WHO EMRO | Caractérisation génétique du sous-groupe Maculipennis (Diptera : Culicidae) au Maroc : u

PDF version

Bouchra Trari[1, 2] et Mohamed Dakki[3]

التوصيف الجيني لزميرة مبقعات الجناح (فصيلة البعوضيات) في المغرب : أداة أساسية لمكافحة الملاريا

بشرى اطراري، محمد داكي

الخلاصة : تعد بعوضة (1926 Falleroni labranchiae Anopheles) إحدى أعضاء زميرة مبقعات الجناح، وظلت لفترة طويلة سبباً في انتقال عدوى الملاريا المتصورة النشيطة، التي توطنت في المغرب حتى عام 2010. وتؤدي عوامل تغير المناخ وتزايد السفر الدولي ووجود ناقل العدوى بصورة دائمة إلى زيادة مخاطر عودة الملاريا للظهور . وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد إمكانية وجود أعضاء آخرين لزميرة مبقعات الجناح في المغرب، باستخدام تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR) بين البعوض المجمّع في عدة مناطق، والتي اختيرت وفقاً لنوع المخاطر حسبما حددته وزارة الصحة . وتم تحليل 86 عينة من البعوض باستخدام تضخيم تفاعل البوليميراز التسلسلي لسلسلة الحمض الريبي ITS2. وقورنت سلاسل مفساح ITS2 للبعوض بسلاسل 7 أنواع من زميرة مبقعات الجناح المتاحة في بنك الجينات . وتؤكد النتائج المستقاة وجود الأنوفيلة اللابرانكية باعتبارها الممثل الوحيد لهذه الزميرة في المغرب . ومن باب نقل التكنولوجيا، أتيحت للمرة الأولى إجراءات استخلاص الحمض النووي وتضخيمه، حيث إن هذه الطريقة لا تزال غير معروفة لدى عدد من المختبرات المغربية .

RÉSUMÉ Le complexe maculipennis a été incriminé dans la transmission du paludisme, endémique au Maroc jusqu'en 2010. Le réchauffement climatique, l'intensification des voyages internationaux et la présence des vecteurs constituent un risque de réémergence de la maladie. L'étude a tenté d'identifier par PCR (Polymerase Chain Reaction), le complexe maculipennis dans plusieurs régions du Maroc, choisies en se basant sur la notion de risque. Quatre-vingt six (86) spécimens de moustiques ont été analysés en utilisant l'amplification par PCR de la séquence ITS2 (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique. Les séquences ITS2 des moustiques ont été comparées à celles des 7 espèces du groupe Maculipennis, disponibles dans GenBank. Les résultats obtenus confirment la présence d'An. labranchiae Falleroni, 1926. Aussi, dans un souci de transfert de technologie,les étapes d'extraction d'ADN et d'amplification sont exposées pour la première fois, en détail, étant donné que la PCR reste encore inconnue dans plusieurs laboratoires périphériques marocains.

Genetic characterization of the Anopheles maculipennis complex (Diptera:

1 / 10

Culicidae) in Morocco: a fundamental tool for malaria control

ABSTRACT The Anopheles maculipennis complex has been implicated in the transmission of malaria, which was endemic in Morocco until 2010. Climate change, intensification of international travel and the permanent presence of the vector increase the risk of malaria re-emergence. Using polymerase chain reaction assay (PCR), this study attempts to identify the possible presence of the Maculipennis complex in several areas of Morocco, based on the concept of risk. Eighty-six mosquito specimens were analyzed using PCR amplification of the ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) sequence of ribosomal DNA. The ITS2 sequences of the mosquitoes were compared to those of the 7 species of the Maculipennis complex available in GenBank. The results obtained confirm the presence of Anopheles labranchiae. In order to enable technology transfer, DNA extraction and amplification steps are presented for the first time in detail, given the fact that the technique is still unknown to several Moroccan peripheral laboratories.

