

Les tests de diagnostic rapide du paludisme en pratique quotidienne

Rapid diagnostic tests for malaria in daily practice

R.A. Rakotoarivelo (1)*, S.H. Razafimahefa (2), R.L. Andrianasolo (1),
M.J.D Randria (1)

(1) USFR des Maladies Infectieuses, Hôpital Joseph Raseta Befelatanana, CHU Antananarivo, Madagascar

(2) USFR d'Hépatogastro-entérologie, Hôpital Joseph Raseta Befelatanana, CHU Antananarivo, Madagascar

Résumé

Le paludisme reste un problème de santé publique mondial, plus particulièrement en Afrique. En 2010, le nombre des cas de paludisme a été estimé à 216 millions, dont 81% en Afrique. Le nombre de décès lié paludisme s'est élevé à 655 000, dont 91 % en Afrique. Une confirmation rapide par un examen parasitologique, en moins de 2 heures après l'arrivée en consultation, est recommandée avant tout traitement antipaludique dans tous les cas suspects de paludisme. Alors qu'en 2009, seulement 20% des cas de paludisme déclaré étaient confirmés par un examen parasitologique, dans les 21 pays sur 42 de la région OMS Afrique. Le test de diagnostic rapide (RDT) est un test immunochromatographique détectant la présence d'un antigène spécifique de *Plasmodium* sp dans le sang en 10 à 15 mn. Il est un outil très intéressant et facile à utiliser pour améliorer la prise en charge des cas de fièvre et du paludisme et constitue un nouvel élan dans la marche vers l'élimination du paludisme. Il existe sur le marché plusieurs types de RDT en fonction du nombre d'antigènes spécifiques de *Plasmodium* sp qu'ils détectent. Ils ont subi de tests d'évaluation de la performance sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Depuis quelques années, les RDT ont pris une place très importante dans le diagnostic de paludisme. De plus, leurs sensibilités ont dépassé largement celles exigées par l'OMS. Le respect de conditions de conservation et d'utilisation est indispensable pour leur fiabilité. L'accessibilité par les formations sanitaires publiques et privées reste à régler pour pouvoir tirer tous les bénéfices de RDT.

Mots clés: Test diagnostic rapide, fièvre, paludisme

Abstract

Malaria remains a public health problem worldwide, particularly in Africa. In 2010, the number of malaria cases was estimated at 216 million, 81% in Africa. The number of malaria-related deaths totaled 655,000, 91% in Africa. Prompt parasitological confirmation by parasitological testing in less than two hours after arriving in consultation is recommended before any antimalarial treatment in all cases of suspected malaria. In 2009, only 20% of malaria cases reported was confirmed by parasitological testing in 21 of the 42 countries of the World Health Organization (WHO) African Region. The rapid diagnostic test (RDT) is an immunochromatographic test detecting the presence of specific antigens of *Plasmodium* sp in the blood from 10 to 15 minutes. It is very interesting and is easy to use to improve the management of fever and malaria. It appears as a new impetus in the way towards malaria elimination. There are several types of RDT according to the number of specific antigens of *Plasmodium* sp they detect. They have been tested for performance evaluation under the auspices of the WHO. In recent years, the RDT has taken a very important place in the diagnosis of malaria. In addition, their sensitivities have far exceeded those required by the WHO. Compliance with the conditions of conservation and use is essential for their reliability. Accessibility by public and private health centers remains to adjust to reap all the benefits of RDT.

Keywords: Rapid diagnostic test, fever, malaria

I. Introduction

Le paludisme reste un problème de santé publique mondial, plus particulièrement en Afrique. Selon l'Organisation

Mondiale de la Santé (OMS), il a encore menacé 3,3 milliards de personnes en 2010. La même année, le nombre des cas de paludisme a été estimé à 216 millions (entre 149 et 274 millions de cas), dont 81% en Afrique. Le paludisme tue

un enfant par minute.

