

MICROBIOLOGIE/MICROBIOLOGY

Infections submicroscopiques à *Plasmodium* spp. chez les patients fébriles au TogoSubmicroscopic *Plasmodium* spp. Infections in Febrile Patients in Togo

Diwaba Carmel TEOU*, Essoham ATABA, Smaila ALIDOU, Kossi YAKPA, Efoe SOSSOU, Manani HEMOU, Aguerigna ABDU-KERIM, Awèréou KOTOSSO, Lidaw Déassoua BAWE, Didier MÉNARD, Ameyo Monique DORKENOO

RÉSUMÉ **Objectif.** Les infections submicroscopiques à *Plasmodium*, la plupart du temps non détectées par les techniques de diagnostic de routine, constituent un réservoir potentiel qui participe au maintien de la transmission du paludisme dans la population. Pour atteindre l'objectif d'élimination fixé par l'Organisation mondiale de la santé, il est donc crucial d'identifier tous les porteurs de parasites et de les traiter efficacement avec les antipaludiques recommandés. L'objectif de cette étude était d'estimer la proportion des infections submicroscopiques à *Plasmodium* spp., non détectées par la microscopie, chez les patients symptomatiques suspects de paludisme consultant dans les centres de santé au Togo et d'identifier les facteurs qui y sont associés.

Matériel et méthodes. Une étude transversale a été conduite entre septembre 2021 et janvier 2022 et entre juillet et décembre 2022 dans trois formations sanitaires du Togo. Chaque patient suspect de paludisme a bénéficié d'un prélèvement de sang capillaire pour la recherche des espèces plasmodiales par goutte épaisse/frottis sanguin (GE/FS) et PCR. Un modèle de régression logistique a été utilisé pour évaluer les facteurs associés aux résultats parasitologiques.

Résultats. Un total de 553 participants dont 44,6 % de sexe féminin avec un âge médian de 25 ans (± 2 ans) a été retenu. La proportion des infections à *Plasmodium* spp. détectées par GE/FS était de 25 % et par PCR de 29,1 %. La fréquence des infections submicroscopiques à *Plasmodium* spp. repérées par PCR chez les patients présentant une GE/FS négative à la microscopie était de 5,5 % (23/415) [IC 95 % : 3,7-8,2] et *P. falciparum* représentait l'espèce la plus fréquente (83 %, 19/23, IC 95 % : 60-94). Les participants des sites d'Anié et de Kouvè étaient plus fréquemment porteurs d'infections submicroscopiques.

Conclusion. Cette étude fournit les données préliminaires de la fréquence des infections submicroscopiques à *Plasmodium* au Togo.

Mots clés : Prévalence, Infections submicroscopiques, Paludisme, *Plasmodium falciparum*, Réservoir, Élimination, Togo, Afrique subsaharienne

ABSTRACT **Objective.** Submicroscopic *Plasmodium* infections, mostly undetected by routine diagnostic techniques, represent a potential reservoir that contributes to the continued transmission of malaria in the community. To achieve the World Health Organization's goal of malaria elimination, it is therefore essential to identify all parasite carriers and treat them effectively with recommended antimalarial drugs. The aim of this study was to estimate the proportion of submicroscopic *Plasmodium* spp. infections not detected by microscopy in symptomatic patients with suspected malaria attending health centers in Togo, and to identify the factors associated with it.

Materials and methods. A cross-sectional study was conducted between September 2021 and January 2022 and between July and December 2022 in three health facilities in Togo. Each patient suspected of having malaria had a capillary blood sample taken for detection of *Plasmodium* species by thick blood film/blood smear (TBF/BS) and PCR. A logistic regression model was used to evaluate the factors linked to the parasitic results.

Results. A total of 553 participants were selected, 44.6% of whom were female, with a median age of 25 years (± 2 years). The proportion of *Plasmodium* spp. infections detected by TBF/BS was 25% and by PCR 29.1%. The frequency of submicroscopic *Plasmodium* spp. infections detected by PCR in patients with negative microscopic TBF/BS was 5.5% (23/415) [95% CI: 3.7-8.2], and *P. falciparum* was the most common species (83%, 19/23, 95% CI: 60-94). Participants from the Anié and Kouvè sites were more likely to have submicroscopic infections.