[1]Unité de Recherche et Développement, Institut Supérieur des Professions infirmières et Techniques de Santé, Rabat (Maroc) (Correspondance à adresser à : btrari@hotmail.com). [2]Laboratoire de Zoologie et Biologie Générale, Faculté des Sciences, Université Mohamed V, Rabat (Maroc).
[3]
Département de Zoologie et Écologie animale, Institut Scientifique, Université Mohamed V, Rabat (Maroc).

Reçu : 14/06/15 ; accepté : 6/03/17

Introduction

La lutte antivectorielle reste le principal moyen de réduire la transmission du parasite responsable du paludisme, mais son succès repose en grande partie sur une bonne connaissance du vecteur.

La plupart des vecteurs de Plasmodium appartiennent à des complexes d'espèces (1), groupes ou sous-groupes, dont les membres sont morphologiquement identiques mais génétiquement distincts (espèces jumelles) et peuvent présenter des différences écologiques et comportementales qui se répercutent souvent au niveau épidémiologique.

Depuis la mise au point des techniques de biologie moléculaire (2), l'étude du polymorphisme des populations anophéliennes par PCR (Polymerase Chain Reaction – réaction de polymérisation en chaîne) n'a pas cessé de prouver son efficacité pour l'étude des populations de vecteurs, aussi bien en région afrotropicale (complexe Anopheles gambiae) (3,4) qu'en région paléarctique (sous-groupe Maculipennis) pour les régions qui nous intéressent (5), pour devenir actuellement une technique de routine dans la plupart des laboratoires d'entomologie médicale à travers le monde.

Au Maroc, où le dernier cas de paludisme autochtone à Plasmodium vivax a été enregistré en 2004 (6) et l'élimination a été certifiée par l'Organisation mondiale de la Santé en 2010 (7), la transmission était essentiellement due à An. labranchiae Falleroni, 1926, membre du sous-groupe Maculipennis. Celui-ci a été le premier « complexe d'espèces » à avoir été découvert parmi les moustiques (8,9). L'identification morphologique précise des membres de ce sous-groupe reposait sur l'ornementation des œufs (10). Ces derniers présentent toutefois une importante variabilité au sein d'une même espèce, voire d'une même descendance, ce qui parfois peut rendre l'identification impossible. Il en est de même pour l'analyse morphologique des stades larvaires, nymphaux et imaginaux (10,11). La « variété » An. sicaulti, décrite au Maroc près de Rabat par Roubaud (12), illustre bien la confusion qui peut avoir lieu à propos de ce sous-groupe (13-16). Depuis le travail de White qui reconnaissait neuf espèces (16), de nombreux changements ont été opérés et concernent aussi bien l'appellation du sous-groupe Maculipennis (complexe, groupe, sous-groupe) que le nombre et le statut des espèces qui le composent. À l'heure actuelle, et selon la dernière classification (17,18), dix espèces du sous-groupe Maculipennis sont officiellement reconnues : An. artemievi, An. atroparvus, An. daciae, An. labranchiae, An. maculipennis, An. martinius, An. melanoon, An. messeae, An. persiensis et An. sacharovi.

Au Maroc, la nécessité d'étudier la structure génétique des populations naturelles des membres du sous-groupe Maculipennis a déjà été soulignée (19). Des études génétiques récentes montrent la présence d'An. labranchiae comme seul représentant du sous-groupe Maculipennis (20,21). Cependant, dans le contexte actuel des changements climatiques et de l'adaptation de nouvelles espèces, la présence éventuelle d'autres espèces n'est pas à exclure, puisque certaines espèces du sous-groupe Maculipennis sont déjà signalées dans les pays voisins. Il s'agit de la présence d'An. sacharovi en Algérie (22) et d'An. atroparvus en Espagne (23). Cette dernière espèce est très fréquente dans les rizières et les zones irriguées (1) et figure parmi les plus importants vecteurs de Plasmodium susceptibles d'étendre leur aire de distribution géographique (24). Il a été prouvé que les stratégies d'aménagement de l'environnement telles que l'irrigation peuvent augmenter le risque de transmission de Plasmodium (25).

