

Diagnostic du paludisme sévère : comparaison de la technique de PCR en temps réel versus microscopie, à Kinshasa, République Démocratique du Congo.

Severe malaria diagnosis: comparison of real-time PCR versus microscopy in Kinshasa, DR Congo.

Mvumbi DM^{1,2}, Boreux R², Mvumbi GL¹,
Bobanga TL³, Situakibanza HNT³, Melin P²,
Kayembe JMN⁴, DeMol P², Hayette MP².

Correspondance

Mvumbi Makaba Dieudonné
Courriel : didimvumbi@gmail.com

Summary

Background: Malaria control stays in the speed and the quality of a rationale diagnosis. Despite being more sensitive among diagnostic tools, PCR is still restricted to specialized laboratories. This study assessed the performance and agreement between a species-specific real-time PCR test based on TBF and the conventional light microscopy for malaria diagnosis. **Methods:** Microscopy controls and real-time PCR were performed for *Plasmodium* species identification from 213 blades randomly selected from a Pediatric clinic of Kinshasa. Diagnostic consistency and performance of the 2 methods was assessed using the Cohen's kappa (κ) and by calculating the specificity and the sensitivity. **Results:** *P. falciparum* was detected by microscopy in 184/213 samples (86.3%), including one mixed infection. Real-time PCR (RT-PCR) led to the detection of 202 (94.8%) *Plasmodium*-positive samples and 3 mixed infections. The results of the PCR analysis were consistent with those of microscopy for 195 (91.54%) samples. The later had a sensitivity of 91.09% and a specificity of 100%, compared to PCR. **Conclusion:** Even when using TBF as a source of DNA, RT-PCR remains still more sensitive and more accurate than microscopy for detecting mixed infections. Even not yet included as a current diagnostic tool for malaria in low income countries, RT-PCR could find a notable interest in large-scale epidemiological study of drug resistance or malaria parasite's speciation.

Keywords: Malaria, diagnosis, RT-PCR, microscopy

¹ Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo

² Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium

³ Department of Tropical Medicine and Infectious Disease, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo

⁴ Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo

Résumé

Contexte : Le contrôle du paludisme dépend de la rapidité et de la qualité d'un diagnostic correct. En dépit de sa sensibilité diagnostique supérieure à la microscopie, l'usage de la PCR n'est limité à ce jour qu'à quelques laboratoires spécialisés. Cette étude a évalué la performance de la PCR en temps réel pour le diagnostic du paludisme comparée à la microscopie. **Méthodes :** Deux cent-treize lames portant des gouttes épaisses ont été aléatoirement sélectionnées du service pédiatrique d'une clinique de Kinshasa. Une identification des Plasmodiums par microscopie et par PCR en temps réel spécifique aux espèces plasmodiales, basée sur de l'ADN extrait à partir des gouttes épaisses, a été réalisée. La performance de la PCR en temps réel et l'accord avec la microscopie ont été évalués à l'aide du test Kappa de Cohen et en calculant la spécificité et la sensibilité. **Résultats :** Le *P. falciparum* a été retrouvé sur 184/213 échantillons (86,3%), parmi lesquels une infection mixte. La PCR en temps réel a par contre décelé 202 (94,8%) échantillons positifs à *P. falciparum* dont 3 infections mixtes. Ses résultats étaient en accord avec ceux de la microscopie pour 195 (91,5%) échantillons. La sensibilité de la microscopie, comparée à la PCR était de 91,09% et sa spécificité de 100%. **Conclusion :** Même en utilisant les gouttes épaisses comme source d'ADN plasmodial, la PCR en temps réel demeure plus sensible que la microscopie et plus précise pour la détection des infections mixtes. Quoique non encore de pratique routinière dans les pays en voie de développement, la technique de PCR en temps réel peut tirer un net intérêt dans les études épidémiologiques évaluant la chimiorésistance de *P. falciparum* ou pour l'identification des espèces plasmodiales.

