. 259-69.
- Van Bortel, W., Trung, H. D., Hoi le, X., Van Ham, N., Van Chut, N., Luu, N. D., Roelants, P., Denis, L., Speybroeck, N., D'Alessandro, U. and Coosemans, M. (2010) 'Malaria transmission and vector behaviour in a forested malaria focus in central Vietnam and the implications for vector control', *Malar J*, 9, pp. 373.
- Van Bortel, W., Trung, H. D., Thuan le, K., Sochantha, T., Socheat, D., Sumrandee, C., Baimai, V., Keokenchanh, K., Samlane, P., Roelants, P., Denis, L., Verhaeghen, K., Obsomer, V. and Coosemans, M. (2008a) 'The insecticide resistance status of malaria vectors in the Mekong region', *Malar J*, 7, pp. 102.
- Van Bortel, W., Trung, H. D., Thuan, I. K., Sochantha, T., Socheat, D., Sumrandee, C., Baimai, V., Keokenchanh, K., Samlane, P., Roelants, P., Denis, L., Verhaeghen, K., Obsomer, V. and Coosemans, M. (2008b) 'The insecticide resistance status of malaria vectors in the Mekong region', *Malar J*, 7, pp. 102.
- Van Roey, K., Sokny, M., Denis, L., Van den Broeck, N., Heng, S., Siv, S., Sluydts, V., Sochantha, T., Coosemans, M. and Durnez, L. (2014) 'Field evaluation of picaridin repellents reveals differences in repellent sensitivity between Southeast Asian vectors of malaria and arboviruses', *PLoS Negl Trop Dis*, 8(12), pp. e3326.
- van Vugt, M., Leonardi, E., Phaipun, L., Slight, T., Thway, K. L., McGready, R., Brockman, A., Villegas, L., Loareesuwan, S., White, N. J. and Nosten, F. (2002) 'Treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria with artesunate-atovaquone-proguanil', *Clin Infect Dis*, 35(12), pp. 1498-504.