Le principal objectif de ce travail est l'identification précise du sous-groupe Maculipennis au Maroc, au sein de trois régions représentatives des situations épidémiologiques du paludisme dans le pays telles que définies par le ministère de la Santé, en vue d'y rechercher la présence d'autres représentants susceptibles de transmettre le Plasmodium. Aussi, étant donné que la technique PCR est encore inconnue dans la plupart des laboratoires périphériques qui assurent la surveillance entomologique dans le cadre du programme de lutte antipaludique, les étapes de la PCR sont exposées en détail, dans un souci de transfert de technologie.

Méthodes

Choix de la zone d'étude

Tenant compte du risque de transmission du Plasmodium, le choix des sites étudiés a été effectué en fonction de la classification établie par le ministère de la Santé (26) et permettant de distinguer trois zones : haut risque, risque potentiel et faible risque. Cette stratification repose sur les données épidémiologiques (notification récente de cas de paludisme autochtone), mais aussi sur les notions de réceptivité (abondance des gîtes anophéliens, présence et densité du vecteur) et de vulnérabilité (mouvement des populations en relation avec les régions ou les pays à risque) qui sont les deux critères de base pour définir le « potentiel paludogène » d'une région. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les données des foyers récents et anciens (27), sur la répartition anophélienne déjà connue du sous-groupe Maculipennis (28) ainsi que sur les informations obtenues sur les zones de migration de population et d'aménagement hydroagricole à risque (29). Trois chantiers géographiques correspondant à 12 provinces ont alors été retenus dans ce travail (Figure 1).

1) Région nord

Zone à haut risque de paludisme : province de Chefchaouen

Zone à risque potentiel de paludisme : provinces de Larache et Khémisset

Zone à faible risque de paludisme : provinces de Meknès, Oujda, Rabat et Tétouan

2) Région centre

Zone à haut risque de paludisme : province de Khouribga

Zone à risque potentiel de paludisme : province de Settat

Zone à faible risque de paludisme : province de Marrakech

3) Région sud

Zone à risque potentiel de paludisme : province d'Ouarzazate

Zone à faible risque de paludisme : province de Tiznit

Échantillonnage des moustiques

Les anophèles ont été prélevés lors de campagnes d'échantillonnage (larves et adultes) réalisées entre février 2004 et septembre 2005. Pour la région de Rabat, les prélèvements ont eu lieu entre décembre 2003 et septembre 2004. Les prélèvements larvaires, de type semi-quantitatif, ont été effectués à l'aide d'un filet Langeron et le nombre de coups de filet a été variable selon la superficie du gîte. Les adultes ont été capturés manuellement au repos, à l'intérieur des habitations humaines ou des abris pour animaux, à l'aide d'aspirateurs à bouche.

Identification morphologique et conservation des anophèles

Les moustiques récoltés ont été identifiés sur la base de critères morphologiques (31), puis les spécimens triés du sous-groupe Maculipennis ont été conservés pour une identification plus précise à l'aide d'outils de biologie moléculaire. Chaque spécimen adulte a été sectionné en deux parties, conservées séparément, l'une comprenant l'abdomen ainsi que les pattes et les ailes du moustique servant pour les analyses PCR et l'autre le reste du corps (tête et thorax) pour des tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) repas de sang. Les larves ont été conservées dans de l'alcool à 70° et les adultes ont été gardés en présence d'un dessicateur (gel de silice).

Extraction de l'ADN

Pour les larves d'anophèles, chaque spécimen entier a été individuellement broyé dans 200 µL de CTAB 2 % (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide – bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium) préalablement préparé et conservé à température ambiante. Après cinq minutes au bain-marie à 65 °C, ce broyat a été mélangé par inversion avec 200 µL de chloroforme puis centrifugé pendant cinq minutes à 12 000 tr/min, à température ambiante (25 °C). La phase

supérieure a été prélevée et mise dans un autre tube, puis 200 µL d'isopropanol ont été ajoutés à ce surnageant ; le tout a été bien mélangé par inversion avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 12 000 tr/min, à température ambiante. Par la suite, l'isopropanol a été éliminé et égoutté, puis remplacé par de l'éthanol à 70 % et le nouveau mélange a été centrifugé pendant cinq minutes à 12 000 tr/min, à température ambiante. Après élimination de l'éthanol, le culot ainsi obtenu a été séché pendant cinq minutes au SpeedVac®, repris dans 20 µL d'eau stérile et enfin gardé toute la nuit à température ambiante avant d'être dilué au 1/50e pour être analysé par PCR.