Mots clé : Paludisme, diagnostic, PCR en temps réel, microscopie

Introduction

Avec 627 000 décès recensés en 2012 dans le monde (1), le paludisme demeure la maladie parasitaire la plus meurtrière. La majorité des cas sont comptabilisés en Afrique sub-saharienne où les conditions environnementales sont propices à la croissance et à la survie du vecteur de la maladie, le moustique anophèle.

Historique de l'article : Reçu le 27 janvier 2015 ; Accepté le 11 février 2016

Certaines catégories de personnes sont plus vulnérables que d'autres, telles que les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes, représentant les populations dites à risque (2). Un contrôle efficace du paludisme réside dans la rapidité ainsi que dans la qualité du diagnostic, mais aussi dans une prise en charge médicamenteuse adéquate (antipaludique adapté à la situation, dosage et durée du traitement appropriés). La microscopie, classiquement considérée comme étant le "gold standard" du diagnostic palustre (3-5), ne nécessite pas de matériel sophistiqué ni de source permanente en électricité. Les étalements sanguins sur lame (goutte épaisse et frottis minces) qui sont partout réalisés, sont l'outil de diagnostic le plus approprié pour les pays en développement où le paludisme est souvent endémique.

La goutte épaisse permet de confirmer la présence du parasite et de le quantifier tandis que le frottis mince permet plus facilement d'identifier l'espèce en cause mais aussi les infections mixtes (associations d'espèces) (4, 6). Malheureusement l'interprétation de la microscopie dépend de l'expérience et donc de la subjectivité du microscopiste. Elle permet de détecter environ 10 à 50 parasites/ μ l, ce qui la rend peu efficace pour des plus faibles parasitemies (7, 8). Elle révèle aussi des insuffisances quant à l'identification des coinfections par différents plasmodiums (9-11).

La préparation, la coloration ainsi que la lecture des lames requiert un temps assez long. Afin d'en économiser, des tests immunochromatographiques dits "rapides" (TDR) ont vu le jour. Ils détectent des enzymes spécifiques au parasite, pLDH et HRP-2 par exemple, et sont donc spécifiques soit au *P. vivax*, soit au *P. falciparum* ou soit aux 4 espèces communes infectant l'homme (12-14). Outre leur rapidité, ils sont d'utilisation et d'interprétation facile. Ils ont cependant une faible sensibilité (variant de 50 à 1000 parasites/ μ l) (12) et un coût relativement élevé qui compromet leur utilisation en routine, dans quelques contrées de l'Afrique sub-saharienne (13).

Il est actuellement reconnu que le diagnostic par Polymerase Chain Reaction (PCR) est encore plus sensible que les deux procédés précédents. Ce dernier reste encore réservé à certains laboratoires spécialisés, vu ses exigences matérielles et financières (9, 15). La PCR nichée peut détecter jusqu'à 1 parasite / μ l (9) et la PCR en temps réel jusqu'à 0,2 parasite / μ l (16) voire même 0,02 parasite / μ l (17).

Dlamini *et al.* ont suggéré la possibilité d'utiliser les gouttes épaisses pour des études épidémiologiques rétrospectives de résistance aux antipaludiques comme alternative au sang total ou encore déposé sur papiers-filtres (18). En effet, le sang total requiert le respect de certaines règles de biosécurité pour son prélèvement, son transport ainsi que sa conservation souvent difficiles à prendre en compte dans les pays en développement où par contre les gouttes épaisses sont partout confectionnées et le plus souvent conservées. Mais Scopel *et al.* décrivent dans leurs travaux une plus faible sensibilité avec leur PCR nichée en utilisant les gouttes épaisses comme source d'ADN plasmodial (19).

Cette étude a été menée pour évaluer la performance d'une PCR en temps réel (basée sur de l'ADN plasmodial extrait à partir des gouttes épaisses) comparée à la microscopie conventionnelle pour le diagnostic d'espèces plasmodiales, sur des échantillons prélevés chez des enfants avec une symptomatologie associée au paludisme à Kinshasa, en République Démocratique du Congo (RDC).