- van Vugt, M., Looareesuwan, S., Wilairatana, P., McGready, R., Villegas, L., Gathmann, I., Mull, R., Brockman, A., White, N. J. and Nosten, F. (2000) 'Artemether-lumefantrine for the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(5), pp. 545-8.
- Veiga, M. I., Ferreira, P. E., Jörnham, L., Malmberg, M., Kone, A., Schmidt, B. A., Petzold, M., Björkman, A., Nosten, F. and Gil, J. P. (2011) 'Novel polymorphisms in Plasmodium falciparum ABC transporter genes are associated with major ACT antimalarial drug resistance', *PLoS One*, 6(5), pp. e20212.
- Verdrager, J. (1986) 'Epidemiology of the emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in South-East Asia and Australasia', *J Trop Med Hyg*, 89(6), pp. 277-89.
- von Seidlein, L. (2014) 'The failure of screening and treating as a malaria elimination strategy', *PLoS Med*, 11(1), pp. e1001595.
- von Seidlein, L., Auburn, S., Espino, F., Shanks, D., Cheng, Q., McCarthy, J., Baird, K., Moyes, C., Howes, R., Menard, D., Bancone, G., Winasti-Satyahraha, A., Vestergaard, L. S., Green, J., Domingo, G., Yeung, S. and Price, R. (2013) 'Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-aminoquinoline treatment regimens: a workshop report', *Malar J*, 12, pp. 112.
- Voris, H. K. (2000) 'Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations', *Journal of biogeography*, 27(5), pp. 1153–1167.
- Waite, J. L., Swain, S., Lynch, P. A., Sharma, S. K., Haque, M. A., Montgomery, J. and Thomas, M. B. (2017) 'Increasing the potential for malaria elimination by targeting zoophilic vectors', *Sci Rep*, 7, pp. 40551.
- Waltmann, A., Darcy, A. W., Harris, I., Koepfli, C., Lodo, J., Vahi, V., Piziki, D., Shanks, G. D., Barry, A. E., Whittaker, M., Kazura, J. W. and Mueller, I. (2015) 'High Rates of Asymptomatic, Sub-microscopic Plasmodium vivax Infection and Disappearing Plasmodium falciparum Malaria in an Area of Low Transmission in Solomon Islands', *PLoS Negl Trop Dis*, 9(5), pp. e0003758.
- Walton, C., Handley, J. M., Kuvangkadilok, C., Collins, F. H., Harbach, R. E., Baimai, V. and Butlin, R. K. (1999) 'Identification of five species of the Anopheles dirus complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction', *Med Vet Entomol*, 13(1), pp. 24-32.
- Walton, C., Somboon, P., O'Loughlin, S. M., Zhang, S., Harbach, R. E., Linton, Y. M., Chen, B., Nolan, K., Duong, S., Fong, M. Y., Vythilingum, I., Mohammed, Z. D., Trung, H. D. and Butlin, R. K. (2007) 'Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the Anopheles maculatus group using the ITS2 region of rDNA', *Infect Genet Evol*, 7(1), pp. 93-102.
- Wang, D., Li, S., Cheng, Z., Xiao, N., Cotter, C., Hwang, J., Li, X., Yin, S., Wang, J., Bai, L., Zheng, Z. and Wang, S. (2015) 'Transmission Risk from Imported Plasmodium vivax Malaria in the China–Myanmar Border Region', *Emerg Infect Dis*, 21(10), pp. 1861-4.
- Watson, J., Taylor, W. R., Menard, D., Kheng, S. and White, N. J. (2017) 'Modelling primaquine-induced haemolysis in G6PD deficiency', *Elife*, 6.
- Watson, R. B. (1945) 'Observations on the Transmissibility of Strains of Plasmodium Vivax from Pacific War Areas by Anopheles Quadrimaculatus', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-25(4), pp. 315-321.
- Webb, C. E. and Hess, I. M. (2016) 'A review of recommendations on the safe and effective use of topical mosquito repellents', *Public Health Res Pract*, 26(5).
- Weeks, E. B. (1954) *Experiences in the control of malaria carried by A. Minimus in Burma*. Geneva: World Health Organization.
- Wernsdorfer, W. H. (1994) 'Epidemiology of drug resistance in malaria', *Acta Trop*, 56(2-3), pp. 143-56.
- White, J. C., Penny, D., Kealhofer, L., Maloney, B., workspac, N. a. l. c. t. a. l. C. t. e. t. i. a. and worksp, N. a. l. c. t. a. l. C. t. e. t. i. a. (2004) 'Vegetation changes from the late Pleistocene through the Holocene from three areas of archaeological significance in Thailand', *Quaternary International*, 113(1), pp. 111-132.
- White, N. (1999) 'Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1384), pp. 739-49.