Conclusion. This study provides preliminary data on the incidence of submicroscopic *Plasmodium* infections in Togo.

Key Words: Prevalence, Submicroscopic infections, Malaria, *Plasmodium falciparum*, Reservoir, Elimination, Togo, Sub-Saharan Africa

Introduction

La capacité des systèmes de santé des pays d'endémie palustre à détecter les infections à *Plasmodium* spp. est essentielle pour la surveillance et le contrôle efficace de l'endémie [30]. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) [19] recommande l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour le traitement des cas non compliqués à *P. falciparum* et de l'artésunate par voie intraveineuse ou intramusculaire pendant au moins 24 h, complétée par une CTA pour les cas de paludisme grave.

Au Togo, en plus de ces recommandations implémentées depuis 2005 [11], la mise en œuvre réussie d'autres stratégies de prévention, notamment la distribution de moustiquaires à imprégnation durable, le traitement préventif intermittent avec la sulfadoxine-pyriméthamine chez les femmes enceintes et la chimio prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de 3 à 59 mois avec l'association sulfadoxine-pyriméthamine et amodiaquine pendant la saison de forte transmission palustre, de même que l'amélioration du diagnostic et du traitement des cas confirmés pourraient expliquer la baisse observée de la prévalence du paludisme chez les enfants âgés de 6-59 mois, passée de 36 % à 28 % entre 2014 et 2017 [15]. S'agissant des décès, la létalité due au paludisme en 2022 était de 2,1 % contre 3,6 % en 2019 [16].

Les directives nationales recommandent que tous les cas suspects de paludisme soient confirmés par une goutte épaisse (GE), un frottis sanguin (FS) ou un test de diagnostic rapide (TDR) avant tout traitement antipaludique. Du fait de leur facilité d'utilisation et de la mise à disposition rapide des résultats, les TDR ont été tout d'abord utilisés dans les formations sanitaires sans microscopie et dans la communauté par les agents de santé communautaire, puis récemment même dans les structures sanitaires avec microscopie. Les TDR actuellement utilisés sont spécifiques à l'espèce *P. falciparum* [16]. Toutefois, l'examen microscopique par GE et FS demeure la référence; il permet la mise en évidence des différents stades d'espèces plasmodiales et l'estimation de la densité parasitaire (DP). Le seuil de détection des espèces plasmodiales par cette approche, estimé entre 10 et 20 parasites/ μ L [9], reste bien plus élevé que celui de la biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction, PCR) estimé à 0,002 parasites/ μ L [29], permettant de déceler les cas d'infections submicroscopiques (IS). Dans les pays à ressources limitées et endémiques au paludisme, la PCR est souvent utilisée pour la confirmation biologique

Introduction

The ability of health systems in malaria-endemic countries to detect *Plasmodium* spp. infections is essential for effective surveillance and control of the endemic disease [30]. The World Health Organization (WHO) [19] recommends the use of artemisinin-based combination therapies (ACTs) for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* cases and intravenous or intramuscular artesunate for at least 24 hours, supplemented by ACTs for severe malaria cases.

In Togo, in addition to these recommendations, which have been implemented since 2005 [11], other prevention strategies have been successfully implemented, including the distribution of long-lasting insecticide-treated nets, intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in pregnant women and seasonal malaria chemoprevention in children aged 3-59 months with the combination of sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine during the high transmission season, as well as improved diagnosis and treatment of confirmed cases. They could explain the observed decline in malaria prevalence in children aged 6-59 months from 36% to 28% between 2014 and 2017 [15]. In terms of deaths, the malaria case fatality rate was 2.1% in 2022, compared with 3.6% in 2019 [16].