Pour les adultes, la PCR a été réalisée sans extraction d'ADN préalable mais directement sur les pattes de moustiques (technique d'usage au Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles [LIN] de Montpellier, non publiée).

Amplification PCR

La région ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) de l'ADN ribosomal a été amplifiée par PCR, en utilisant les amorces décrites par Proft et al. (5). Les conditions de PCR ainsi que le programme d'amplification de l'ADN se sont déroulés conformément aux protocoles d'usage au LIN de Montpellier. Pour les anophèles adultes, une patte issue de chaque spécimen a été directement utilisée pour l'amplification de l'ADN. Concernant les larves, la PCR a été pratiquée sur l'ADN préalablement obtenu par extraction à partir du moustique entier et dilué au 1/50e. Ainsi, au total, 86 spécimens (larves et adultes) provenant de huit provinces différentes (Tableau 1) ont pu être analysés en trois séries de PCR : une première et une deuxième série pour les adultes (18 et 24 échantillons), et une troisième série pour les larves (44 échantillons).

Résultats

Parmi les neuf espèces anophéliennes signalées au Maroc (28, 32), six ont pu être identifiées durant cette étude ; d'après les critères morphologiques, elles appartiennent aux sous-genres Anopheles (An.) et Cellia (Cel.). Il s'agit de : An. (An.) labranchiae (huit provinces), An. (Cel.) sergentii et An. (Cel.) cinereus (quatre provinces), puis An. (An.) algeriensis, An. (An.) marteri et An. (An.) ziemanni (deux provinces) (Tableau 2). Les trois autres espèces, An. (An.) claviger, An. (Cel.) dthali et An. (Cel.) multicolor n'ont pas été trouvées dans nos échantillonnages.

Aucun spécimen du sous-groupe Maculipennis n'a été capturé au niveau des provinces de Marrakech, Ouarzazate, Tiznit et Oujda.

Les résultats des trois séries de PCR des 86 spécimens d'anophèles analysés, obtenus par électrophorèse sur un gel d'agarose à 4 %, montrent que les séquences ITS2 de 72 anophèles correspondent bien à celle d'An. Labranchiae ; deux ont dû être confirmés par séquençage, 14 spécimens étaient négatifs et n'ont pu être amplifiés.

Discussion

La caractérisation génétique du sous-groupe Maculipennis par PCR dans les sites étudiés montre bien qu'il n'est représenté que par une seule espèce, An. labranchiae ; c'est l'espèce anophélienne la plus fréquente. Ces résultats confirment les recherches précédentes (20,21) sur ce sous-groupe au Maroc. Toutefois, étant donné la rareté de ces études, il serait intéressant de poursuivre les enquêtes en considérant de nouvelles régions, en particulier les rizières, biotopes typiques ayant par le passé favorisé la transmission de l'agent pathogène du paludisme au Maroc (33, 34) ainsi qu'en Espagne si bien que le roi de Valencia avait interdit la culture du riz (35). En effet, les modifications de l'environnement telles que l'irrigation, s'ajoutant au nombre recrudescent de cas de paludisme importé au Maroc (6) ainsi qu'aux changements climatiques actuels favorables à la transmission de l'agent pathogène du paludisme, sont susceptibles d'influencer son épidémiologie. Des mesures de surveillance de l'importation de nouveaux vecteurs sont essentielles pour préparer des opérations de lutte antivectorielle adaptées et éviter le risque de reprise de la transmission et la réémergence du paludisme.