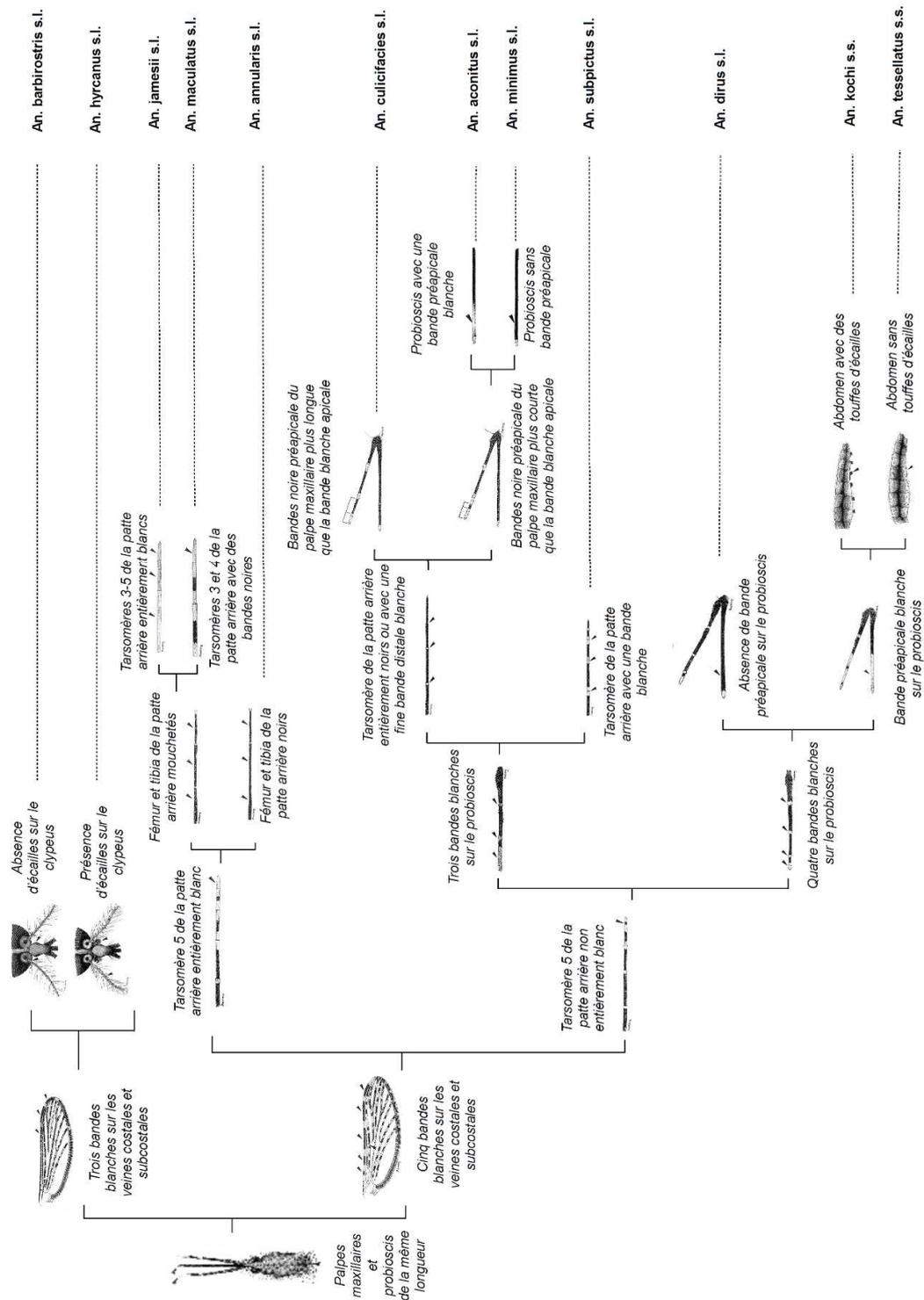
- White, N. J. (1996) 'The treatment of malaria', *N Engl J Med*, 335(11), pp. 800-6.
- White, N. J. (1997) 'Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo', *Antimicrob Agents Chemother*, 41(7), pp. 1413-22.
- White, N. J. (1998) 'Preventing antimalarial drug resistance through combinations', *Drug Resist Updat*, 1(1), pp. 3-9.
- White, N. J. (2004) 'Antimalarial drug resistance', *J Clin Invest*, 113(8), pp. 1084-92.
- White, N. J. (2008a) 'How antimalarial drug resistance affects post-treatment prophylaxis', *Malar J*, 7, pp. 9.
- White, N. J. (2008b) 'Qinghaosu (artemisinin): the price of success', *Science*, 320(5874), pp. 330-4.
- White, N. J. (2010) 'Artemisinin resistance--the clock is ticking', *Lancet*, 376(9758), pp. 2051-2.
- White, N. J. (2012) 'Counter perspective: artemisinin resistance: facts, fears, and fables', *Am J Trop Med Hyg*, 87(5), pp. 785.
- White, N. J. (2013a) 'Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in antimalarial dose optimization', *Antimicrob Agents Chemother*, 57(12), pp. 5792-807.
- White, N. J. (2013b) 'Primaquine to prevent transmission of falciparum malaria', *Lancet Infect Dis*, 13(2), pp. 175-81.
- White, N. J. (2017) 'Does antimalarial mass drug administration increase or decrease the risk of resistance?', *Lancet Infect Dis*, 17(1), pp. e15-e20.
- White, N. J. and Imwong, M. (2012) 'Relapse', *Adv Parasitol*, 80, pp. 113-50.
- White, N. J., Pongtavornpinyo, W., Maude, R. J., Saralamba, S., Aguas, R., Stepniewska, K., Lee, S. J., Dondorp, A. M., White, L. J. and Day, N. P. (2009) 'Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug resistance', *Malar J*, 8, pp. 253.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T. and De Wachter, R. (1993) 'Extraction of high molecular weight DNA from molluscs', *Trends Genet*, 9(12), pp. 407.
- Wirtz, R. A., Burkot, T. R., Graves, P. M. and Andre, R. G. (1987) 'Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea', *J Med Entomol*, 24(4), pp. 433-7.
- Wong, J., Bayoh, N., Olang, G., Killeen, G. F., Hamel, M. J., Vulule, J. M. and Gimnig, J. E. (2013) 'Standardizing operational vector sampling techniques for measuring malaria transmission intensity: evaluation of six mosquito collection methods in western Kenya', *Malar J*, 12, pp. 143.
- Wongsrichanalai, C., Sirichaisinthop, J., Karwacki, J. J., Congpuong, K., Miller, R. S., Pang, L. and Thimasarn, K. (2001) 'Drug resistant malaria on the Thai-Myanmar and Thai-Cambodian borders', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 32(1), pp. 41-9.
- Woodrow, C. J. and White, N. J. (2017) 'The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread', *FEMS Microbiol Rev*, 41(1), pp. 34-48.
- Woodruff, D. S. and L.M., T. (2009) 'The Indochinese - Sundaic zoogeographic transition: a description and analysis of terrestrial mammal species distributions.', *Journal of Bio geography* 30 pp. 569-580.
- World Health Organization (2007) *Anopheline Species Complexes in South and South-East Asia*.
- World Health Organization (2010) *Guidelines for the treatment of malaria*. 2nd edn. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (2013) *Larval source management, a supplemental measure for malaria vector control. An operational manual*. Geneva: W.H.O.
- World Health Organization (2015) *Mass drug administration, mass screening and treatment and focal screening and treatment for malaria*.: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/malaria/mpac/mpac-sept2015-erg-mda-report.pdf> (Accessed: 29/09/2017 2017).
- World Health Organization (2016) *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes* 56. Geneva: W.H.O. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250677/1/9789241511575-eng.pdf>.