La prise en charge précoce (en moins de 24 heures après le début de la maladie) fait partie de points essentiels de la lutte vers le contrôle ou l'élimination du paludisme [2]. La microscopie reste la référence pour le diagnostic parasitologique du paludisme. Mais elle est souvent difficilement accessible à cause du faible taux d'électrification en Afrique, ou du manque de matériels ou d'approvisionnement en réactifs. De plus, les formations sanitaires n'ont pas toujours la capacité d'effectuer un diagnostic microscopique de qualité faute de personnels médicaux qualifiés ou à cause de surcharge de travail. Une goutte épaisse lue par un personnel qualifié est positive même si la parasitémie est basse entre 5 et 10 plasmodies/ μ L de sang [3]. Mais avec les conditions sur terrains, elle détecte une parasitémie à partir de 100 plasmodies/ μ L [4]. Ainsi, vers la fin des années 90, l'OMS s'est intéressée au test de diagnostic rapide du paludisme (RDT) [5].

Depuis le début de l'année 2010, l'OMS a recommandé une confirmation parasitologique rapide par un examen microscopique ou par un RDT, moins de 2 heures après l'arrivée en consultation, avant tout traitement, dans tous les cas suspects de paludisme. Un traitement basé uniquement sur une suspicion clinique ne devrait être envisagé que si le diagnostic parasitologique est impossible [6]. En 2009, seulement 20% des cas de paludisme déclaré étaient confirmés par un examen parasitologique, dans 21 des 42 pays de la région OMS Afrique [7]. Dans ce contexte, depuis cette année, l'OMS a lancé la nouvelle initiative Tester Traiter Suivre (TTS) pour s'acheminer vers l'accès universel aux tests de diagnostic et au traitement antipaludique et créer des systèmes de surveillance de la maladie plus solides [8]. Une initiative confirme la ferme volonté de l'OMS à renforcer l'accessibilité universelle aux RDT, en 2011 [9].

Les RDT peuvent être utilisés dans les endroits où l'accessibilité à des examens de laboratoire est impossible, et directement à l'endroit où le patient est pris en charge. La disponibilité actuelle d'un outil facile à utiliser, le RDT, constitue un nouvel élan dans la marche vers l'élimination du paludisme.

II. Description d'un RDT

II.1. Mode d'action de tests diagnostiques rapides du paludisme

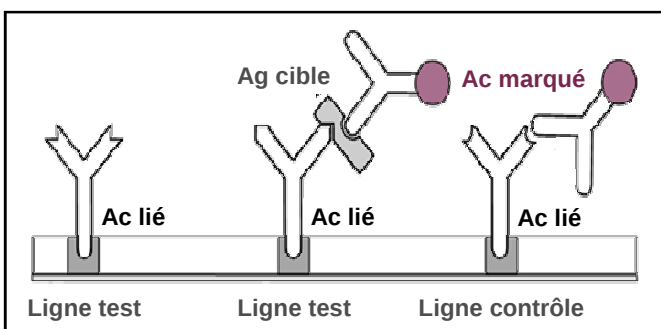


Figure 1. Mode d'action d'un test de diagnostic rapide du paludisme

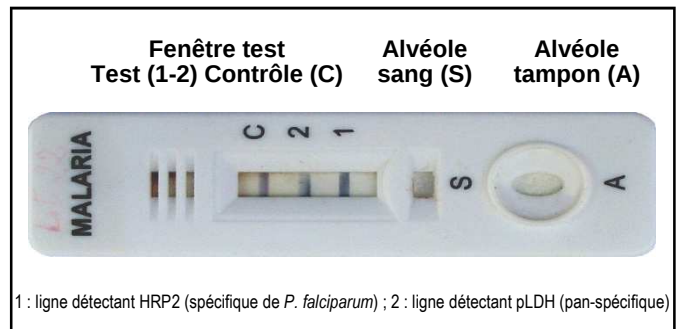


Figure 2. Une cachette de RDT Combo Pf/Pan

Un RDT est un test immunochromatographique détectant la présence des antigènes spécifiques de *Plasmodium sp* dans le sang en 10 à 15 mn (figure 1) [10].

Il se présente sous la forme d'une cassette en plastique ou d'une carte qui contient une bandelette de nitrocellulose (figure 2).

