

Article original

COMPARAISON DE LA GAMETOCYTOGENESE IN VIVO CHEZ LES SOUCHES DE PLASMODIUM FALCIPARUM CHLOROQUINO-SENSIBLES OU RESISTANTES.

BOUDIN C¹, LE HESRAN JY¹, RINGWALD P¹, GOUAGNA C², SAFELKUI I¹, MULDER B¹, VERHAVE JP²

RESUME

Lorsque *Plasmodium falciparum* souffre, il a tendance à dévier son cycle parasitaire vers la gamétocytogénèse. Toute souffrance entraînée par l'utilisation d'un médicament partiellement efficace sur des souches résistantes pourrait donc potentialiser le pouvoir gamétocyto-gène du parasite qui n'a pas été éliminé par la cure thérapeutique. Cette hypothèse a été étudiée en suivant la gamétocyto-génèse après accès palustres traités à la chloroquine en zone de forte chloroquino-résistance. Des sujets de tous les âges, atteints d'accès palustre ou présentant une forte densité parasitaire apparemment asymptomatique, mais sans gamétocyte à J0, ont été individualisés en 2 groupes (sensible et résistant) au vu de l'évolution de la parasitémie après traitement contrôlé par la chloroquine. Au total, 144 sujets ont été suivis. Une poussée gamétocytaire atteignant son maximum de densité ou de prévalence au 7ème jour après l'échec thérapeutique, a été observée chez les sujets résistants. Cette poussée n'a pas été significative chez les sujets sensibles. L'hypothèse émise au début de l'étude semble donc se confirmer. La «néogamétocyto-génèse» semble d'autant plus marquée que l'individu est jeune (< 3 ans). Ni le niveau de résistance in vivo (R1 ou R2), ni le fait d'être symptomatique ou non n'a semblé intervenir sur le déclenchement de cette poussée gamétocytaire.

Mots clés : Gamétocyto-génèse, *Plasmodium falciparum*, chloroquino-résistance.

SUMMARY

When *P. falciparum* is suffering, its life cycle is deviated towards gametocytogenesis. Therefore, the use of a partially efficacious drug on resistant strains, could lead to a parasite suffering and consequently, an increase of gametocytogenesis of the parasite which has not been eradicated by the treatment. This hypothesis has been studied by the follow up of gametocytogenesis after malaria attacks treated with chloroquine in a chloroquino resistant area. One hundred and forty four subjects, with malaria attack or heavy asymptomatic parasitaemia (>5000 p/mm³), were divided into 2 groups (sensitive and resistant) after a controlled treatment with chloroquine and after an in vivo follow up of 14 days. A high gametocytaemia was observed among resistant subjects. Its maximum of density and prevalence was observed at day 7th. This biological phenomenon was not significant among sensitive subjects cured by chloroquine. The hypothesis expressed at the beginning of the study seems to be confirmed. This «neogametocytogenesis» is preferentially observed in young children (<3 years), however, neither level of resistance, nor clinical symptomatology seem to be promoting factors.

Key words : Gametocytogenesis, *Plasmodium falciparum*, chloroquine resistance.

1. Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, ORSTOM/ LAF 302/OCEAC, BP 288, Yaoundé, Cameroun.
2. Department of medical parasitology, University of Nijmegen, BP 9101, 6500 HB, Nijmegen, Hollande.

INTRODUCTION

Lorsque *Plasmodium falciparum* se développe dans des conditions inadéquates, tant *in vitro* (Carter et Miller, 1979 ; Smalley et Brown, 1981) que *in vivo* (Kitchen et Putnam, 1942), il a tendance à produire



des gamétocytes. Ces gamétocytes apparaissent après le 7ème jour de souffrance *in vitro* et entre le 7ème et 10ème jour *in vivo* après l'accès palustre.

Compte tenu de ces observations, il est possible que le traitement de souches chloroquino-résistantes par la chloroquine, en faisant «souffrir» le parasite, sans le tuer, favorise la déviation du cycle asexué vers la gamétocytogénèse, en renforçant ainsi la transmission du paludisme résistant.