National guidelines recommend that all suspected cases of malaria be confirmed by a thick blood film (TBF), blood smear (BS) or rapid diagnostic test (RDT) before any antimalarial treatment. Because of their ease of use and rapid availability of results, RDTs were first used in health facilities without microscopy and by community health workers, and more recently in health facilities with microscopy. The RDTs currently in use are specific for *P. falciparum* species [16]. However, TBF/BS microscopic examination remains the benchmark; it allows the detection of different stages of *Plasmodium* species and the estimation of parasite density (PD). The detection threshold for *Plasmodium* species using this approach, estimated to be between 10 and 20 parasites/ μ L [9], remains much higher than that of molecular biology (polymerase chain reaction, PCR), which is estimated to be 0.002 parasites/ μ L [29], making it possible to detect cases of submicroscopic infection (SI). In resource-limited and malaria-endemic countries, PCR is often used for biological confirmation during epidemiological studies and evaluation of antimalarial drug efficacy, but not routinely [9,12].

The proportion of IS varies according to the

lors des études épidémiologiques et d'évaluation de l'efficacité des antipaludiques mais pas en routine [9,12].

La proportion des IS varie selon le contexte épidémiologique et les populations atteintes [21,27]; la contribution de ce réservoir au maintien de la transmission du paludisme dépend de l'endémicité et du taux de positivité des cas de paludisme détectés dans une zone donnée [12]. En effet, Okell *et al.* ont rapporté qu'au niveau mondial, la prévalence des IS est inversement corrélée à la DP [17]. D'autres études ont également suggéré que, en zone de faible transmission, la proportion d'IS est souvent plus forte que celles détectables par la microscopie et qu'elle risque d'augmenter au fur et à mesure que les programmes de lutte continueront à réduire l'intensité de la transmission du paludisme [5,13]. En outre, il a été montré que la fréquence des IS est non négligeable dans les zones à forte transmission, et que ces infections joueraient un rôle dans le développement de l'immunité partielle non stérilisante contre le paludisme [26].

En Afrique de l'Ouest, des cas d'IS ont été documentés dans certaines études. Au Bénin, Agohossou *et al.* [2], ainsi que Telfils *et al.* [28] ont rapporté dans leurs études une prévalence d'infections submicroscopiques de 30,6 % et 30,4 %, respectivement. Au Ghana, Amoah *et al.* [4] ont observé que cette prévalence était de 33,8 %. Au Togo, les infections submicroscopiques n'ont pas encore été documentées. Cette étude a été menée en vue d'estimer la proportion des infections submicroscopiques à *Plasmodium* spp. non détectées à la microscopie chez les patients symptomatiques suspects de paludisme consultant dans les centres de santé au Togo et d'identifier les facteurs qui y sont associés.

epidemiological context and the populations affected [21,27]. The contribution of this reservoir to sustaining malaria transmission depends on the endemicity and the positivity rate of malaria cases detected in a given area [12].

Okell *et al.* reported that, globally, the prevalence of IS is inversely correlated with PD [17]. Other studies have also suggested that the proportion of SI is often higher than microscopically detectable in low transmission areas and is likely to increase as control programs continue to reduce the intensity of malaria transmission [5,13]. It has also been shown that the incidence of SI is not negligible in high transmission areas and that these infections play a role in the development of partial, non-sterilizing immunity to malaria [26]. In West Africa, some studies have documented cases of SI. In Benin, Agohossou *et al.* [2] and Telfils *et al.* [28] reported a prevalence of submicroscopic infections of 30.6% and 30.4%, respectively. In Ghana, Amoah *et al.* [4] reported a prevalence of 33.8%. In Togo, submicroscopic infections have not yet been documented. This study was conducted to estimate the proportion of submicroscopic *Plasmodium* spp. infections not detected by microscopy in symptomatic malaria suspects attending health centers in Togo and to identify factors associated with them.