Méthodes

Collecte des échantillons

Deux cent-treize lames portant gouttes épaisses et frottis minces ont été sélectionnées aléatoirement des archives du service de pédiatrie de la Clinique Saint Marc de Kingasani, à l'est de Kinshasa. Chaque lame portait une goutte épaisse et un frottis mince colorée au Giemsa, réalisés selon les normes de la clinique. Ces échantillons avaient été prélevés

sur des enfants de moins de cinq ans avec symptomatologie palustre durant la période allant de janvier à mars 2010. Une goutte épaisse avait été considérée négative si 100 champs microscopiques étaient dépourvus de parasite. Tous les enfants infectés avaient été traités selon les recommandations de la politique nationale de prise en charge du paludisme. Les lames avaient été stockées dans des boîtes en bois hermétiquement fermées.

Extraction de l'ADN

Toute la surface de la goutte épaisse a été utilisée pour l'extraction d'ADN en utilisant le Kit Maxwell® 16 Cell LEV DNA purification (Promega, USA), comme décrit précédemment par Mvumbi *et al.* (20). L'ADN a été conservé à -20 °C dans l'attente des analyses ultérieures.

PCR en temps réel

La PCR temps réel choisie pour l'identification des *Plasmodium sp.* a été réalisée comme décrit précédemment par Cnops *et al.* (17). Brièvement, une PCR utilisant quatre amorces a été utilisée en duplex incluant deux couples

d'amorces sens (Pfal + Pviv et Pmal + Pova) combinés à une seule amorce antisens (plasm2). Les sondes et les amorces ont été conçues pour détecter les gènes de la petite sous-unité 18S de l'ARNr des espèces plasmodiales (table 1). Le mix était composé de: 12,5 µl de 2X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), de 200 nM pour toutes les amorces et sondes à l'exception de *P. vivax* pour lequel les amorces et sonde étaient à 100 nM, 2,5 µl d'amorces et de sonde du contrôle interne et de l'eau pour obtenir un volume total de 25 µl comprenant 5 µl d'ADN.

Les PCR ont été réalisées sur un thermocycleur 7500 Fast (Applied Biosystems, USA) dans le Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine, Université de Kinshasa en présence de témoins positifs fournis par l'Unité de Parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers mais aussi par le Laboratoire de Microbiologie clinique du CHU de Liège. Les conditions suivantes de PCR ont été appliquées: 2 min à 95°C, suivi par 50 cycles de 15 s à 95°C et 60 s à 60°C.

Table 1. Séquences des amorces et sondes utilisés pour la PCR temps réel

Espèces	Amorces sens	Amorce antisens (plasm2)	Sondes
<i>Pfal</i>	5'-CTAGGTGTTGGATG-3'	5'-TTATGAGAAAATCAAAGTC TTTGGGT-3'	5'-FAM- AGCAATCTAAAAGTCACCTCGA AAGATGACT-DQ-3'
<i>Pova</i>	5'-CGACTAGGTTTTGGATG-3'		5'-VIC- CGAAAGGAATTTTCTTATT-DQ- 3'
<i>Pviv</i>	5'-GACTAGGCTTTGGATG-3'		5'-VIC- AGCAATCTAAGAATAAACTCCG AAGAGAAAATTCT-DQ-3'
<i>Pmal</i>	5'-GACTAGGTGTTGGATG-3'		5'-FAM- CTATCTAAAAGAAACACTCAT- DQ-3'

Analyse des données

Les résultats sont présentés sous forme de tables de fréquences pour les variables catégorisées et sous forme de moyennes, écart-type (DS) et extrêmes pour les variables continues. La relation entre la parasitémie et les facteurs continus a été étudiée par un test de corrélation de Pearson. Les taux moyens de parasitémie ont

été comparés entre les catégories des autres facteurs par un test t de Student non apparié. La parasitémie a été étudiée en fonction de tous les autres facteurs par une régression linéaire avec une sélection stepwise (pas-à-pas). Les résultats sont considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% (p<0.05). L'accord entre les deux méthodes de diagnostic a été évalué à l'aide

du kappa (κ) de Cohen dont l'interprétation s'est basée sur l'échelle de Landis et Koch (21). Les performances des deux méthodes diagnostiques ont été évaluées par le calcul de la spécificité et de la sensibilité. Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel SAS version 9.3 pour Windows.

