

# Caractérisation moléculaire des espèces plasmodiales sur 4 cycles de chimio-prévention du paludisme saisonnier dans la province du Tuy, au Burkina Faso

---

Domonbabele François de Sales HIEN<sup>1</sup>,  
Koudraogo Bienvenue YAMEOGO<sup>1\*</sup>,  
Franck Adama YAO<sup>1</sup>,  
Nimatou OUADIGABOU<sup>1</sup>,  
Jean marie OUATTARA<sup>1,2</sup>,  
Rakiswendé Serge YERBANGA<sup>1,2</sup>

## Résumé

**Introduction :** La chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS) est une stratégie de lutte contre le paludisme ciblant principalement *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), espèce la plus meurtrière. Le diagnostic du paludisme repose essentiellement sur la goutte épaisse (GE) et les tests de diagnostic rapides (TDR). Du fait de ces limites, la GE n'arrive pas toujours à détecter toutes les espèces parasitaires, notamment lorsqu'elles coexistent en faible densité avec *Plasmodium falciparum*. L'objectif de cette étude était de déterminer la présence d'autres espèces plasmodiales que *P. falciparum* dans une zone sous CPS dans la province du Tuy.

**Méthode :** Nous avons mené une étude expérimentale chez des enfants de 0 à 59 mois dans la province de Tuy au Burkina Faso ayant une GE positive à *P. falciparum* en microscopie et une température supérieure à 37,5°C. Des spots de sang sur papier Whatmann 3M ont été collectés pour l'analyse moléculaire des espèces plasmodiales par la PCR nichée.

**Résultats :** Au total, 57 enfants ont été sélectionnés avec un sex ratio H/F de 1,25. La prévalence globale de l'infection à *P. falciparum* était respectivement de 100 % avec une mono infection à *P. falciparum* de 96,5 % et une co-infection à *Plasmodium malariae* de 3,50 % dans la population d'étude.

**Conclusion :** Cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'une co-infection que la microscopie n'a pas pu révéler. L'utilisation de l'outil moléculaire s'avère donc indispensable pour mieux évaluer les stratégies de lutte contre le paludisme.

---

<sup>1</sup> Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CNRST)/Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) / Laboratoire de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires (LR-MIP) / Bobo-Dioulasso, BP 545, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

<sup>2</sup>Institut des Sciences et Techniques (INSTech Bobo) Avenue de Sya, 01 BP 2779, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, Tel 226 20 97 08 11.

\***Auteur correspondant :** Koudraogo Bienvenue YAMEOGO, Tel +22671706405 [yamkbienvue@yahoo.fr](mailto:yamkbienvue@yahoo.fr). ORCID :<https://orcid.org/0000-0003-3531-7377>

**Mots-clés** : chimio-prévention du paludisme saisonnier, *Plasmodium*, PCR nichée, Burkina Faso

## **Molecular characterization of Plasmodium species during 4 cycles of seasonal malaria chemoprevention in Tuy Province, Burkina Faso**

### **Abstract**

**Introduction:** Seasonal malaria chemoprevention (SMC) is a malaria control strategy targeting primarily *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), the deadliest species. Malaria diagnosis relies mainly on microscopic examination of thick and thin blood smears. Due to these limitations, microscopy method cannot detect all parasitic species, particularly when they coexist at low densities with *Plasmodium falciparum*. The objective of this study was to determine the presence of *Plasmodium* species other than *P. falciparum* in an area under SMC in the province of Tuy.

**Method:** We conducted an experimental study on children aged 0 to 59 months in the province of Tuy in Burkina Faso who had a thick smear positive for *P. falciparum* on microscopy and a temperature above 37.5°C. Blood spots on the Whatmann 3M paper were collected for molecular analysis of *Plasmodium* species by nested PCR.

**Results:** A total of 57 children were selected with a male-to-female sex ratio of 1.25. The overall prevalence of *P. falciparum* infection was 100% with a *P. falciparum* mono-infection rate of 96.5% and 3.5% for *Plasmodium. malarie* co-infection rate in the study population.