Matériel et méthodes

Une étude transversale a été conduite entre septembre 2021 et janvier 2022 à l'hôpital « La Providence » de Kouvé et à l'hôpital de district (HD) d'Anié, et de juillet à décembre 2022 au Centre hospitalier régional Lomé Commune (CHR-LC). L'hôpital « La Providence » de Kouvé, situé dans la région maritime, est à environ 76 km de Lomé et l'HD d'Anié, situé dans la région des plateaux, est à 188 km de Lomé. Ces deux formations sanitaires font partie des six sites sentinelles institués par le ministère de la Santé pour le suivi de l'efficacité des antipaludiques. Ils représentent le premier niveau de contact avec les patients. Par

Materials and methods

A cross-sectional study was conducted between September 2021 and January 2022 at the 'La Providence' hospital in Kouvé and the District Hospital (DH) in Anié, and between July and December 2022 at the Lomé Commune Regional Hospital Centre (CHR-LC). The La Providence hospital in Kouvé, located in the maritime region, is about 76 km from Lomé, and the Anié district hospital, located in the plateau region, is 188 km from Lomé. These two health facilities are among the six sentinel sites established by the Ministry of Health to monitor the effectiveness of antimalarial drugs. They are the first point of

ailleurs, afin de prendre en compte le deuxième niveau de l'organisation pyramidale du système sanitaire du Togo, le CHR-Lomé commune, situé dans la région sanitaire du Grand-Lomé, structure de niveau intermédiaire, a été ajouté. Il couvre l'aire géographique de la capitale Lomé et ses banlieues. Ces trois sites représentent les trois régions sanitaires au sud du pays.

La population d'étude était constituée de patients symptomatiques, suspects de paludisme, pour lesquels des examens de GE/FS ont été prescrits. Tout patient, quel que soit son âge, reçu dans le service de consultation générale de l'un des établissements de santé participant à l'étude, présentant une température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ (ou des antécédents de fièvre au cours des précédentes 24 heures avec suspicion de paludisme) était inclus dans l'étude. Il devait avoir donné son consentement éclairé (directement ou *via* les parents/tuteurs pour les enfants).

Après avoir complété le formulaire permettant de collecter les informations socio-démographiques, les signes cliniques présentés et les antécédents médicaux, chaque patient retenu a bénéficié d'un prélèvement de sang capillaire pour la réalisation de la GE/FS et de confettis sanguins sur du papier Wattman de type III.

La GE et le FS confectionnés sur la même lame étaient colorés au Giemsa 3 % après avoir fixé le FS au méthanol pendant quelques secondes [20]. Les lames après séchage étaient ensuite lues au microscope à l'objectif x 100 pour déterminer la positivité, identifier les espèces plasmodiales et pour estimer la DP. Cette DP était exprimée en nombre de plasmodies asexuées par microlitre de sang suivant la formule: nombre de plasmodies dénombrées x 8 000 / nombre de leucocytes dénombrés.

Pour extraire l'ADN, des confettis sanguins étaient découpés avec des ciseaux et transférés sur des plaques à 96 puits. L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit Qiagen RLT-plus[®] selon le protocole du fabricant avec quelques modifications [1]. À chaque puits, ont été ajoutés 750 µl de tampon de lyse, 500 µL de tampon de lavage 1, 500 µl de tampon de lavage 2 et 100 µl de tampon d'élution (Tris-EDTA). L'extraction a été effectuée à la température et au temps d'incubation recommandés et à la vitesse de centrifugation indiquée par le fabricant. Enfin, les plaques d'élution contenant l'ADN extrait ont été stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les échantillons étaient criblés pour la présence d'ADN de *Plasmodium* spp. à l'aide d'un test PCR

contact with an health facility for the patients. To take account of the second level of the pyramidal organization of the Togolese health system, the CHR-Lomé commune, an intermediate structure located in the Greater Lomé Health Region, has been added. It covers the geographical area of the capital Lomé and its suburbs. These three sites represent the three health regions in the south of the country.

The study population consisted of symptomatic patients with suspected malaria for whom TBF/BS tests were prescribed. Any patient, regardless of age, who presented to the general outpatient clinic of one of the participating health facilities with an axillary temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ (or a history of fever in the previous 24 hours with suspected malaria) was included in the study. They had to have given informed consent (directly or, in the case of children, through their parents/guardians). After completing the form used to collect socio-demographic information, presenting clinical symptoms and medical history, each selected patient had a capillary blood sample taken for TBF/BS and blood confetti on Wattman type III paper. TBF and BS, prepared on the same slide, were stained with 3% Giemsa after the BS was fixed in methanol for a few seconds [20]. After drying, the slides were examined under a microscope at x100 magnification to determine positivity, identify the *Plasmodium* species and estimate the PD. This PD was expressed as the number of asexual plasmodia per microliter of blood according to the formula: number of plasmodia counted x 8,000 / number of leukocytes counted.