Remerciements

Nous remercions M. Abdelaziz Agoumi, ancien Chef du Département de Parasitologie, Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat (Maroc), de nous avoir permis de prendre en charge le projet SGS04/67, M. Didier Fontenille et Mme Cécile Brengues du Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement , Montpellier (France) pour l'accueil au LIN et pour l'aide dans la réalisation des manipulations de biologie moléculaire, Mme Btissam Ameur, M. Tachfine, M. Bouhrara et M. Nachi du Service de Lutte antivectorielle, Direction de l'Épidémiologie et de Lutte contre les Maladies, Ministère de la Santé, Rabat (Maroc) pour leur collaboration concernant la capture des moustiques adultes.

Financement : Organisation mondiale de la Santé (projet SGS04/67).

Intérêts concurrents : aucun déclaré.

Références

1. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D et al. Biodiversité du paludisme dans le monde. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2004. 428 p.

2. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 Jan 29;239(4839):487–91.doi:10.1126/science.2448875 PMID:2448875

3. Fontenille D, Faye O, Konate L, Sy N, Collins FH. Comparaison des techniques PCR et cytogénétiques pour la détermination des membres du complexe Anopheles gambiae au Sénégal. Ann Parasitol Hum Comp. 1993;68(5-6):239–40.doi:10.1051/parasite/1993685239.

4. Fontenille D, Diatta M, Konate L, Lochouarn L, Lemasson JJ, Diagne N et al. Intérêt de l'utilisation des outils de biologie moléculaire dans l'étude de la transmission du paludisme : l'exemple des programmes conduits au Sénégal. Med Trop.1995;55:52S–5S.

5. Proft J, Maier WA, Kampen H. Identification of six sibling species of the Anopheles maculipennis complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. Parasitol Res. 1999 Oct;85(10):837–43.doi: 10.1007/s004360050642 PMID:10494811

6. Trari B, Carnevale P. De la préélimination à l'élimination du paludisme au Maroc. Quels risques pour l'avenir ? Bull Soc Pathol Exot. 2011 Oct;104(4):291–5. doi:10.1007/s13149-011-0156-2.

7. Eliminating malaria: learning from the past, looking ahead. Progress & impact series, n. 8 (October 2011). Geneva: World Health Organization; 2011. 84 p.

8. Falleroni D. Fauna anofelica italiana e suo "habitat" (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contra la malaria. Riv Malariol. 1926;5(5-6):553–93.

9. Van Thiel PH. Sur l'origine des variations de taille de l'Anopheles maculipennis dans les Pays-Bas. Bull Soc Pathol Exot. 1927;20:366–90.

10. Guy Y, Salières A, Boesiger E. Contribution à l'étude du « complexe maculipennis » (Diptera-Culicidae-Anophelinae). Mise au point en 1975. Ann Biol. 1976;15(5-6):227–82.

11. Deruaz D, Deruaz J, Pichot J. Correspondence analysis of larval chaetotaxy in the « Anopheles maculipennis complex » (Diptera, Culicidae). Ann Parasitol Hum Comp. 1991;66(4):166–72. doi:10.1051/parasite/1991664166.

12. Roubaud E. Variété nouvelle de l'A. maculipennis au Maroc, A. maculipennis sicaulti (n.var.). Bull Soc Pathol Exot. 1935;28:107–11.

13. Gaud J. Notes biogéographiques sur les Culicidés du Maroc. Arch Inst Pasteur Maroc. 1953;4:443–90.

14. Senevet G, Andarelli L, Sergent E. Les Anophèles de l'Afrique du Nord et du bassin méditerranéen. Encyclopédie entomologique. Série A,33. Paris: P. Lechevalier;1956. 280 p.

15. Stone A, Knight KL, Starcke H. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world (Diptera, Culicidae). The Thomas Say Foundation (Series),v. 6. Washington: Entomological Society of America;1959 (Supplements 1961 & 1963).358 p.

16. White GB. Systematic reappraisal of the Anopheles maculipennis Complex. Mosq Syst. 1978;10(1):13–44 (http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MS_V10_N1_P013-44.pdf)

17. Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory. Anopheles classification (Updated 15 March 2017). http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Anopheles%20classification_48.pdf (consulté le 11 juin 2017).

18. 18. Linton Y. Systematics of the Holarctic maculipennis complex. Systematics Symposium: 70th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association, Savannah, Georgia, USA, 22-26 February 2004.