- World Health Organization (2017a) *Entomology and vector control*. Geneva: World Health Organization. Available at: [http://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/en/](http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/en/).
- World Health Organization (2017b) *Malaria elimination*: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/malaria/areas/elimination/en/> (Accessed: 29/09/2017 2017).
- Xu, J. W., Liao, Y. M., Liu, H., Nie, R. H. and Havumaki, J. (2014) 'Use of bed nets and factors that influence bed net use among Jinuo Ethnic Minority in southern China', *PLoS One*, 9(7), pp. e103780.
- Ya-Umphon, P., Cerqueira, D., Parker, D. M., Cottrell, G., Poinsignon, A., Remoue, F., Brengues, C., Chareonviriyaphap, T., Nosten, F. and Corbel, V. (2017) 'Use of an Anopheles Salivary Biomarker to Assess Malaria Transmission Risk Along the Thailand-Myanmar Border', *J Infect Dis*, 215(3), pp. 396-404.
- Yekutieli, P. (1960) 'Problems of epidemiology in malaria eradication', *Bull World Health Organ*, 22, pp. 669-83.
- Yera, H., Filisetti, D., Bastien, P., Ancelle, T., Thulliez, P. and Delhaes, L. (2009) 'Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid', *J Clin Microbiol*, 47(12), pp. 3881-6.
- Young, M. D., Hardman, N. F., Burgess, R. W., Frohne, W. C. and Sabrosky, C. W. (1946) 'The Infectivity of Native Malarials in South Carolina to Anopheles Quadrimaculatus', *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-28(2), pp. 303-311.
- Zhu, L., Marshall, J. M., Qualls, W. A., Schlein, Y., McManus, J. W., Arheart, K. L., Hlaing, W. M., Traore, S. F., Doumbia, S., Muller, G. C. and Beier, J. C. (2015) 'Modelling optimum use of attractive toxic sugar bait stations for effective malaria vector control in Africa', *Malar J*, 14(1), pp. 492.
- Zingman, B. S. and Viner, B. L. (1993) 'Splenic complications in malaria: case report and review', *Clin Infect Dis*, 16(2), pp. 223-32.
- Zollner, G., Sattabongkot, J., Vaughan, J. A., Kankaew, P., Robert, L. L., Thimasarn, K., Sithiprasasna, R. and Coleman, R. E. (2016) 'LONGITUDINAL EVALUATION OF MALARIA EPIDEMIOLOGY IN AN ISOLATED VILLAGE IN WESTERN THAILAND: I. STUDY SITE AND ADULT ANOPHELINE BIONOMICS', *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 47(3), pp. 341-65.
- Zwang, J., Ashley, E. A., Karema, C., D'Alessandro, U., Smithuis, F., Dorsey, G., Janssens, B., Mayxay, M., Newton, P., Singhasivanon, P., Stepniewska, K., White, N. J. and Nosten, F. (2009a) 'Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine in falciparum malaria: a prospective multi-centre individual patient data analysis', *PLoS One*, 4(7), pp. e6358.
- Zwang, J., Olliaro, P., Barennes, H., Bonnet, M., Basseur, P., Bukirwa, H., Cohuet, S., D'Alessandro, U., Djimdé, A., Karema, C., Guthmann, J. P., Hamour, S., Ndiaye, J. L., Mårtensson, A., Rwagacondo, C., Sagara, I., Same-Ekobo, A., Sirima, S. B., van den Broek, I., Yeka, A., Taylor, W. R., Dorsey, G. and Randrianarivojosia, M. (2009b) 'Efficacy of artesunate-amodiaquine for treating uncomplicated falciparum malaria in sub-Saharan Africa: a multi-centre analysis', *Malar J*, 8, pp. 203.