Résultats

Un total de 184/213 lames (86,3%) ont été reportées positives par la lecture des frottis minces et gouttes épaisses par un microscopiste expérimenté. La parasitémie a varié de 0,2 à 44,0% avec une moyenne de 17,5%. Toutes les lames ont été positives au *P. falciparum*, mais une d'entre elles l'était également pour *P. malariae* et a donc été catégorisée comme une infection mixte. Par ailleurs, la PCR en temps réel a permis la détection de 202/213 (94,8%) échantillons positifs, tous au *P. falciparum*. Les caractéristiques de base de ces 202 échantillons positifs sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2. Caractéristiques relatives aux échantillons positifs à la PCR en temps réel

Patients	
Moyenne d'âge \pm SD (limites)	30,981 \pm 14,21 (4-59)
Hommes	55%
Moyenne Poids (kgs) \pm SD (limites)	13,15 \pm 4,36 (5-22.4)
<i>Symptômes</i>	%
- Anémie	97
- Prostration	60.9
- Choc	34.2
- Détresse respiratoire	34.2
- Convulsions	5
- Coma	5.4
- Ictère	1.59

Table 4. Comparison of RT-PCR assay and microscopy for malaria parasites identification

Microscopie	RT-PCR			Total
	Négatifs	Pfal seul	Mixed (Pfal+Pmal)	
Négatifs	11	16	2	29
Pfal* seul	0	183	0	183
Mixed (Pfal+Pmal**)	0	0	1	1
Total	11	199	3	213

Kappa=0.56, 95% IC: 0.39-0.72 *Pfal: *Plasmodium falciparum*, **Pmal: *Plasmodium malariae*

P. falciparum a été détecté seul dans 199 échantillons (93,4%) et associé au *P. malariae* dans 3 échantillons (1,4%). Parmi ces trois infections mixtes, une seule avait été également détectée par microscopie. Les résultats du diagnostic sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Les résultats de la PCR temps réel étaient en accord avec ceux de la microscopie pour 195 échantillons (91,54%), parmi lesquels 184 positifs et 11 négatifs. La microscopie, comparée à la PCR temps réel, a montré une sensibilité de 91,09% (IC à 95%: 86,28%-94,63%) et une spécificité de 100% (95% CI: 71,33 à 100%).

Table 3. Comparison of RT-PCR assay and microscopic thin and thick blood films examination for malaria diagnosis

Microscopie	RT-PCR		Total
	Positifs	Négatifs	
Positifs	184	0	184
Négatifs	18	11	29
Total	202	11	213

Kappa=0.52, 95% IC: 0.33-0.70

Une forte corrélation a été retrouvée entre la parasitémie et les valeurs de Ct en analyse univariée (voir figure 1), mais aucune association significative n'a été trouvée avec les autres variables.

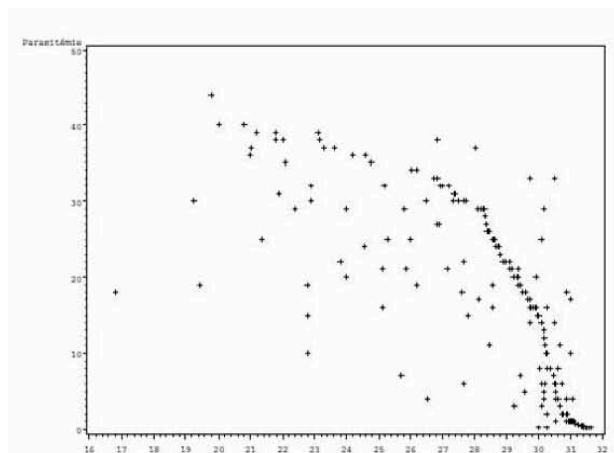


Figure 1. Corrélation entre parasitémie évaluée sur les frottis minces par rapport aux valeurs de Ct de la RT-PCR ($r = -0,71$, $p < 0,0001$)