Peu de travaux ont abordé l'étude comparée de la gamétocytogénèse des souches chloroquino-résistantes ou sensibles et les résultats ont tous été différents. Dans certains cas, la gamétocytogénèse et/ou l'infektivité des souches chloroquino-résistantes sont augmentées par rapport aux souches sensibles (Ramkaran et Peters, 1969 ; Ichimori *et al.*, 1990 avec des *Plasmodium* de rongeurs ; et Robert *et al.*, 1995 avec *P. falciparum* chez l'homme). Dans d'autres cas, aucune différence significative n'est retrouvée (Hogh *et al.*, 1995).

Le déterminisme de la gamétocytogénèse *in vivo* est mal connu. Le pouvoir gamétocytogène des souches, la souffrance parasitaire (par mécanismes immunitaires, ou inflammatoires) et certainement bien d'autres facteurs, peuvent intervenir. Cette diversité du stimulus initial de la gamétocytogénèse peut expliquer les résultats contradictoires obtenus lors des études chez l'homme avec *P. falciparum*. Le problème reste donc entier et n'est pas sans conséquence sur le choix d'une politique médicamenteuse antipaludique en zone de forte chloroquino-résistance.

Dans cette étude préliminaire, nous avons suivi les densités parasitaires asexuées et sexuées, au décours d'accès palustres ou de fortes densités asymptomatiques, traités par la chloroquine chez des individus de différentes tranches d'âge.

MATERIEL ET METHODE

Choix des populations

Trois sites de forte chloroquino-résistance *in vivo* (plus de 40% chez les accès palustres de moins de 15 ans) ont été choisis dans la région du sud Cameroun. En zone urbaine (Yaoundé), l'échantillon de population était constitué d'accès palustres chez des adultes et des enfants de plus de 5 ans. Dans les villages de Mengang et Ebolowa, nous nous sommes adressés à la fois à des accès palustres et à de fortes charges

parasitaires apparemment asymptomatiques, dépistés dans les formations sanitaires, lors de visites systématiques à domicile, ou dans les écoles. A Mengang, il s'agissait essentiellement d'enfants de 5 à 15 ans (avec quelques nourrissons), tandis qu'à Ebolowa, il s'agissait de nouveau-nés, nourrissons et très jeunes enfants de moins de 5 ans. Cet échantillonnage dispersé nous a permis de rassembler toutes les tranches d'âge.

Seuls ont été inclus dans le suivi, les sujets ne présentant pas de gamétocytémie à J0.

Méthodologie

L'accès palustre a été défini par :

- une forte densité parasitaire de *P. falciparum* ($>$ ou $=$ à 5000 parasites/mm³);
- associée à une fièvre ($>$ 38°C) ;
- en l'absence d'une autre étiologie pyrogène.

Une forte charge parasitaire asymptomatique a été définie par une densité supérieure ou égale à 5000 *P. falciparum*/mm³, sans fièvre au moment de l'examen. Ces deux cas ont été traités à la chloroquine (25 mg/kg sur 3 jours en prise contrôlée) avec une surveillance parasitologique à J3, J7 et J14.

Les gouttes épaisses ont été lues à l'objectif x100 à immersion après coloration au Giemsa (10% dans du tampon PBS, 25 minutes). La densité parasitaire asexuée initiale a été estimée sur 200 globules blancs (seuil de lecture : 30 parasites/mm³). Les densités parasitaires post-thérapeutiques ont été estimées sur 1000 globules blancs (seuil de lecture 6 parasites/mm³). Les densités gamétocytaires ont été déterminées sur 3000 globules blancs (seuil de lecture 2 gamétocytes/mm³).

Analyse

Nous avons défini comme résistant tout sujet dont les densités parasitaires persistaient ou réapparaissaient à J7 et/ou J14 après traitement. Seuls les sujets négatifs à J7 et J14 ont été considérés comme sensibles.

Les sujets résistants ont été partagés en 3 classes. La classe des sujets résistants R1 (avec une parasitémie qui se négative après traitement à J3 et/ou J7 et se positive à J14). La classe des résistants R2 (avec une parasitémie qui reste positive après traitement, mais décroît de plus de 25% par rapport à J0 pour remonter à J14). Enfin la classe des résistants R3 (avec une parasitémie qui reste en plateau, de plus de 75% de la densité initiale ou qui continue à monter, obligeant à

un changement thérapeutique précoce). Le test *in vivo* sur 14 jours ne nous a pas permis d'identifier les R1 tardifs (réapparition des parasites après 14 jours en l'absence de réinfection). Ce groupe de résistants a donc été confondu avec les sujets sensibles.