Un anticorps spécifique de *Plasmodium sp* cible (Ac lié) est lié à la bandelette de nitrocellulose sur une fine ligne (test) et un anticorps ou antigène spécifique de l'anticorps marqué sur la ligne contrôle. L'anticorps libre marqué (Ac marqué) au colorant fluorescent, spécifique de *Plasmodium sp* cible est placé sur une des extrémités de la bandelette. Sur la même extrémité est déposée la goutte de sang puis la solution tampon. Le mélange migre le long de la bandelette. Une partie de l'anticorps libre marqué (Ac marqué) est toujours capturé sur la ligne contrôle (contrôle positif). Si un antigène spécifique de *Plasmodium sp* cible (Ag cible) est présent, il se fixera avec l'anticorps libre marqué (Ac marqué) au colorant fluorescent. Puis le couple Ag cible-Ac marqué sera capturé par l'anticorps lié sur la ligne test (test positif).

Les RDT disponibles actuellement utilisent du sang ou du plasma, mais des études prometteuses ont rapporté la possibilité de détecter l'Ag HRP2 dans la salive [11,12].

II.2. Différents types de RDT

Les RDT disponibles actuellement détectent 3 types d'antigènes spécifiques de *Plasmodium sp*:

- L'histidine-rich protein 2 (HRP2) : un antigène spécifique de *P. falciparum*. Il peut persister dans l'organisme jusqu'à la 3^{ème} semaine après la guérison du paludisme [10].
- Le plasmodium lactate deshydrogenase (pLDH) : un antigène pan-spécifique des 5 espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*) [13] ou spécifique de *P. falciparum*, ou spécifique de *P. vivax*. Il disparaît rapidement après le traitement [14].
- L'aldolase : un antigène pan-spécifique des 4 espèces plasmodiales. Il disparaît rapidement après le traitement [14].

Plusieurs types de RDT existent en fonction du nombre d'antigènes spécifiques de *Plasmodium sp* qu'ils détectent (tableau 1). Un test détecte soit un seul type d'antigène, soit deux ou trois antigènes différents [15]. Ces derniers sont appelés les tests Combo.

Tableau 1. Différents types de RDT utilisés actuellement

Type	Description
1	HRP2 (spécifique de <i>P. falciparum</i>)
2	HRP2 (spécifique de <i>P. falciparum</i>) et aldolase (pan-spécifique)
3	HRP2 (spécifique de <i>P. falciparum</i>) et pLDH (pan-spécifique)
4	pLDH (spécifique de <i>P. falciparum</i>) et pLDH (pan-spécifique)
5	pLDH (spécifique de <i>P. falciparum</i>) et pLDH (spécifique de <i>P. vivax</i>)
6	HRP2 (spécifique de <i>P. falciparum</i>), pLDH (pan-spécifique), et pLDH (spécifique de <i>P. vivax</i>)
7	Aldolase (pan-spécifique)

HRP2: antigène histidine-rich protein 2 ; pLDH: antigène plasmodium lactate deshydrogenase

II.3. Réalisation d'un RDT

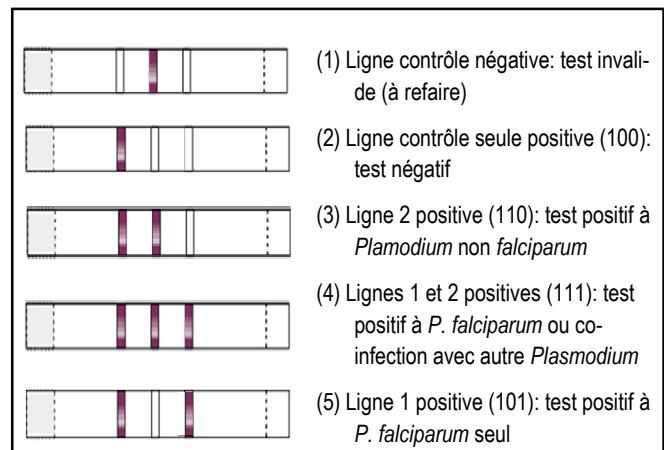
Les étapes de réalisation d'un test consistent successivement à :

- Lire attentivement les instructions avant de commencer le test
- Mettre des gants
- Ouvrir le kit pour retirer la cachette (figure 2), le tube capillaire, le tampon imbibé d'alcool et la lancette
- Inscrire le nom du patient sur le test
- Désinfecter le doigt avec un tampon imbibé d'alcool avant de piquer avec la lancette
- Essuyer la première goutte de sang
- Recueillir la deuxième goutte de sang avec le tube capillaire et déposer dans l'alvéole « S »
- Ajouter la solution tampon dans l'alvéole « A »
- Attendre 10 à 15 mn pour la lecture des résultats.