# ANNEXE 1. ARBRE DECISIONNEL DE PRISE EN CHARGE DES PATIENTS AU POSTE PALU



# ANNEXE 2. CLE DICHOTOMIQUE SIMPLIFIEE UTILISEE POUR L'IDENTIFICATION DES ANOPHELES



# ANNEXE 3. VALEURS MOYENNES DES INDICATEURS ENTOMOLOGIQUES DE LA TRANSMISSION DU PALUDISME AVANT L'INTERVENTION

Résumé des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme dans les quatre villages de l'étude avant l'intervention

Village	Valeur de l'indicateurs pour le village indiqué (IC95)				
	TPH (p/p/m)	IS-Pf (‰)	IS-Pv (‰)	TIE-Pf (ip/p/m)	TIE-Pv (ip/p/m)
HKT*	166 (160-172)	1.8 (0.6-4.2)	7.2 (4.4-11.1)	0.3 (0.1-0.7)	1.2 (0.73-1.85)
KNH*	404 (383-427)	2.3 (0.5-6.6)	1.5 (0.2-5.5)	0.92 (0.19-2.69)	0.61 (0.07-2.22)
TOT*	44 (35-56)	0 (0-52.8)	0 (0-52.8)	0 (0-2.41)	0 (0-2.41)
TPN*	255 (247-263)	0.5 (0.1-1.8)	1.2 (0.4-2.9)	0.13 (0.02-0.46)	0.32 (0.1-0.74)
<b>Total</b>	<b>219 (215-224)</b>	<b>1.2 (0.6-2.2)</b>	<b>3.3 (2.2-4.8)</b>	<b>0.27 (0.13-0.49)</b>	<b>0.72 (0.48-1.05)</b>

IS : index sporozoïtaire, p/p/m : piqûre/personne/mois, pi/p/m : piqûre infectante/personne/mois, Pf : *Plasmodium falciparum*, Pv : *Plasmodium vivax*, TIE : taux d'inoculation entomologique, TPH : taux de piqûre humain.

\* HKT : 11 enquêtes (520 hommes.nuit de collection), KNH : 2 enquêtes (100 hommes.nuit de collection), TOT : 1 enquête (50 hommes.nuit de collection), TPN : 10 enquêtes (500 hommes.nuit de collection).