**Conclusion:** This study highlighted the presence of a co-infection that microscopy could not reveal. The use of the molecular tool is therefore essential to better evaluate malaria control strategies

**Keywords:** Seasonal malaria chemoprevention, *Plasmodium*, nested PCR, Burkina Faso

### **Introduction**

Malgré des décennies d'efforts de lutte contre le paludisme, elle reste endémique dans plusieurs parties du monde dont l'Afrique au sud du Sahara. En 2023, la région Afrique, cumulait à elle seule 94 % du nombre total des cas, et 95 % des décès associés au paludisme au niveau mondial selon les estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) (1). Les stratégies de lutte contre le paludisme ciblent essentiellement les personnes vulnérables, dont les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans. Au cours des dernières décennies, diverses interventions ciblant spécifiquement les enfants de moins de 5 ans ont été mises en œuvre. C'est ainsi que depuis 2012, l'OMS recommande la chimioprévention saisonnière du paludisme (CPS) dans le cadre des efforts mondiaux visant à éliminer le paludisme. La CPS consiste à l'administration mensuelle d'un cycle complet de sulfadoxine pyriméthamine (SP) et amodiaquine (AQ) aux enfants âgés de 3 à 59 mois pendant les 3 à 4 mois de la saison de haute transmission, quel que

soit le statut infectieux, dans le but de réduire la morbidité et la mortalité du paludisme (2). Le Burkina Faso est l'un des premiers pays au monde à avoir expérimenté avec succès la CPS à l'échelle nationale dans le cadre de son programme de lutte contre le paludisme. Introduite dans certains districts sanitaires en 2014, la campagne a été étendue de manière efficace au cours des trois années suivantes pour couvrir la quasi-totalité du pays (3). Cette stratégie cible principalement *P. falciparum*, l'espèce plasmodiale la plus répandue et la plus meurtrière. Bien que largement répandu dans les régions où le paludisme est endémique, y compris en Afrique subsaharienne, l'espèce *P. falciparum* n'est pas la seule. En effet, d'autres espèces ont été également détectées en plus de *P. falciparum* (4). Au Burkina, plusieurs études ont rapporté une forte présence de *P. ovale* et *P. malariae* dans la zone soudanienne (5) et la présence de *P. vivax* au centre du pays (6). Cependant, les informations sur l'épidémiologie du paludisme causé par les autres espèces de *Plasmodium* demeurent rares. Cette absence d'information pourrait être due à la non-détection de ces espèces lors du diagnostic car nécessitant une expertise des microscopistes. La microscopie est le principal outil de diagnostic du paludisme, complétée par les tests de diagnostic rapide (TDR). Leurs performances permettent de diagnostiquer les patients présentant une parasitémie allant jusqu'à 10 parasites/ $\mu$ L de sang (7). En raison de leur sensibilité, ils sont limités pour identifier toutes les espèces présentes lorsqu'elles sont en faible densité. Or, une évaluation complète des espèces parasitaires est nécessaire pour orienter les politiques en matière de lutte contre le paludisme. Nous nous sommes demandé, au cours de cette étude, quelle était la prévalence des différentes espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme dans un contexte d'implémentation de la CPS à l'ouest du Burkina Faso. L'objectif de cette étude était de rechercher, par la PCR nichée, la présence d'autres espèces plasmodiales en plus de *P. falciparum* dans une population sous CPS.

## **I. Matériel et méthodes**

### **Type et période et sites d'étude**

Nous avons mené une étude expérimentale sur des échantillons collectés en fin de campagne CPS notamment en novembre 2019, dans la province du Tuy à l'ouest du Burkina Faso. Le district Sanitaire de Houndé, chef-lieu de la province, a été le site de notre étude. Les échantillons ont été collectés dans les Centres de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) de Koumbia, Dougmato, Kari, Boni, Pe et Houndé.