II.4. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats obtenus doit prendre en compte de l'histoire de la maladie, des antécédents médicaux, de l'état clinique du malade et surtout de la connaissance des antigènes spécifiques détectés par le RDT utilisé. Ici, nous avons pris comme exemple un RDT Combo Pf/Pan (figure 2), détectant dans la ligne 1 l'HRP2 (spécifique de *P. falciparum*) et dans la ligne 2 le pan-pLDH (pan-spécifique). Les résultats possibles sont résumés dans la figure 3.

Un RDT Combo positif à *P. falciparum* seul (101) pourrait avoir différentes interprétations. *Primo*, le patient a déjà reçu un traitement antipaludique dans les 3 dernières semaines. Dans ce cas, la goutte épaisse pourrait être faussement négative. Ainsi, si le traitement antipaludique n'était pas correct (molécule antipaludique utilisée, posologie et durée du traitement), il faut l'adapter. *Secundo*, il peut s'agir d'une réaction croisée avec *Schistosoma mekongi*, avec le facteur rhumatoïde ou avec d'autres auto-anticorps circulants [16]. La réalisation d'un examen microscopique, qui va être négatif, est indispensable pour éliminer le diagnostic d'un paludisme.

**Figure 3.** Résultats d'un RDT Combo Pf/Pan

III. Avantages de l'utilisation du RDT

L'utilisation de RDT :

- n'a besoin ni de matériels complexes ni d'électricité. Le RDT est facile à réaliser. Pour les personnels, une courte formation est suffisante et une connaissance médicale pointue n'est pas obligatoire. L'implication des agents communautaires, en Afrique comme à Madagascar depuis 2010, dans la prise en charge de paludisme simple la confirme [1].
- permet une meilleure prise en charge des malades fébriles. La mise en route d'un traitement antipaludique se fait dans un meilleur délai en cas de positivité du test. L'orientation immédiate vers d'autre maladie souvent potentiellement fatale se trouve ainsi accélérée, si le RDT est négatif [17]. Ceci explique l'augmentation de la prescription d'une antibiothérapie dans une étude utilisant le RDT pour le diagnostic d'une fièvre due au paludisme et celle liée à d'autres maladies [18]. Actuellement, l'OMS recommande l'utilisation obligatoire d'un examen microscopique dans les centres de santé de référence, les centres de santé de base disposant d'un laboratoire et les formations sanitaires privées. Mais tous ces centres peuvent aussi utiliser le RDT, comme les agents communautaires [9].
- évite l'administration inutile d'un traitement antipaludique. Une étude a rapporté que l'utilisation d'un RDT diminuait jusqu'à 75% la consommation d'antipaludique [18]. Ainsi, on diminue la pression aux antipaludiques, retarde l'apparition d'une résistance, limite les effets secondaires inutiles.
- a des impacts économiques individuels et nationaux conséquents [19]. Si tous les cas suspects bénéficieront d'un RDT (coût d'un RDT à 0,5 US \$) et si seulement, les cas de paludisme confirmé recevront un ACT (coût d'une association artéméther-luméfantrine à 1,40 US \$), les pays de la région Afrique de l'OMS pourront faire un bénéfice de 68 millions US \$ pour l'ensemble du secteur public [7].
- améliore la notification des cas de paludisme qui influencera sur la fiabilité des données de surveillance. Ce d'autant que l'on a besoin de ces données pour mettre un pays dans la phase de contrôle ou d'élimination du paludisme. Entre

2005 et 2010, la proportion des cas suspects notifiés soumis à un examen parasitologique a augmenté, notamment dans les régions Afrique (de 26 à 45%), Méditerranée orientale (de 60 à 91%) et Asie du Sud-Est, Inde non comprise (de 58 à 95%). Cette proportion reste faible dans la plupart des pays africains. Parmi 21 des 42 pays qui ont communiqué des informations sur cet examen, le pourcentage des cas testés était inférieur à 20% [7].