For DNA extraction, blood confetti were cut out with scissors and transferred to 96-well plates. Genomic DNA was extracted using the Qiagen RLT-plus[®] Kit according to the manufacturer's protocol with some modifications [1]. Each well was filled with 750 µL lysis buffer, 500 µL wash buffer 1, 500 µL wash buffer 2 and 100 µL elution buffer (Tris-EDTA). Extraction was performed at the recommended temperature, incubation time and centrifugation speed as indicated by the manufacturer. Finally, the elution plates containing the extracted DNA were stored at -80°C until use. Samples were screened for the presence of *Plasmodium* spp. DNA using a qualitative real-time PCR assay targeting the cytochrome b gene. The products for the positive samples were then diluted 1:10 and analyzed using a real-time PCR assay with primers targeting the same gene fragment and specific for each species (PCR for the species *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*

qualitatif en temps réel ciblant le gène cytochrome b (*screening*). Les produits pour les échantillons positifs ont ensuite été dilués au 1:10 et analysés à l'aide d'un test PCR en temps réel avec des amorces ciblant le même fragment de gène et spécifiques à chaque espèce (PCR pour les espèces *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*). Tous les tests en temps réel ont été effectués à l'aide du *master mix PCR SYBR green* (Solis Biotec, Tartu, Estonia) sur un extrait d'ADN de 5 µl avec le système de PCR en temps réel BioRad CFX96). Des détails sur le programme, la composition du mélange et les séquences d'amorces ont été décrits par Canier *et al.* [6,7].

Les lames de GE/FS des sujets inclus étaient soumises à une relecture par deux microscopistes expérimentés [18]. Dans les cas où le coefficient de variation entre les résultats des deux microscopistes du contrôle de qualité était supérieur à 5 %, une troisième lecture a été faite par un autre microscopiste indépendant [20]. En cas de différence entre la DP des sites et celle de l'équipe de contrôle de qualité, nous avons considéré la DP du contrôle de qualité.

Pour chaque analyse par *PCR screening*, un ensemble de quatre contrôles (deux contrôles positifs dont un positif élevé et un faiblement positif, et deux contrôles négatifs correspondant à de l'eau) a été ajouté dans chaque plaque à 96 puits. Pour la validation des espèces, les constructions plasmidiques décrites précédemment ont été utilisées dans chaque test PCR [7].

Une formation des membres de l'équipe des sites et des superviseurs a été faite pour standardiser les méthodes de travail et garantir le bon déroulement de l'activité notamment pour le remplissage des questionnaires, la réalisation de la GE/FS et le prélèvement sur papier filtre.

La variable dépendante est une variable binaire indiquant la présence (positif: codé 1) ou l'absence (négatif: codé 0) d'une infection submicroscopique. Cette infection est définie comme une infection parasitaire de faible densité au stade sanguin du paludisme qui n'est pas détectée par la GE/FS, mais qui est uniquement détectée par la PCR, considérée comme la méthode de référence [18].

Les variables indépendantes incluent les sites d'études, à savoir le CHR-LC, l'HD d'Anié et l'hôpital Kouvé, ainsi que des caractéristiques sociodémographiques et cliniques. Le sexe des participants est distingué (féminin ou masculin) et l'âge réparti en trois groupes: les moins de 5 ans, ceux âgés de 5 à 34 ans et les patients de 35

and *P. ovale*). All real-time assays were performed using the master mix PCR SYBR green (Solis Biotec, Tartu, Estonia) on a 5 µL DNA extract using the BioRad CFX96 real-time PCR system. Details of the program, mixture composition and primer sequences have been described by Canier *et al.* [6,7].

The TBF/BS slides of the included subjects were reviewed by two experienced microscopists [18]. In cases where the coefficient of variation between the results of the two quality control microscopists was greater than 5%, a third reading was performed by another independent microscopist [20]. In the event of a difference between the PD observed in the health facilities and the one by the quality control team we considered the quality control PD.