## Population d'étude et échantillonnage

Notre population d'étude était constituée d'enfants de 0 à 59 mois ayant reçu la CPS lors des quatre cycles de passage (août à novembre 2019) et chez qui la présence de *P. falciparum* a été détectée par la microscopie. Pour être inclus dans l'étude, l'enfant devait être âgé de 0 à 59 mois, disposer d'un consentement éclairé signé par ses parents ou tuteurs légaux, avoir reçu l'ensemble des doses administrées lors des quatre cycles de la chimio-prévention saisonnière, avoir une température corporelle supérieure ou égale à 37,5 °C, présenter une infection à *P. falciparum* détectée uniquement par la microscopie.

Au cours de cette étude, des gouttes épaisses, des frottis minces et des spots de sang séchés ont été réalisés sur 2243 enfants inclus.

Les densités de parasites ont été calculées selon la technique standard (densité / $\mu$ L = nombre de parasites asexués X 8000/nombre de globules blancs comptés).

Les gouttes épaisses et frottis minces ont été examinés indépendamment par deux microscopistes qualifiés. En cas de divergence d'au moins 25 % dans les résultats, la lame était réexaminée par un troisième expert en microscopie.

## Analyse moléculaire des échantillons

L'ADN parasite a été extrait des confettis en utilisant les Kits QIamp DNA miniKit (Qiagen, Germany) selon les instructions du fabricant. Les confettis ont été obtenus en recueillant des gouttes de sang au bout du doigt directement sur le papier Whataman préalablement découpé et identifié. Après séchage à température ambiante toute la nuit dans un endroit propre et sec, ils ont ensuite été conservés dans le gel de silice. La caractérisation des espèces plasmodiales a été réalisée par la PCR nichée précédemment utilisée par Snounou *et al.*, (6). Il s'agit d'une méthode comprenant deux séries d'amplification successives basée sur la caractérisation du gène de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique nucléaire (ARNr), un gène multicopie possédant à la fois des domaines caractéristiques de chacune des quatre espèces plasmodiales du paludisme.

La première réaction a utilisé deux amorces spécifiques pour *Plasmodium* et les mammifères, rPLU5 et rPLU6. La deuxième réaction PCR comprend une amorce directe spécifique de *Plasmodium*, des amorces inverses spécifiques de chacune des quatre espèces recherchées. La première PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 $\mu$ L contenant 2  $\mu$ L d'ADN, 5,95  $\mu$ L de 5X FIREPol® Master Mix

Ready, de 0,5  $\mu\text{L}$  de chacune des amorces r PLU5, et rPLU6 à 5  $\mu\text{M}$  et de 16,05  $\mu\text{L}$  d'eau. L'amplification a suivi les étapes dénaturation à 94°C d'une durée de 5 min suivie de 30 cycles composés d'une étape de dénaturation de 1 min à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces sur l'ADN de 2 min à 58°C et d'une étape d'élongation de 5 min à 72°C. Ces cycles sont suivis d'une élongation finale de 5 min à 72°C et d'un refroidissement à 4°C. Pour la deuxième PCR spécifique de l'espèce plasmodiale, la composition du MIX et les cycles d'amplifications ont été les mêmes que celle de la première PCR.

### **Considérations éthiques**

L'étude a été conduite dans le strict respect des règles éthiques. Ainsi, avant le début de l'étude, une approbation éthique (No. 2015-5-56) a été obtenue auprès du comité d'éthique institutionnel de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS/CNRST), Burkina Faso. Un consentement libre, volontaire et éclairé a été obtenu chez chaque participant pour sa participation à l'étude.

### **Analyses statistiques**

Toutes les données ont été recueillies et saisies sur le logiciel Excel avant d'être exportées vers le logiciel R v4.4 pour l'analyse statistique. Les statistiques descriptives ont été complétées en utilisant les proportions pour les variables catégorielles, tandis que l'écart-type a été utilisé pour les variables quantitatives.

## **II. Résultats**

### **Caractéristiques socio-démographiques de la population d'étude**

Dans cette étude, 2777 enfants ont été recensés, 2243 enfants ont participé à l'enquête dite fin de campagne. Les enfants avec une GE positive ont été au nombre de 417, soit 18,6%. Au total, 57 enfants avec des températures supérieures à 37,5°C ont été identifiés. La population d'étude a été majoritairement masculine (55 %) avec un sex-ratio H/F de 1,25. L'âge minoritaire était de 03 mois et l'âge majoritaire de 59 mois. La température moyenne était de 38,5 °C avec un écart type moyen de 0,68.