A Madagascar, le RDT a été utilisé dans les centres de santé de base (CSB) depuis 2007. Depuis, on a constaté une nette diminution du nombre des cas de paludisme, mais il faut noter aussi l'amélioration de la distribution des moustiquaires à imprégnation durable (MIDs) et de la campagne d'aspersion intradomiciliaire (CAID) (figure 4) [20]. Cette constatation est également rencontrée dans un service hospitalier universitaire (tableau 2) [21].

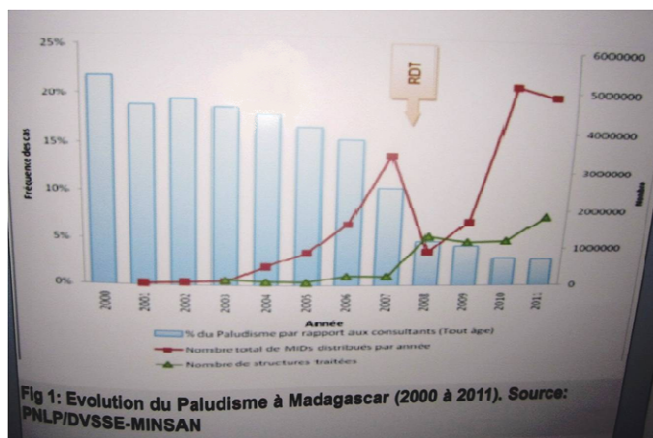


Figure 4. Evolution du nombre des cas de paludisme à Madagascar (2000-2011)

Tableau 2. Evolution du nombre des cas de paludisme dans le Service des maladies infectieuses de l'hôpital Joseph Raseta de Befelatanana de 2003 à 2008

Année	Cas de paludisme		Malades hospitalisés
	n	%	
2003	248	23,4	1 059
2004	306	22,9	1 335
2005	305	25,7	1 186
2006	158	10,3	1 538
2007	78	6,3	1 239
2008	57	4,3	1 331

RDT: test de diagnostic rapide du paludisme

IV. Fiabilité du RDT

Pour s'assurer de la fiabilité des RDT, l'OMS a fait 3 séries d'évaluations de la performance des tests de diagnostic rapide du paludisme depuis 2008. Le « score de dépistage

en série » d'un produit correspond au pourcentage d'échantillons contenant *Plasmodium sp* qui, dans la série, donnent un résultat positif pour deux RDT par lot à la densité parasitaire la plus faible (200 plasmodies/ μ L) et un test par lot à la densité parasitaire plus élevée (2000 ou 5000 plasmodies/ μ L) [22]. Il faut reconnaître que cette densité parasitaire faible est déjà située au-dessous de la densité parasitaire moyenne trouvée dans de nombreuses populations dans lesquelles le paludisme est endémique [22]. Plusieurs RDT ont régulièrement dépisté le paludisme à de faibles densités parasitaires, permettent de dépister *P. falciparum*, *P. vivax* ou les deux, et ont de faibles taux de faux positifs [23].

Les scores de dépistage varient énormément (1,3 à 100%) d'un produit à l'autre avec une densité parasitaire faible ; en revanche, quand celle-ci est élevée, ils sont majoritairement élevés aussi (>90%) [23]. L'OMS recommande les RDT détectant *P. falciparum* ayant un score de dépistage supérieur à 75% pour une densité parasitaire faible dans un pays à forte transmission de paludisme [24].

Pour la sensibilité clinique des RDT, nous résumons dans le tableau 3, les résultats d'une méta-analyse de 74 études [15]. La sensibilité de RDT recommandée par l'OMS, est supérieure ou égale à 95 % pour une densité parasitaire supérieure ou égale à 100 plasmodies/ μ L pour *P. falciparum* [25]. Les tests de type 2, 3, et 5 l'ont dépassé largement [15].