Discussion

La majorité des études similaires publiées dans la littérature ont été basées sur des analyses à partir de sang total ou de sang déposé et séché sur papier-filtre comme source d'ADN pour la PCR. La particularité du présent travail réside dans l'usage de la goutte épaisse comme source d'ADN en RDC. Nous avons démontré que la PCR en temps réel utilisée dans cette étude était plus sensible que la microscopie pour détecter tant les faibles parasitémies que les infections mixtes bien qu'étant basée sur des gouttes épaisses. Ceci est en accord avec les résultats de quelques rares études ayant aussi utilisé de l'ADN provenant d'étalements sanguins sur lame pour l'amplification moléculaire (22-25).

Les résultats de la PCR en temps réel étaient en accord avec ceux de la microscopie à 91,54% des cas. Ces chiffres sont proches de ceux de Dormond *et al.* (26) et de Nicastrì *et al.* (27) qui ont trouvé, respectivement dans leurs études 89% et 93,5% d'accord entre la microscopie et la PCR en temps réel. Rodulfo *et al.* ont rapporté un accord légèrement plus élevé à 96,2% entre les deux méthodes (28). Mais ces études

comparativement à la nôtre ont utilisé du sang total en tant que source d'ADN, qui naturellement a un meilleur rendement pour l'extraction d'ADN.

Une seule infection mixte a été détectée par microscopie en comparaison des trois détectées par PCR en temps réel. Ceci pourrait être expliqué par le fait que *P. falciparum* est généralement retrouvé en plus grande densité que l'espèce à laquelle il est associé lors d'infections mixtes de sorte que la seconde espèce est occultée (29). D'autre part un microscopiste qui a identifié une première espèce dans son frottis pourrait ne pas rechercher une seconde espèce rare (30). Une autre explication pourrait être donnée par Mueller *et al.* qui ont constaté que le diagnostic moléculaire améliore considérablement la prévalence des quatre espèces de plasmodiums humains, mais avec une plus forte augmentation de *P. malariae* et *P. ovale*, qu'ils ont appelé "parasites timides" du paludisme (31).

Environ 9% des infections positives à la PCR en temps réel n'ont pas été détectées par la microscopie. Ceci est proche des valeurs de l'étude d'Andrade *et al.* qui ont trouvé que 10,3% des infections positives par PCR étaient négatives en microscopie optique. Mais encore une fois, ces travaux étaient basés sur de l'ADN extrait à partir de sang total (32). Outre la possibilité d'une très faible parasitémie (33), l'expérience du microscopiste peut également être incriminée pour expliquer cette non-identification. Mukadi *et al.* ont indiqué dans leur travail sur l'évaluation de la lecture microscopique des frottis sanguins colorés au Giemsa pour le diagnostic du paludisme en RDC que même pour une densité parasitaire de 177000 parasites/ μ L, 5% des microscopistes avaient répondu « aucun parasite observé » et que si la parasitémie était réduite à 86 parasites/ μ L, ce pourcentage triplait à 15% pour ceux qui avaient rapporté avoir vu des lames négatives (34). Une autre explication pourrait être la mauvaise qualité des lames. En fait la goutte épaisse et le frottis mince ont été disposés

sur la même lame pour raison d'économie et ont été colorés ensemble. Cette procédure peut expliquer une baisse de la performance de la lecture.

Tous les échantillons positifs à la PCR en temps réel mais qui étaient négatifs à la microscopie avaient une valeur de Ct (cycle threshold) supérieure à 32. Si l'on considère que la parasitémie la plus basse calculée dans notre étude (0,2%) correspondait à une valeur de Ct de 31,63 nous pouvons supposer que ces échantillons avaient des parasitémies inférieures à 0,2%. Ce qui correspond à environ 10.000 parasites/ μ L qui est bien inférieur aux 177.000 parasites/ μ L de l'étude de Mukadi *et al.* pour lesquels 5% des microscopistes déclaraient n'avoir observé aucun parasite.