### **La microscopie**

Les enfants ont présenté une densité parasitaire moyenne de 77 285 parasites/ $\mu\text{L}$ , avec une densité maximale ayant atteint 774 000 parasites/ $\mu\text{L}$  et une densité minimale de 240 parasites/ $\mu\text{L}$  de sang.

## La PCR

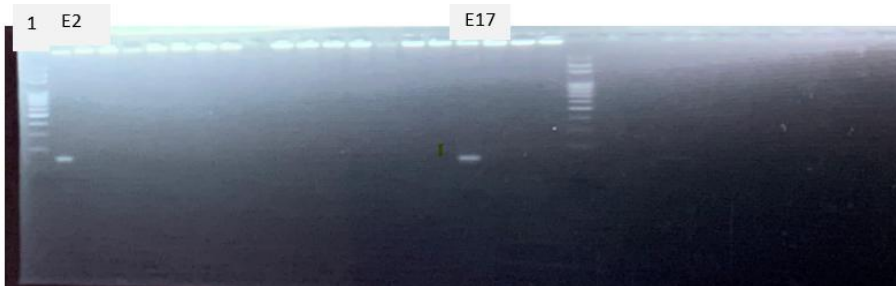
Sur les 57 échantillons qui ont été testés et passés en PCR nichée, 55 étaient positifs à une mono infection à *Plasmodium falciparum* ; 02 infections à *Plasmodium malariae* et à *Plasmodium falciparum*. Les autres espèces telles que *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax* n'ont pas été identifiées (tableau I).

**Tableau I** : Comparaison des résultats de la PCR nichée multiplex avec ceux de la microscopie dans la détection des espèces de *Plasmodium* dans la population d'étude.

Techniques	Espèces			
	Pf	Po	Pm	Pv
Microscopie	57	00	00	00
PCR nichée	57	00	02	00

Pf : *P. falciparum*, Po : *P. ovale*, Pm : *P. malariae*, Pv : *P. vivax*

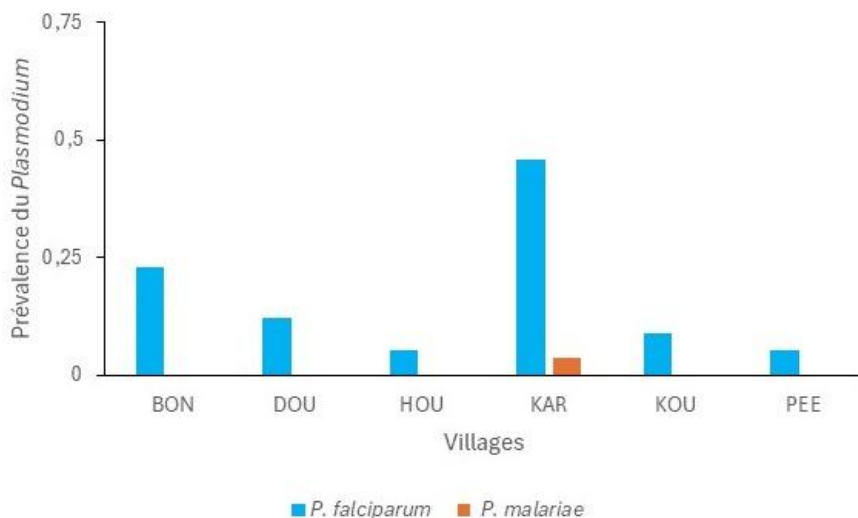
Deux prélèvements étaient positifs en PCR nichée multiplex, c'est-à-dire que la microscopie n'a pas permis de diagnostiquer. Le profil de l'amplification de ses deux échantillons sur un gel d'agarose à 2% après la PCR nichée est illustré par la figure 1.