Tableau 3. Résultats d'une méta-analyse sur la sensibilité et la spécificité des RDT

Type	Sensibilité (IC: 95%)	Spécificité (IC: 95%)
1	94,8% (93,1% - 96,1%)	95,2% (93,2% - 96,7%)
2	96,0% (94,0% - 97,3%)	95,3% (87,3% - 98,3%)
3	99,5% (71,0% - 100%)	90,6% (80,5% - 95,7%)
4	91,5% (84,7% - 95,3%)	98,7% (96,9% - 99,5%)
5	98,4% (95,1% - 99,5%)	97,5% (93,5% - 99,1%)
6	ND	ND
7	ND	ND

1 à 7: type de test selon le nombre des antigènes plasmodiaux spécifiques qu'il détecte (voir tableau 1) ; ND: non disponible

Mais, des doutes persistent toujours quant à la fiabilité de RDT. Ceux-ci viennent de l'existence des résultats discordant avec RDT négatif mais examen microscopique positif. Plusieurs études, dans des contextes différents ont démontrées la fiabilité de RDT en routine qui peut devancer même celle de l'examen microscopique [26-29]. Selon Kahama-Marro et al et Stauffer et al, la sensibilité de RDT vs examen microscopique réalisé en routine a été respectivement de 97% vs 71,4% [29] et 97% vs 85% [27].

V. Facteurs interférant avec les résultats du RDT

Les facteurs interférant avec les résultats de RDT sont :
- le respect de la date de péremption

- le respect de la bonne réalisation. L'évaluation de la performance des RDT réalisée par l'OMS a démontré qu'ils sont relativement faciles à utiliser [23]. Il faut suivre « à la lettre » les conditions de réalisation comme la quantité de sang recommandée et le délai de la lecture
- les conditions de transport et de conservation. Elles concernent surtout la thermostabilité et la résistance à l'humidité. Les RDT pré-qualifiés par l'OMS ont tous passé des tests de thermostabilité au bout de 60 jours d'incubation à 35°C et 45°C et à une humidité élevée. Ils sont stables aux températures tropicales [23]
- l'assurance qualité. La performance des tests a varié selon les lots, avec de grandes variations entre des produits similaires, ce qui confirme le bien-fondé de tester les lots après leur achat et avant de les utiliser sur le terrain [23].

VI. Limites du RDT

L'examen microscopique reste la référence pour le diagnostic du paludisme. Les limites du RDT sont comparées à celui-ci [5,10]:

- La densité parasitaire ne peut pas être quantifiée par le RDT
- Toutes les espèces plasmodiales ne peuvent pas être différenciées par le RDT. On distingue habituellement *P. falciparum* et *P. vivax*
- Les RDT ne permettent pas de distinguer les stades de parasites
- L'antigène HRP2 persiste jusqu'à 3 semaines après un traitement et une clearance parasitaire. Il est difficile dans ce cas de faire la différence entre la rechute, la résistance aux antipaludiques et la cinétique normale de HRP2.
- Les RDT ne permettent pas de suivre la guérison du paludisme

Conclusion

A côté de la facilité d'utilisation, les RDT ont montré leur fiabilité dans le diagnostic du paludisme. Ils constituent une vraie opportunité pour l'amélioration de la prise en charge de la fièvre et du paludisme. L'amélioration du diagnostic permet à chaque pays d'avoir des données fiables sur l'évolution de la prévalence du paludisme. D'autant plus que le continuum vers l'élimination du paludisme décrit par l'OMS repose obligatoirement sur la prévalence des cas de paludisme confirmé. L'accessibilité par les formations sanitaires publiques et privés reste à résoudre pour pouvoir tirer tous les bénéfices de RDT.

Références

1. WHO. World malaria report 2011. 2011, Global Malaria Programme: Geneva.
2. WHO. A global strategy for malaria control. 1993, World Health Organization: Geneva.