Nous avons cherché à savoir si les prévalences et densités gamétoctaires variaient au cours du suivi post-thérapeutique, à partir de quel moment après le traitement elles étaient maximum et si cette variation se retrouvait quelque soit la tranche d'âge, quelque soit le niveau de résistance et quelque soit le tableau clinique (symptomatiques et «asymptomatiques»). Les comparaisons de prévalences ont été faites par un χ^2 (X2) ou un χ^2 corrigé de Yates (quand les effectifs théoriques étaient faibles) (Schwarz, 1963). Un risque alpha de 5% a été retenu et nous avons utilisé le logiciel statgraphics.

Les distributions de gamétoctémies n'étant pas normales, même après transformation, les comparaisons de moyennes ont été faites : soit par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) pour plus de 2 moyennes (bien que ce test ne prenne pas en compte le fait qu'il s'agisse de plusieurs mesures chez un même sujet) ; soit par un test des signes de Wilcoxon (W) pour 2 moyennes (qui tient compte de l'appariement), ou un test de Kolmogorov-Smirnov (KS) (sans appariement).

RESULTATS

Comparaison des densités et prévalences gamétoctaires, à J3, J7 et J14, chez les 2 groupes, résistant et sensible.

A J0, les répartitions : 1) des tranches d'âge (0-2, 3-4, 5-9, 10-15 et >15 ans), 2) des densités parasitaires (0,

1 à 1000, 1001 à 5000 et >5000 parasites/mm³) et 3) des sujets symptomatiques (fébriles) ou asymptomatiques (afébriles) n'ont pas présenté de différence significative entre les groupes résistants et sensibles. Seule la répartition de l'origine géographique a différencié. Ces 2 groupes sont donc comparables, avec une restriction pour l'origine géographique.

Les prévalences gamétoctaires sont significativement différentes entre les 3 jours du suivi post-thérapeutique chez les sujets résistants et ne le sont pas chez les sensibles (tableau I).

Les comparaisons 2 à 2 chez les résistants montrent une ascension significative des prévalences entre J3 et J7 ($X^2 = 7,38$ p < 0,01), mais pas de diminution significative entre J7 et J14 ($X^2 = 2,83$ p = 0,07).

Les densités gamétoctaires moyennes sont significativement différentes entre les 3 jours du suivi chez les sujets résistants. Elles restent relativement constantes entre J3, J7 et J14 chez les sensibles (tableau I).

Les comparaisons 2 à 2 des moyennes de J3, J7 chez les résistants montrent une augmentation significative de la gamétoctogénèse ($W = 1,67$ p < 0,05), mais pas de diminution significative entre J7 et J14 ($W = 0,39$ p = 0,15).

Il existe donc une poussée gamétoctaire transitoire à J7 chez les sujets résistants après traitement, poussée qu'on ne retrouve pas chez les sujets sensibles à la chloroquine.

Intervention des facteurs âge, niveau de résistance et symptomatologie sur le phénomène biologique chez les sujets résistants.

On observe, chez les résistants de la tranche d'âge la plus jeune (0-2 ans), une variation significative des

Tableau I

Evolution post-thérapeutique (J3, J7, J14) des densités moyennes et prévalences gamétoctaires chez les sujets résistants et sensibles à la chloroquine.

	Paramètres	J3	J7	J14	Comparaisons
résistants	effectif	71	71	71	
	moyenne	5,1	13,6	9,26	KW=10,0 p<0,01
	écart type	30,8	49,7	37,1	
	prévalence	30,9	53,5	39,4	X2=7,6 p<0,02
sensibles	effectif	73	73	73	
	moyenne	5,9	2,4	0,9	KW=1,0 NS
	écart type	37,6	9,7	3,1	
	prévalence	10,9	16,4	13,6	X2=1,7 NS

prévalences et densités gamétoctaires moyennes, avec un maximum significatif au 7^{ème} jour. Pour les tranches d'âge plus élevées, ce phénomène n'est plus significatif (tableau II).