Notre PCR en temps réel a présenté une bonne performance, ce qui rejoint les résultats de Cnops *et al.* (22) qui ont également trouvé 100% de spécificité. Scopel *et al.* (19) rapportent par contre une plus faible spécificité (93%) et sensibilité (65%); ceci pouvant se justifier par les différentes PCR utilisées (amorces, sondes, conditions PCR). Toutefois les deux études ont rapporté des valeurs de Kappa proches (0,57 dans l'étude Scopel et 0,52 dans notre étude) exprimant un accord modéré entre les deux méthodes diagnostiques. Rantala *et al.* qui ont travaillé sur des échantillons d'ADN extraits à partir de sang déposé sur papiers filtres ont trouvé des valeurs assez semblables de 90,9% et 91,2% respectivement pour la sensibilité et la spécificité. Ils ont par ailleurs stipulé que le fait de continuer de considérer la microscopie comme gold-standard pourrait produire des résultats erronés dans les essais cliniques (35).

L'espèce plasmodiale prédominante identifiée tant par la PCR en temps réel que par la microscopie reste *P. falciparum*, telle que décrit par Ngimbi *et al.* il y a près de trente ans (36) et récemment par Taylor *et al.* (37).

Conclusion

Le diagnostic du paludisme par PCR en temps réel est la méthode la plus sensible existant à ce jour quoique requérant du matériel et des réactifs très coûteux. Même lorsque la goutte épaisse est utilisée comme source d'ADN, elle demeure toujours plus sensible que la microscopie et plus précise pour détecter les infections mixtes.

Malgré le fait qu'il ne soit pas encore possible d'inclure le diagnostic moléculaire du paludisme en routine clinique dans les pays à faibles revenus, cette technique pourrait trouver un intérêt considérable dans les études épidémiologiques sur la résistance aux antipaludiques ou sur la spéciation de parasite.

Références

1. WHO: World Malaria Report 2013. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.
2. RBM: Regional Strategies.2013. www.rollbackmalaria.org/gmap/part3.pdf
3. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007; **77**:119-127.
4. Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec. Canada. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2694-2700.
5. Eibach D, Traore B, Bouchrik M, Coulibaly B, Coulibaly N, Siby F, Bonnot G, Bienvenu AL, Picot S. Evaluation of the malaria rapid diagnostic test VIKIA malaria Ag Pf/Pan™ in endemic and non-endemic settings. *Malar J.* 2013; **12**:188.
6. Greenwood BM, Armstrong JR. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991, **85**:186-188.
7. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binka F, Kilama WL, Ford N, White NJ. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for