19. Trari B. Culicidae (Diptera): Catalogue raisonné des peuplements du Maroc et études typologiques de quelques gîtes du Gharb et de leurs communautés larvaires [Thèse]. Rabat: Université Mohamed V, Faculté des Sciences;1991.

20. Faraj C, Adlaoui E, Saaf N, Romi R, Boccolini D, Di Luca M et al. Note sur le complexe Anopheles maculipennis au Maroc. Bull Soc Pathol Exot. 2004;97(4):293–4 (http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T97-4-2648-2p.pdf).

21. Laboudi M, Faraj C, Sadak A, Harrat Z, Boubidi SC, Harbach RE, et al. DNA barcodes confirm the presence of a single member of the Anopheles maculipennis group in Morocco and Algeria: An. sicaulti is conspecific with An. labranchiae. Acta Trop. 2011 Apr;118(1):6–13. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.12.006 PMID:21172298

22. Boudemagh N, Bendali-Saoudi F, Soltani N. Inventory of Culicidae (Diptera: Nematocera) in the region of Collo (North-East Algeria). Ann Biol Res. 2013;4(2):94–9.

23. Bueno-Marí R, Jiménez-Peydró R. Anophelism in a Former Malaria Area of Northeastern Spain. J Arthropod Borne Dis. 2013;7(2):147–53. PMCID:PMC3875881

24. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors. 2010 Dec;3:117. doi: 10.1186/1756-3305-3-117 PMCID:PMC3016360

25. Ghebreyesus TA, Haile M, Witten KH, Getachew A, Yohannes AM, Yohannes M, et al. Incidence of malaria among children living near dams in northern Ethiopia: community based incidence survey. BMJ. 1999 Sep 11;319(7211):663–6. doi: 10.1136/bmj.319.7211.663 PMCID:PMC28216

26. Stratégie d'élimination du paludisme au Maroc : plan et éléments d'évaluation. Rabat: Ministère de la Santé du Royaume du Maroc; 2001.41 p.

27. Données épidémiologiques des maladies sous surveillance. Bulletin épidémiologique1966-2004.Rabat: Ministère de la Santé du Royaume du Maroc, Direction de l'Épidémiologie et de Lutte contre les Maladies.

28. Trari B, Harbach RE, Himmi O, Dakki MA, Agoumi A. An inventory of the mosquitoes of Morocco. I. Genus Anopheles (Diptera: Culicidae). Eur Mosq Bull. 2004;18:1–19.

29. Fenêtres sur le territoire marocain. Rabat: Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Urbanisme, de l'Habitat et de l'Environnement du Royaume du Maroc, Direction de l'aménagement du territoire; 2002.147 p.

30. Faraj C, Adlaoui E, Ouahabi S, Rhajaoui M, Fontenille D, Lyagoubi M. Entomological investigations in the region of the last malaria focus in Morocco. Acta Trop. 2009;109(1):70–3. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.09.021 PMID:18992211

31. Bruhnes J, Rhaim A. Geoffroy B, Angel G, Hervy JP. Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel d'identification et d'enseignement. Montpellier: Institut de Recherche pour le Développement (IRD) / Institut Pasteur de Tunis (IPT) CD-Rom (Collection Didactiques); 2000.

32. Trari B, Dakki M, Harbach RE. An updated checklist of the Culicidae (Diptera) of Morocco, with notes on species of historical and current medical importance. J Vect Ecol. 2017 Jun;42(1):94-104.doi :10.1111/jvec.12243
33. Gaud J, Mechali D, Delrieu J. Riziculture et paludisme au Maroc. Bull Inst Hyg Maroc (NS). 1949;9(3-4):181–90.
34. Houel G. La lutte antipaludique dans les zones rizicoles du Maroc. Bull Inst Hyg Maroc (NS). 1954;14(1-2):43–90.
35. Rico-Avelló y Rico C. Aportación española a la historia del paludismo. Rev Sanid Hig Publica. 1947;21:483-733.

Thursday 11th of July 2024 01:42:12 AM