Les prévalences et densités gamétoctaires moyennes ne sont pas significativement différentes entre les

3 jours de suivi, aussi bien chez les sujets résistants R1 que chez les sujets R2, sauf, de manière surprenante, en matière de prévalence gamétoctaire chez les R1 (tableau III). Nous n'avons pas assez d'effectif pour tirer des conclusions chez les résistants R3.

Tableau II

Evolution post-thérapeutiques (J3, J7, J14) des densités moyennes et prévalences gamétoctaires en fonction de l'âge chez les sujets résistants.

Tranches d'âge	Paramètres	J3	J7	J14	Comparaisons
0-2 ans	effectif	18	18	18	
	moyenne	15,6	33	15,3	KW=7,9 (p<0,05)
	écart type	61,4	92,7	48,8	
	prévalence	33,3	72,2	66,6	X2=35,3 (p<0,05)
3-4 ans	effectif	11	11	11	
	moyenne	00,7	3,8	3,9	KW=0,6 NS
	écart type	1,4	7,2	10,4	
	prévalence	27,2	36,3	36,3	X2=4,9 NS
5-9 ans	effectif	16	16	16	
	moyenne	1,8	3,2	2	KW=3,0 NS
	écart type	4,1	4,4	4,4	
	prévalence	31,2	56,2	25	X2=4,4 NS
10-15 ans	effectif	13	13	13	
	moyenne	1,9	10,7	4,4	KW=1,8 NS
	écart type	3,4	20,3	7,2	
	prévalence	30,7	53,8	46,1	X2=5,4 NS
> 15 ans	effectif	13	13	13	
	moyenne	1,8	10,8	19,3	KW=1,1 NS
	écart type	4,4	30,3	64,9	
	prévalence	30,7	38,3	15,3	X2=2,3 NS

Tableau III

Evolution post-thérapeutiques (J3, J7, J14) des densités moyennes et prévalences gamétoctaires en fonction du degré de chloroquino-résistance.

	Paramètres	J3	J7	J14	Comparaisons
R1	effectif	24	24	24	
	moyenne	13,1	23,7	11,7	KW=4,9 NS
	écart type	52,7	81,5	42,7	
	prévalence	41,6	70,6	37,5	X2=6,3 p<0,05
R2	effectif	43	43	43	
	moyenne	1	7,3	8,3	KW=4,6 NS
	écart type	2,6	18,2	35,9	
	prévalence	23,2	39,5	34,9	X2=2,7 NS
R3	effectif	4	4	4	

Une poussée gamétocytaire s'observe à J7 chez les sujets asymptomatiques apparents, mais seulement en ce qui concerne les densités gamétoctaires moyennes (tableau IV). On ne retrouve pas ce phénomène chez les sujets symptomatiques (tableau IV).

DISCUSSION

Nos résultats indiquent qu'il existe très vraisemblablement une augmentation de la gamétocyto-génèse 7 jours après le traitement de l'accès palustre ou de la forte charge parasitaire «asymptomatique», chez les sujets résistants. Cette poussée gamétocytaire est suivie par une légère diminution ou une stabilité des prévalences et densités gamétoctaires au 14^{ème} jour. Ce phénomène biologique ne semble pas s'observer chez les sujets sensibles.

Robert *et al.* (1995) reprenant la lecture de tests *in vivo* de 14 jours, faits à Dakar (n = 68), ont suivi la gamétocyto-génèse chez les sujets chloroquino-résistants et sensibles. Ils ont observé une forte gamétocyto-génèse chez les sujets résistants, à J7 et J14 après traitement.

L'étude de Hogh *et al.* (1995) au Mozambique rend compte d'un test *in vivo* à la chloroquine de 28 jours, chez 45 enfants. Les prévalences et densités gamétoctaires ont diminué au cours du suivi post-thérapeutique et la décroissance gamétoctaire n'a été patente qu'au 14^{ème} jour. Les auteurs n'ayant pas différencié les sujets résistants et sensibles, il est possible qu'une éventuelle poussée gamétoctaire du 7^{ème} jour, chez les sujets résistants, ait été masquée par l'amalgame des sujets sensibles et résistants.