For each PCR screening analysis, a set of four controls (two positive controls, one high positive and one low positive, and two negative controls corresponding to water) was added to each 96-well plate. To validate the species, the plasmid constructs described above were used in each PCR assay [7].

Training was provided to the field team members and supervisors to standardize working methods and ensure the smooth running of the activity, particularly for the completion of questionnaires, the performance of the TBF/BS and the collection of samples on filter paper.

The dependent variable is a binary variable indicating the presence (positive: coded 1) or absence (negative: coded 0) of submicroscopic infection. This infection is defined as a low density parasitic infection in the blood stage of malaria not detected by TBF/BS, but only by PCR, which is considered the reference method [18].

The independent variables include the study sites, namely CHR-LC, HD d'Anié and Kouvé hospital, as well as socio-demographic and clinical characteristics. The sex of the participants is distinguished (female or male) and the age is divided into three groups: under 5 years, 5 to 34 years and 35 years and older. Temperature was categorized as normal <37.5°C or high ≥37.5°C, and self-medication was coded as absent (no) or present (yes). For occupation, participants were categorized as employees, pieceworkers, students, children, and others. Finally, residence distinguished between urban and rural residents. These variables were selected based on their relevance in the existing literature and have been analyzed in similar studies [12,14,23,32].

All data collected were entered into a database

ans et plus. La température est classée comme normale $<37,5^{\circ}\text{C}$ ou élevée $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ et l'automédication codée comme absente (non) ou présente (oui). Concernant la profession, les participants sont catégorisés comme salariés, travailleurs à la tâche, élèves/étudiants, enfants et autres. Enfin, la résidence distingue les urbains des ruraux. Ces variables ont été sélectionnées sur la base de leur pertinence dans la littérature existante et ont fait l'objet d'analyses dans les études similaires [12,14,23,32].

Toutes les données collectées ont été saisies en une base de données dans le tableur Microsoft Excel (Microsoft Corp, Redmond, Washington, USA) et analysées à l'aide du logiciel *stata* 16 (StataCorp LLC). Les données qualitatives ont été présentées en proportions suivies de leur IC95 % et celles quantitatives décrites en médianes avec leurs intervalles interquartiles. Les échantillons négatifs à la fois à la GE/FS et à la PCR ont été comparés à ceux négatifs à la GE/FS et positifs à la PCR. Pour ces analyses, le test exact de Fisher a été utilisé pour la comparaison des groupes et la régression logistique pour identifier une association possible avec les facteurs étudiés. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Les variables candidates à la régression logistique multiple étaient celles ayant une valeur de p inférieure ou égale à 0,20 lors de l'analyse préliminaire.

Le protocole d'étude a obtenu l'accord du Comité de bioéthique pour la recherche en santé (CBRS) du Togo (n°021/2021/CBRS du 24 mai 2022). De plus, un consentement signé a été exigé des adultes ou des parents/tuteurs lorsqu'il s'agissait d'enfants. Tout patient détecté positif à la GE/FS a été adressé aux cliniciens des établissements participants pour la prise en charge gratuite avec de l'artéméther-luméfántrine ou la dihydroartémisinine-pipéraquine comme recommandé par le Programme national de lutte contre le paludisme (PNLP).

Résultats

Un total de 553 patients suspects de paludisme a été inclus sur l'ensemble des sites : 138 avaient une GE positive (Tableau I). La recherche des cas d'infections submicroscopiques par *PCR screening* a été effectuée sur les 415 prélèvements négatifs par la GE/FS (Fig. 1).

L'âge moyen des patients était de 25 ans (± 2 ans) et le sex-ratio (M/F) de 1,2. La température corporelle à l'admission $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ a été notée chez 77,8 %

in Microsoft Excel (Microsoft Corp, Redmond, Washington, USA) and analyzed using Stata 16 (StataCorp LLC). Qualitative data were presented as proportions followed by their 95% CIs, and quantitative data were described as medians with their interquartile ranges. Samples that were negative for both TBF/BS and PCR were compared with those that were negative for TBF/BS and positive for PCR. For these analyses, Fisher's exact test was used to compare groups, and logistic regression was used to identify a possible association with the factors studied. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. Variables with a p -value of less than or equal to 0.20 in the preliminary analysis were considered for multiple logistic regression.