# ANNEXE 4. RESULTATS DES ANALYSES UNIVARIEES POUR LES MODELES DU TAUX D'INOCULATION ENTOMOLOGIQUES

Résultats des analyses univariées pour le modèle du taux d'inoculation entomologique de *P. falciparum*.

Variable	Catégorie	RR	IC95%	p-value
Village	TOT (référence)	1	-	-
	HKT	0.85	0.23 - 3.09	0.804
	KNH	0.68	0.21 - 2.24	0.53
	TPN	0.57	0.19 - 1.75	0.328
Saison	saison froide (référence)	1	-	-
	saison chaude	1.32	0.09 - 19.9	0.84
	saison des pluies	8.21	1.17 - 57.7	0.034
TPH (nb. piqûres/personne/mois)	0 – 90 (référence)	1	-	-
	90-150	0.13	0.02 - 0.74	0.022
	150 - 300	2.11	0.12 - 35.6	0.605
	300 - 750	17.08	1.95 - 149.44	0.01
	750 - 1500	29.96	3.16 - 284.47	0.003
	> 1500	13.49	1.48 - 122.92	0.021
Prévalence (%)	0 – 1 (référence)	1	-	-
	1 – 2.5	0.94	0.07 - 12.38	0.961
	2.5 – 5	2.61	0.46 - 14.82	0.28
	5 – 10	10.78	2.1 - 55.23	0.004
	> 10	11.78	3.07 - 45.27	0
Incidence (nb. cas / 1000 personnes / mois)	0 - 0.9 (référence)	1	-	-
	1 - 9	0.55	0.15 - 2.02	0.371
	10 - 20	2.78	0.65 - 11.81	0.166
	> 20	3.13	0.75 - 13.09	0.119
Période	avant (référence)	1	-	-
	pendant	0.7	0.09 - 5.75	0.741
	après	0.3	0.09 - 1.02	0.054
Couverture du TdM (≥1 dose) (%)	0 (avant) (référence)	1	-	-
	0 - 79	1.73	0.23 - 12.98	0.592
	80 - 100	0	0 - 0.07	0.005
	0 (après)	0.29	0.09 - 0.98	0.046

IC : intervalle de confiance, RR : risque relatif, TdM : traitement de masse, TPH : taux de piqûre humain.

**Résultats des analyses univariées pour le modèle du taux d'inoculation entomologique de *P. vivax*.**

Variable	Catégorie	RR	IC95%	p-value
Village	HKT (référence)	1	-	-
	KNH	0.72	0.19 - 2.72	0.628
	TOT	0.39	0.25 - 0.59	<0.0001
	TPN	0.17	0.07 - 0.4	<0.0001
Saison	saison froide (référence)	1	-	-
	saison chaude	2.7	1.15 - 6.37	0.023
	saison des pluies	2.53	0.89 - 7.25	0.083
TPH (nb. piqûres/personne/mois)	0 - 90 (référence)	1	-	-
	90 - 150	0.88	0.12 - 6.63	0.901
	150 - 300	3.88	0.95 - 15.86	0.059
	300 - 750	22.91	5.8 - 90.47	<0.0001
	750 - 1500	31.63	7.76 - 128.96	<0.0001
	> 1500	19.45	7.42 - 51	<0.0001
Prévalence (%)	0 - 2.5 (référence)	1	-	-
	2.5 - 5	1.88	0.2 - 18.02	0.584
	5 - 15	10.93	3.81 - 31.39	<0.0001
	15 - 20	4.71	1.2 - 18.56	0.027
	20 - 25	5.13	1.06 - 24.91	0.042
	> 25	14.31	2.89 - 70.93	0.001
Incidence (nb. cas / 1000 personnes / mois)	0 - 1 (référence)	1	-	-
	1 - 10	0.54	0.06 - 5.16	0.591
	10 - 20	0.4	0.18 - 0.9	0.027
	> 20	0.3	0.07 - 1.33	0.112
Période	avant (référence)	0.02	0.01 - 0.04	0
	pendant	0.24	0.05 - 1.27	0.094
	après	1.16	0.43 - 3.16	0.773
Couverture du TdM (≥1 dose) (%)	0 (avant) (référence)	1	-	-
	1 - 80	0.62	0.13 - 2.9	0.541
	80 - 100	0	0 - 0.44	0.034
	0 (après)	1.16	0.43 - 3.13	0.769
Couverture du TdM (3 doses) (%)	0 (avant) (référence)	1	-	-
	1 - 80	0.31	0.06 - 1.59	0.162
	80 - 100	0	0 - 0.01	0
	après	1.16	0.43 - 3.15	0.772