Certaines publications ont démontré le rôle potentiellement gamétoctogène de quelques médicaments antipaludiques comme la pyriméthamine, le proguanil et la sulfadoxine-pyriméthamine (Findlay *et al.*, 1946 ; Mackerrazs et Ercole, 1947 ; Shute et Maryon, 1951 ; Ramakrishnam *et al.*, 1952). Mais la chloroquine n'est pas un médicament gamétoctogène. Au contraire, cette molécule tue les stades de maturation précoce des gamétoctes, au même titre que les formes asexuées (Strickland *et al.*, 1986 ; Smalley, 1977). Donc la poussée gamétoctaire observée à J7 et se prolongeant à J14 n'est pas due à une action gamétoctogène du médicament prescrit. *In vitro*, les gamétoctes de *P. falciparum* requièrent 7 à 10 jours pour atteindre leur maturité (stade V) (Smalley, 1976 ; Jensen, 1979). *In vivo*, les stades immatures du gamétoctes (I à IV) se développent dans les organes profonds et seuls les stades mûrs (V) apparaissent dans la circulation générale, habituellement 7 à 10 jours après la poussée parasitaire asexuée qui leur a donné naissance (Carter et Gwadz, 1980). Compte tenu des propriétés de la chloroquine sur les gamétoctes et du délai d'apparition des gamétoctes mûrs dans le sang circulant (7-10 jours), la poussée gamétoctaire de J7, observée uniquement chez les sujets chloroquino-résistants, a vraisemblablement pour origine la souffrance des souches résistantes. La «néogamétoctogénèse» observée chez les résistants à la chloroquine semble d'autant plus nette que l'enfant est plus jeune (essentiellement dans les tranches d'âges de moins de 3 ans). Les tranches d'âge 6 mois 2 ans et 3-4 ans sont classiquement :

Tableau IV

Evolution post-thérapeutiques (J3, J7, J14) des densités moyennes et prévalences gamétoctaires en fonction du tableau clinique.

Paramètres	J3	J7	J14	Comparaisons	
< 38°	effectif	36	36	36	
	moyenne	8,2	17,6	9	KW=6,5 p<0,05
	écart type	43,2	66,6	35	
prévalence	25	50	4732	X2=5,6 NS	
≥ 38°	effectif	35	35	35	
	moyenne	2	9,5	9,5	KW=5,0 NS
	écart type	4,1	21,9	39,6	
	prévalence	37,1	57,1	31,4	X2=5,2 NS

- les plus exposées aux fortes charges parasitaires (McGregor *et al.*, 1956) ;

- constituent habituellement le réservoir infectant le plus important pour les moustiques (Githeko *et al.*, 1992) ;

- présentent généralement les plus forts niveaux de résistance, parce que l'immunoprotection antipalustre, encore insuffisamment efficace, ne peut potentialiser l'effet partiel du médicament (Bjorkman, 1988).

Le traitement par la chloroquine de ce groupe de très jeunes sujets, en zone de forte chloroquino-résistance, risque donc d'entraîner une «néogamétocytogénèse» des souches essentiellement résistantes, et donc une dispersion accélérée de la chloroquino-résistance par les moustiques vecteurs.

De manière surprenante, la poussée gamétocytaire post-thérapeutique se retrouve chez les sujets apparemment asymptomatiques à forte charge parasitaire, mais pas chez les sujets symptomatiques (en accès palustre). Pourtant ces 2 groupes semblent identiques. Une forte parasitémie apparemment asymptomatique au moment de l'examen pourrait très bien se révéler un véritable accès palustre si nous avons pris la température un peu avant ou un peu après. Cette observation est sans conséquence sur le plan épidémiologique puisque en zone de transmission, la chloroquine est largement consommée, en dehors de toute vérification parasitologique, chez tout sujet présentant même un simple mal de tête et quelques malaises mal identifiés.