**Figure 1** : profil de l'amplification des espèces plasmodiales sur un gel d'agarose à 2% après PCR nichée.

1 : marqueur 100pb, 2: contrôle positif *P.malariae*, E3-E16: échantillons négatifs ; E17: Echantillon positif *P.malariae*, E18-E20 négatifs  
E : échantillons

La prévalence des infections parasitaires a varié en fonction du site. La plus faible (5,26%) sur les sites de Houndé et de Pè et la plus élevée sur le site de KARI (45,60%). Les deux coinfection *P. falciparum* et *P. malariae* ont été identifiées sur le site de Kari (figure 2).



**Figure 2 :** Prévalence de l’infection palustre par village et selon l’espèce plasmodiale avec la PCR.

**BON :** Boni, **DOU :** Dougmato, **HOU :** Houndé, **KAR:** Kari, **KOU:**Koumbia, **PE :** Pe

### III. Discussion

Le but de la présente étude était de rechercher, par la PCR nichée, la présence d’espèces plasmodiales en plus de *P. falciparum* dans une population sous CPS. Il s’est agi de montrer que la PCR nichée a pu détecter la présence d’autres espèces plasmodiales en plus de *Plasmodium falciparum*. Dans notre étude, *P. falciparum* a été confirmé comme l’espèce parasitaire prédominante. Ce résultat est corroboré par plusieurs études similaires menées dans la même zone géographique et dans d’autres pays africains (6,9). Ainsi malgré l’administration de la CPS, *P. falciparum*, connu pour être l’espèce la plus mortelle des 5 espèces plasmodiales, persiste. Par conséquent, le paludisme reste un problème majeur de santé publique, notamment chez les enfants de 0 à 59 mois l’un des groupes les plus vulnérables.

La PCR nichée a révélé que 96,5 % (55/57) des échantillons analysés étaient exclusivement infectés par *Plasmodium falciparum* et 3,5 % (2/57) avaient une confection *P. falciparum/P. malariae*. Ce qui semble indiquer que la PCR nichée a permis de mettre en évidence la présence d’autres espèces que la microscopie n’a pas révélées. Ce résultat est similaire à ceux rapportés dans des études menées dans des régions à forte prévalence du paludisme en Afrique, notamment au Nigéria(10), au Ghana (11) , en Côte d’Ivoire (12). Ce résultat confirme les analyses moléculaires comme méthodes de choix dans le diagnostic du paludisme par rapport à la microscopie. En effet, la sensibilité et la

spécificité des méthodes PCR sont supérieures à celles de la microscopie et des tests de diagnostic rapide (TDR), la limite de détection de la PCR imbriquée a été fixée à seulement 0,2 parasites/ $\mu$ L. Il faut noter également que la différenciation microscopique sur frottis sanguin entre *P. falciparum* et *P. malariae* est réputée difficile (13).

Aussi, plusieurs études ont montré que *P. malariae* et *P. falciparum* (14) coexistent dans de nombreuses zones endémiques. En effet, dans d'autres régions d'Afrique subsaharienne, les infections mixtes impliquant ces deux espèces sont fréquentes (15). Bien que *P. malariae* soit une infection bénigne, elle pourrait fortement influencer la dynamique de la manifestation de *P. falciparum* par le biais d'une réponse immunitaire non spécifique et croisée (13,14) pouvant provoquer un syndrome néphrotique chronique.

La co-infection par *P. falciparum* et *P. malariae* est souvent associée à une diminution des manifestations cliniques du paludisme, notamment du risque de présenter de la fièvre lors de la consultation (5,16,17).