- research and development. *Lancet Infect Dis* 2002, **2**: 564-573.
8. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ.* 1988, **12**: 621–626.
 9. 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**: 283–292.
 10. McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA Jr, Wongsrichanalai C. Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. *Am J Trop Med Hyg* 2003; **69**: 372-376.
 11. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet* 2004; **364**: 1896-1898.
 12. Huong NM, Davis TM, Hewitt S, Huong NV, Uyen TT, Nhan DH, Cong le D. Comparison of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. *Trop Med Int Health* 2002; **7**:304-308
 13. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Intern Health* 2003 ; **8**:876-883.
 14. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, Camargo EP, Camargo LMA, Barral A, Duarte A, Barral-Neto M. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malar J* 2010, **9**:117.
 15. Steenkeste N, Incardona S, Chy S, Duval L, Ekala MT, Lim P, Hewitt S, Sochantha T, Socheat D, Rogier C, Mercereau-Puijalon O, Fandeur T, Ariey F. Towards high- throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers. *Malar J* 2009, **8**:86.
 16. Hwang SY, Kim SH, Lee GY, Hang VT, Moon CS, Shin JH, Koo WL *et al.* A novel real-time PCR assay for the detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria in low parasitized individuals. *Act Trop* 2011; **120**:40-45.
 17. Cnops L, Jacobs J and Van Esbroeck M. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections. *ClinMicrobiol Infect* 2011; **17**: 1101–1107.
 18. Dlamini SV, Leibrandt J, Dlamini B. Archived giemsa-stained thick-smear blood samples as a source of DNA for plasmodium falciparum detection by the polymerase chain reaction (PCR): an idea for low transmission settings. *J AgrSci Tech* 2011, **14**:1-19.
 19. Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using Plasmodium DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 2004, **31**:3-8.
 20. Mvumbi DM, Boreux R, Sacheli R, Lelo M, Lengu B, Nani-Tuma S, Melin P, Ntumba K, Lunganza K, Demol P, Hayette MP. Assessment of pfprt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Malar J.* 2013, **12**:459.
 21. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 1977a, **33**: 159-174.
 22. Cnops L, Van Esbroeck M, Bottieau E, Jacobs J. Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for Plasmodium species-specific real-time PCR. *Malar J* 2010, **9**:370.
 23. Edoh D, Steiger S, Genton B, Beck HP. PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;**91**:361–363
 24. Kimura M, Kaneko O, Inoue A, Ishii A, Tanabe K. Amplification by polymerase chain reaction of Plasmodium falciparum DNA from Giemsa-stained thin blood smears. *MolBiochem Parasitol.* 1995; **70**:193–197.
 25. Ebrahimzadeh A, Polshakan M, Qureshi MI, Sharifi I. Reliable DNA Extraction on Historical Malaria Negative Smears Conducted to Nested PCR in South-East of Iran. *Biotechnology*, 2006; **5**:353-357.
 26. Dormond L, Jatou-Ogay, de Vallière S, Genton B, Bille J and Greub G. Multiplex real-time PCR

- for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *ClinMicrobiol Infect* 2011; **17**:469-475.
27. Nicastrì E, Bevilacqua N, SañéSchepisi M, Paglia MG, Meschi S, Ame SM, Mohamed JA, Mangi S, Fumakule R, Di Caro A, Capobianchi MR, Kitua A, Molteni F, Racalbutto V, Ippolito G. Accuracy of malaria diagnosis by microscopy, rapid diagnostic test, and PCR methods and evidence of antimalarial overprescription in non-severe febrile patients in two Tanzanian hospitals. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **80**:712-717.
 28. Rodulfo H, De Donato M, Mora R, Gonzalez L, Contreras CE. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz J Med Biol Res* 2007; **40**:535-543.
 29. Snounou G, White NJ. The co-existence of Plasmodium: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol* 2004; **20**:333-339.
 30. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 2004; **20**: 233–240
 31. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* the “bashful” malaria parasites. *Trends Parasitol* 2007; **23**:278-283
 32. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, Camargo EP, Camargo LMA, Barral A, Duarte A, Barral-Neto M. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malar J* 2010; **9**:117.
 33. Fontecha GA, Mendoza M, Banegas E, Poorak M, De Oliveira AM, Mancero T, Udhayakumar V *et al.* Comparison of molecular tests for the diagnosis of malaria in Honduras. *Malar J* 2012; **11**:119.
 34. Mukadi P, Gillet P, Lukuka A, Atua B, Kahodi S, Lokombe J, Muyembe J and Jacobs J. External quality assessment of malaria microscopy in the Democratic Republic of the Congo. *Malar J* 2011; **10**:308.
 35. Rantala AM, Taylor SM, Trottman PA, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, Kulmala T, Ashorn P, Meshnick SR. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J* 2010; **9**:269.
 36. Ngimbi NP, Beckers A et Wery M. Aperçu de la situation épidémiologique du paludisme à Kinshasa (République du Zaïre) en 1980. *Ann Soc belge Med Trop* 1982 ; **62** : 121-3.
 37. Taylor SM, Messina JP, Hand CC, Juliano JJ, Muwonga J, Tshefu AK, Atua B, Emch M, Meshnick SR. Molecular malaria epidemiology: mapping and burden estimates for the Democratic Republic of the Congo, 2007. *PLoS One* 2011; **6**:e16420.