The study protocol was approved by the Togolese Bioethics Committee for Health Research (CBRS) (No. 021/2021/CBRS of May 24, 2022). In addition, a signed informed consent form was required from adults or parents/guardians in the case of children. Any patient testing positive for TBF/BS was referred to clinicians at participating facilities for free treatment with artemether-lumefantrine or dihydroartemisinin-piperaquine as recommended by the National Malaria Control Program (NMCP).

Results

A total of 553 patients with suspected malaria were included across all sites: 138 had a positive TBF (Table I). The search for cases of submicroscopic infections by PCR screening was carried out on the 415 negative samples by TBF/BS (Fig. 1).

The average age of the patients was 25 years (± 2 years) and the sex ratio (M/F) was 1.2. A body temperature on admission of $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ was recorded in 77.8% of them, the others having

Tableau I : Nombre total d'échantillons inclus par site

Table I: Total number of samples included by site

Sites / Sites	Kouvé n (%)	HD Anié n (%)	CHR-LC n (%)
GE/FS / TBF/BS			
négative / negative (n = 415)	99 (17,9)	113 (20,4)	203 (36,7)
positive / positive (n = 138)	35 (6,3)	103 (18,6)	0 (0)
total / total (n = 553)	134 (24,2)	216 (39,1)	203 (36,7)
PCR / PCR			
négative / negative (n = 392)	89 (16,1)	103 (18,6)	200 (36,2)
positive / positive (n = 161)	45 (8,1)	113 (20,4)	3 (0,5)
total / total (n = 553)	134 (24,2)	216 (39,1)	203 (36,7)