Dans cette étude, aucune infection à *P. ovale* et/ou à *P. vivax* n'a été retrouvée ni en mono infection, ni en co-infection avec d'autres espèces. Ce résultat diffère de ceux d'autres études qui ont mis en évidence la présence de ces deux espèces en Afrique (18), et au Burkina (6). Une explication possible de notre observation serait liée à la nature de l'approche PCR imbriquée utilisée pour le diagnostic des espèces. Etant donné que le premier cycle de PCR utilise des amorces qui amplifient une portion du gène CoxIII conservée chez les *Plasmodium* spp., suivi d'un cycle d'amplification spécifique à l'espèce, il est possible que la PCR1 amplifie principalement l'espèce dominante dans une infection mixte. Dans le cas d'infections symptomatiques, où la parasitémie de *P. falciparum* est élevée, il est possible que les niveaux relativement faibles de *P. ovale* ou de *P. vivax* ne soient pas détectés par ce test (19). L'absence de *P. vivax* peut également être expliquée par l'absence du récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax* chez les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif (18). Les populations d'Afrique subsaharienne étant exclusivement ou très majoritairement Duffy-négatives, expliquerait ainsi l'absence de *P. vivax* (19).

Aussi, ce résultat pourrait s'expliquer d'une part par la taille de notre échantillon qui ne serait pas suffisante pour détecter des différences entre la PCR et la microscopie. En effet, il a été démontré que la taille de l'échantillon affecte la précision et la fiabilité des résultats de l'étude sur les parasites, un échantillon plus grand permet de mieux estimer la prévalence et la diversité des espèces, notamment pour les parasites

rare ou les populations hétérogènes. Un échantillon de taille trop réduite peut ne pas refléter la diversité de la population parasitaire et entraîner une sous-détection des espèces plasmodiales présentes.

## **Conclusion**

Cette étude a montré que malgré l'administration de la CPS, le paludisme à *P. falciparum* demeure une réalité. Malgré ces limites, la PCR nichée s'est révélée plus performante que la GE, capable de détecter les infections submicroscopiques et de différencier avec précision les autres espèces plasmodiales. Ce résultat souligne l'importance de la PCR dans la lutte contre le paludisme. L'intégration de méthodes moléculaires les plus performantes possibles dans les programmes de surveillance pourrait améliorer la précision du diagnostic et le suivi de l'épidémiologie du paludisme.

## **Contributions des auteurs**

YKB, YRS ont drafté, KBY, YRS, YFA, HFD ont drafté toutes les versions de l'article. YKB, YFA, OJM ont participé au travail de terrain, à la collecte des données YKB, HFD, ON ont participé aux analyses de laboratoire, YKB, YRS, HFD ont participé à l'analyse des données.

## **Déclaration de conflits d'intérêts**

Aucune

## **Remerciements**

Nous remercions tous les parents et ou tuteurs qui ont participé à cette étude. Nous tenons également à remercier l'ensemble du personnel médical de la province du Tuy surtout ceux des villages de Boni, Dougmato, Kari, Koumbia, Houndé et Pè.

## **Références bibliographiques**

1. Organisation mondiale de la Santé. Rapport 2024 sur le paludisme dans le monde. 2024 [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2024-global-briefing-kit-fre.pdf?sfvrsn=affbbec7\\_4](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2024-global-briefing-kit-fre.pdf?sfvrsn=affbbec7_4)
2. Organisation mondiale de la Santé. Chimio-prévention du paludisme saisonnier par administration de sulfadoxine-