**IC** : intervalle de confiance, **RR** : risque relatif, **TdM** : traitement de masse, **TPH** : taux de piqûre humain.

## **Résumé :**

L'Asie du Sud-Est est un foyer historique de paludisme chimio-résistant particulièrement difficile à contrôler. Le développement de résistances à l'artémisinine chez *Plasmodium falciparum* justifie la mise en place d'une stratégie d'élimination rapide afin d'enrayer le phénomène. Cependant, la mise en évidence de villages *hotspots* (« points chauds ») où la majorité des infections sont asymptomatiques complique la tâche. Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une étude pilote multicentrique visant à évaluer l'efficacité du protocole Mahidol-Oxford d'élimination médicamenteuse ciblée (diagnostic et traitement précoce des cas symptomatiques incidents et élimination du réservoir asymptomatique dans les villages *hotspots* par le traitement de masse). Nous rapportons ici les résultats du volet entomologique de cette étude sur le site thaïlandais. Le principal résultat est la forte corrélation observée entre la prévalence de l'infection asymptomatique et le taux d'infection des vecteurs. Nous avons démontré que l'élimination du réservoir asymptomatique avec le traitement de masse permet d'interrompre rapidement le cycle de transmission de *P. falciparum*. Nous avons également confirmé la complexité des systèmes vectoriels en présence (nombreux vecteurs avec des caractéristiques biologiques et écologiques différentes) et l'importance de la transmission résiduelle dans la zone (seulement 35% des piqûres sont potentiellement prévenues par les moustiquaires). Ce travail a permis de générer des données importantes pour orienter la politique d'élimination mise en œuvre par les programmes nationaux. Les implications pour la lutte anti-vectorielle et des pistes de recherche ont été identifiées.

**Mots clés :** Asie du Sud-Est, Thaïlande, Myanmar, paludisme, résistance, artémisinine, traitement de masse, anophèles, transmission résiduelle, moustiquaires, insecticides, élimination, lutte anti-vectorielle.

## **Entomological determinants of malaria transmission along the Thai-Myanmar border in the context of Targeted Chemo-Elimination of *Plasmodium falciparum***

### **Abstract:**

South-East Asia is an historical foci of drug resistant malaria that is particularly difficult to control. The development of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* justifies to eliminate the parasite from the entire region in order to stop the spread of resistance. However, recent evidences of malaria transmission hotspots where the majority of infections are asymptomatic make the task even more difficult. This work is part of a multicentre pilot study aimed at assessing the efficacy of the Mahidol-Oxford targeted chemo-elimination protocol (early diagnosis and treatment of symptomatic cases and elimination of the asymptomatic reservoir of infection using mass drug administration). We report the results of the entomological part of this study performed on the Thai site. Our main result is the important correlation observed between the prevalence of asymptomatic malaria and the infection rate of malaria vectors. We have demonstrated that elimination of the asymptomatic reservoir of infection by mass drug administration lead to a rapid interruption of *P. falciparum* transmission cycle. We also confirmed the complexity of vectorial systems in presence (numerous vectors with different ecology and biology) and the importance of residual transmission (mosquito bed-nets fail to prevent 65% of the infective bites in the study area). This study has yielded important information to orientate elimination strategies implemented by national programs. Its implication for vector-control and research priorities have been identified.

**Keywords:** South-East Asia, Thailand, Myanmar, malaria, resistance, artemisinin, mass drug administration, anopheles, residual malaria transmission, bed-nets, insecticides, elimination, vector-control.