3. WHO. Severe and complicated malaria. Second edition. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1990; 84(Suppl 2): 23–5.
4. WHO. Malaria diagnosis: Memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 1988; 66: 575–94.
5. WHO. New perspectives. Malaria diagnosis. 2000, World Health Organization/USAID: Geneva.
6. WHO. Guidelines for the treatment of malaria, second edition. 2010, World Health Organization: Geneva.
7. WHO. World malaria report 2010. 2010, World Health Organization: Geneva.
8. WHO. The T3: Test, Treat, Track initiative. 2012, World Health Organization: Geneva.
9. WHO. Universal access to malaria diagnostic testing: an operational manual. 2011, World Health Organization: Geneva.
10. Makler MT. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92(4): 419–33.
11. Wilson N. Detection of *Plasmodium falciparum* Histidine-rich Protein II in saliva of malaria patients. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(5): 733–5.
12. Fung AO, Damoiseaux R, Grundeen S, et al. Quantitative detection of PfHRP2 in saliva of malaria patients in the Philippines. *Malaria J* 2012; 11: 175.
13. Kawai S, Hirai M, Haruki K, et al. Cross-reactivity in rapid diagnostic tests between human malaria and zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infections. *Parasitol Intern* 2009; 58: 300–2.
14. Wilson LM. Malaria rapid diagnostic test. *Clin Infect Dis* 2012; 54(11): 1637–41.
15. Abba K, Deek JJ, Olliaro PL, et al. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 7: CD008122.
16. Leshem E, Keller N, Guthman D, et al. False positive *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 immunocapture assay in acute schistosomiasis caused by *Schistosoma mekongi*. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2331–32.
17. D'Acremont V, Greub G, Genton B. Tests diagnostiques rapides (TDR) : la panacée pour le praticien ? *Rev Med Suisse* 2011; 7: 984–90.
18. D'Acremont V, Kahama-Maró J, Swai N, et al. Reduction of anti-malarial consumption after rapid diagnostic tests implementation in Dar es Salaam: a before-after and cluster randomized controlled study. *Malaria J* 2011; 10: 107.
19. Faye A., Ndiaye N, Diagne-Kamara M, et al., Evaluation économique des tests de diagnostic rapide dans le traitement du paludisme. *Sante Publique* 2010; 22: 617–23.
20. DVSSE. Evolution du nombre des cas du paludisme à Madagascar (2000 à 2011). In 3è Journée de la Société de Pathologie Infectieuse de Madagascar. 2012. Antananarivo.
21. Rakotoarivelo R, Andrianasolo R, Rakoto Sedson R, et al. Test de diagnostic rapide du paludisme : l'expérience malgache. *Méd Trop* 2010; 70(1): 103–4.
22. OMS. Résultats de l'évaluation par l'OMS des tests diagnostiques rapides du paludisme : série 1 (2008). 2008, Organisation Mondiale de la Santé/Foundation for Innovative New Diagnostics: Genève.
23. OMS. Performance des tests de diagnostic rapide du paludisme. Bilan des résultats d'évaluation des produits par l'OMS : Séries 1-3 (2008-2011). 2011, Organisation Mondiale de la Santé/Foundation for Innovative New Diagnostics: Genève.
24. WHO. Inaugural meeting of the malaria policy advisory committee to the WHO: conclusions and recommendations. *Malaria J* 2012; 11: 137.
25. WHO. Malaria rapid diagnosis: Making It work. 2003, World Health Organization: Manila.
26. Moges B, Amare B, Belyhun Y, et al. Comparison of CareStart™ HRP2/pLDH COMBO rapid malaria test with light microscopy in northwest Ethiopia. *Malaria J* 2012; 11: 234.
27. Stauffer W, Cartwright CP, Olson D, et al. Superior diagnostic performance of

- malaria rapid diagnostic tests as compared to blood smears in U.S. clinical practice. *Clin Infect Dis* 2009; 49(6): 908–13.
28. Batwala V, Magnussen P, Nuwaha F. Are rapid diagnostic tests more accurate in diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria compared to microscopy at rural health centres? *Malaria J* 2010; 9: 349.
29. Kahama-Maró J, D'Acremont V, Mtasiwa D, *et al*. Low quality of routine microscopy for malaria at different levels of the health system in Dar es Salaam. *Malaria J* 2011; 10: 332.
30. RBM. The global action for a free malaria world. 2008, Roll Back Malaria Partnership: Geneva.