- pyriméthamine et d'amodiaquine aux enfants : guide de terrain. 2013. <https://iris.who.int/handle/10665/85727>
3. Chandramohan D, Dicko A, Zongo I, Sagara I, Cairns M, Kuepfer I, et al. Effect of adding azithromycin to seasonal malaria chemoprevention. *N Engl J Med*. 2019;380(23):1–10. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1811400>
  4. Holzschuh A, Gruenberg M, Hofmann NE, Wampfler R, Kiniboro B, Robinson LJ, et al. Co-infection of the four major *Plasmodium* species: Effects on densities and gametocyte carriage. *PLoS Negl Trop Dis* . 2022;16(9):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0010760>
  5. Gnémé A, Guelbéogo WM, Riehle MM, Tiono AB, Diarra A, Kabré GB, et al. *Plasmodium* species occurrence, temporal distribution and interaction in a child-aged population in rural Burkina Faso. *Malar J*. 2013;12(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-67>
  6. Christian TAHITA M, Kabore B, Traore O, Ilboudo H, Lompo P, Gricela Elodie SANON D, et al. Caractérisation moléculaire des espèces plasmodiales chez les femmes enceintes en consultation prénatale dans le district sanitaire de Nanoro, Burkina Faso. *Revus Science et Technique, Sciences de la Santé* . 2024;47(1):45–58. [https://revuesciences-techniquesburkina.org/index.php/sciences\\_de\\_la\\_sante/article/view/1528](https://revuesciences-techniquesburkina.org/index.php/sciences_de_la_sante/article/view/1528)
  7. Lazrek Y, Florimond C, Volney B, Discours M, Mosnier E, Houzé S, et al. Molecular detection of human *Plasmodium* species using a multiplex real time PCR. *Sci Rep*. 2023;13(1):0–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38621-9>
  8. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;58(2):283–92. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90050-8)
  9. Lingani M, Zango SH, Valéa I, Sanou M, Ouoba S, Samadoulougou S, et al. Prevalence and risk factors of malaria among first antenatal care attendees in rural Burkina Faso. *Trop Med Health* . 2022;50(1). <https://doi.org/10.1186/s41182-022-00442-3>
  10. Oriero EC, Olukosi AY, Oduwale OA, Djimde A, D'Alessandro U, Meremikwu MM, et al. Seroprevalence and parasite rates of

- Plasmodium malariae* in a high malaria transmission setting of southern Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2020;103(6):2208–16.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0593>
11. Amoah LE, Asare KK, Dickson D, Anang S fa, Busayo A, Bredu D, et al. Nationwide molecular surveillance of three *Plasmodium* species harboured by symptomatic malaria patients living in Ghana. *Parasit Vectors*. 2022;15(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05153-6>
  12. Miezan AJS, Gnagne AP, Bedia-Tanoh A V., Kone EGM, Konate-Toure AA, Angora KE, et al. Molecular epidemiology of non-falciparum *Plasmodium* infections in three different areas of the Ivory Coast. *Malar J*. 2023;22(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04639-7>
  13. Olivia Afa Achonduh, Aristid Herve Ekollo Mbage, Atogho-Tiedeu Barbara, Innocent Ali Mbulli, Daniel Achinko PMN and WFM. Predominance of *Plasmodium malariae-falciparum* Co-Infection by Molecular Speciation in Bangolan, North West Region of Cameroon. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1994;35(3):599–606. <https://doi.org/10.17265/1934-7391/2013.06.006>
  14. Mason DP, Mckenzie FE. Infection blood-stage dynamics and clinical implications of mixed *Plasmodium vivax-Plasmodium falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;61(3):367–74. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.367>
  15. Fi A, Kouevi C, Mylène I, Bayala C, Sondo P, Kaboré B, et al. Undetected *Plasmodium malariae* and *P. ovale* infections in HRP2 RDT- positive children with uncomplicated malaria in Nanoro, Burkina Faso. 2025; <https://doi.org/10.5281/zenodo.15965746>
  16. Oguike MC, Betson M, Burke M, Nolder D, Stothard JR, Kleinschmidt I, et al. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *Int J Parasitol*. 2011;41(6):677–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.004>
  17. Ouedraogo AL, Bousema T, Schneider P, Vlas SJ De, Ilboudosanogo E, Cuzin-ouattara N, et al. Substantial contribution of submicroscopical *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage to the infectious reservoir in an Area of seasonal transmission. *PLoS One*. 2009;4(12):8-12:e8410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008410>

18. Quaye IK, Aleksenko L, Oeuvray C, Yewhalaw D, Duah N, Gyan B, et al. The Pan African Vivax and Ovale Network (PAVON): Refocusing on *Plasmodium vivax*, *ovale* and asymptomatic malaria in sub-Saharan Africa. *Parasitol Int.* 2021;84:102415. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102415>
19. Bouyssou I, El Hoss S, Doderer-Lang C, Schoenhals M, Rasoloharimanana LT, Vigan-Womas I, et al. Unveiling *P. vivax* invasion pathways in Duffy-negative individuals. *Cell Host Microbe.* 2023;31(12):2080-2092.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.11.007>