La forte gamétocytémie post-thérapeutique à 7 jours, observée uniquement chez les sujets résistants peut donc poser un problème de santé publique dans les zones à forte chloroquino-résistance. Encore faut-il démontrer que cette poussée gamétocytaire est bien infectante pour le moustique. Le problème de la «néogamétocytogénèse» post-thérapeutique prendrait alors une dimension véritablement catastrophique et pourrait expliquer la rapidité d'extension de la chloroquino-résistance, essentiellement de type R1-R2, dans certaines zones.

BIBLIOGRAPHIE

1- Bjorkman A. Interactions between chemotherapy and immunity to malaria. *Prog Allergy* 1988 ; 41 : 331-56.

2- Carter R, Miller LH . A method for the study of gametocytogenesis by *Plasmodium falciparum* in culture : Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis. *Bull WHO* 1979 ; 57 : suppl. 38-67.

3- Carter R, Gwadz RW. Infectiousness and gamete immunization in malaria. In «Malaria, III Immunology and immunization», Kreier JP Ed, Acad Press, New York 1980 ; 263-97.

4- Findlay GM, Maegraith BG, Markson JL, Holden JR . Investigations in the chemotherapy of malaria in West Africa. V. Sulphonamide compounds. *Ann Trop Med Parasitol* 1946 ; 40 : 358-67.

5- Githeko AK, Brandling-Bennett AD, Beier M, Atieli F, Owaga M, Collins FH . The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of Western Kenya. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992 ; 86 : 355-8.

6- Hogh B, Thompson R, Hetzel C, Fleck SL, Kruse NAA, Jones I, Dgedge M, Barreto J, Sinden RE . Specific and nonspecific responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage parasites and observations on the gametocytaemia in schoolchildren living in a malaria-endemic area of Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; 52 : 50-9.

7- Ichimori , Curtis CF, Targett GAT . The effects of chloroquine on the infectivity of chloroquine-sensitive and -resistant populations of *Plasmodium Yoelli nigeriensis* to mosquitoes. *Parasitology* 1990 ; 100 : 377-81.

8- Jensen JB . Observations on gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* from continuous culture. *J Protozool* 1979 ; 26 : 129-32.

9- Kitchen SF, Putman P . Observations on the mechanism of the parasite cycle in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med* 1942 ; 22 : 361-86.

10- McGregor IA, Gilles HM, Walters JH, Davies AH, Pearson FA . Effects of heavy and repeated malarial infections on Gambian infants and children : Effects of erythrocytic parasitization. *British Med J* 1956 ; 2 : 686-92.

11- Mackerras MJ, Ercole ON . Observations on the action of Paludrine on malarial parasite. II. The action of Paludrine on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1947 ; 41 : 365-76.

12- Ramakrishnan SP, Young MD, Jeffery GM, Burgess RW, McLendon SB . The effects of single

- and multiple doses of Paludrine upon *Plasmodium falciparum*. *Am J Hyg* 1952 ; 55 : 239-45.
- 13- Ramkaran AE, Peters W. Infectivity of chloroquine resistant *Plasmodium berghei* to *Anopheles stephensi* enhanced by chloroquine. *Nature* 1969 ; 223 : 635-6.
- 14- Robert V, Molez JF, Trape JF. Gametocytes, chloroquine pressure and the relative advantage of resistant strains of *falciparum* malaria in West Africa. *Am J Trop Med Hyg* (à paraître).
- 15- Schwarz D. «Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes». *Ed Med Flammarion*, Paris, 1963 ; 318 pp.
- 16- Shute PG, Maryon M. A study of gametocytes in a West African strain of *Plasmodium falciparum*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1951 ; 44 : 421-38.
- 17- Smalley ME. *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis *in vitro*. *Nature* 1976 ; 264 : 271-2.
- 18- Smalley ME. *Plasmodium falciparum* gametocytes : The effect of chloroquine on their development. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1977 ; 71 : 526-9.
- 19- Smalley ME, Brown J. *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1981 ; 75 : 316-7.
- 20- Strickland GT, Fox E, Sarwar M, Khaliq AA, McDonald M. Effects of chloroquine, amodiaquine and pyrimethamine-sulfadoxine on *Plasmodium falciparum* gametocytaemia. *Am J Trop Med Hyg* 1986 ; 35 : 259-62.