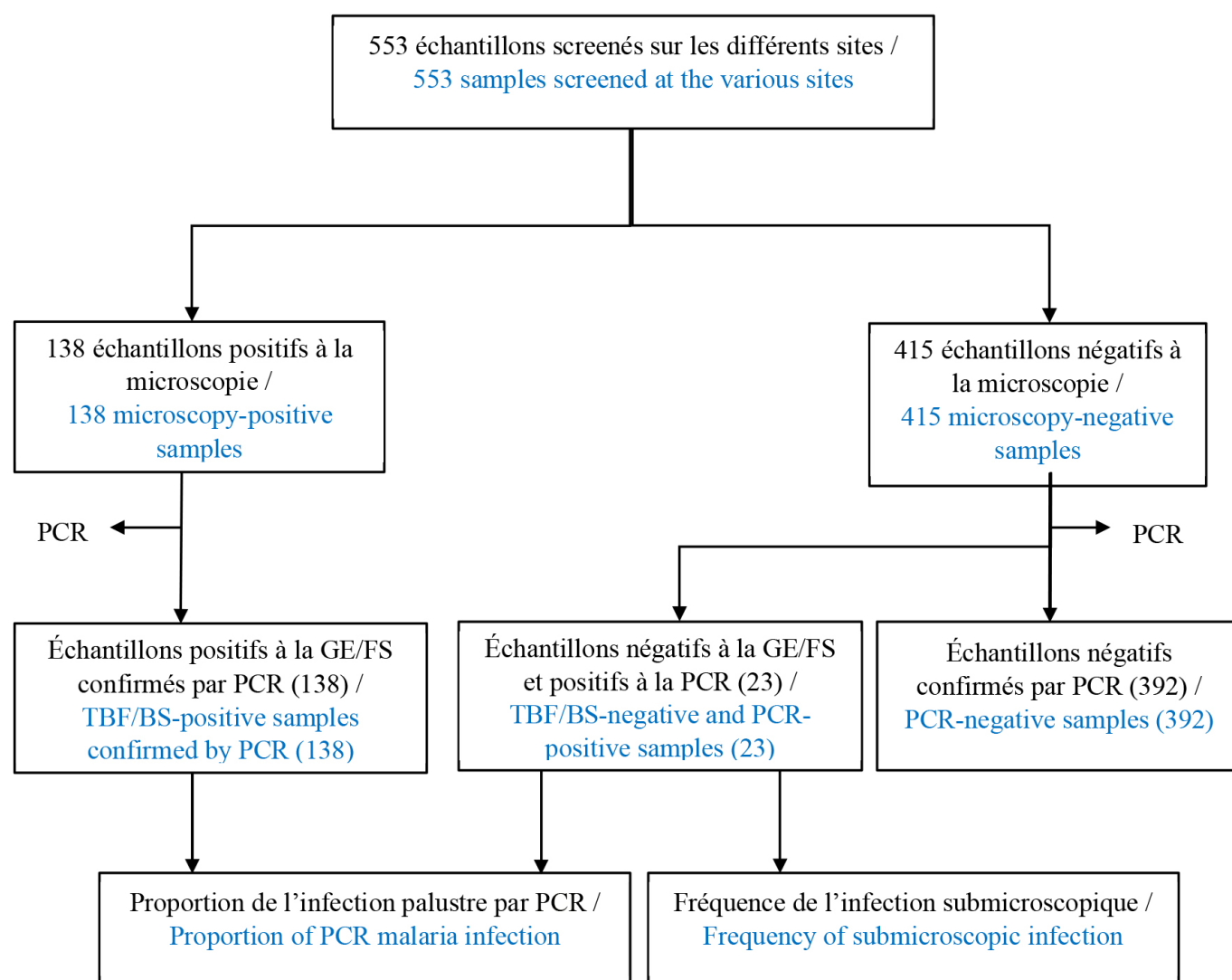


Figure 1 : Diagramme de l'étude

Figure 1: Study flow chart

d'entre eux, les autres ayant eu un antécédent fébrile dans les 24 heures avant la consultation. Les données sociodémographiques des patients sont résumées dans le Tableau III.

La détection du génome plasmodial par PCR s'est faite sur l'ensemble des 553 inclus (Tableau I). En comparant les deux méthodes, la PCR a détecté davantage de cas positifs, soit 29,1 % (161/553) contre 25 % (138/553) en microscopie (Tableau I). La fréquence des infections submicroscopiques à *Plasmodium* spp. a été de 5,5 % (23/415) [IC 95 % : 3,7-8,2]. La majorité de ces infections était à *P. falciparum*, soit 83 % (19/23) [IC 95 % : 60-94] des cas. *P. malariae* était trouvé dans 9 % (2/23) [IC 95 % : 2-31] de ces infections submicroscopiques, de même que l'association *P. falciparum*-*P. malariae*, dans 9 % (2/23) [IC 95 % : 2-31] des cas (Tableau II). Aucun cas d'infection submicroscopique à *P. vivax* ou *P. ovale* n'a été identifié parmi les patients étudiés.

Parmi les 415 échantillons négatifs à la GE/FS et testés par PCR, les participants des sites d'Anié et de Kouvé avaient respectivement 6 (RC, 6,47 [IC 95 % : 1,74-24,03] ; $p = 0,005$) et 7 (RC, 7,49 [IC 95 % : 2,01-27,88] ; $p = 0,003$) fois plus de risque d'avoir une IS. Bien que la fréquence de ces infections soit plus élevée chez les moins de cinq ans, aucune différence significative en fonction de l'âge ni du sexe n'a été observée. L'automédication, la profession et la résidence n'étaient pas non plus associées à l'infection submicroscopique (Tableau III).

Discussion

Cette étude présente un certain nombre de limites. Le recrutement des participants dans notre étude ayant été réalisé dans les formations sanitaires situées toutes au sud du pays, nos résultats ne peuvent donc pas être extrapolés à tout le pays. Par ailleurs, la population considérée était celle des patients symptomatiques, l'évaluation de l'IS n'a donc pas inclus les infections asymptomatiques. En dépit de ces limites, notre étude a mis en lumière l'existence des cas d'IS au Togo qu'il faudra prendre en compte dans les stratégies futures de la lutte antipaludique. Nos résultats par la microscopie étaient issus d'un contrôle en double lecture par deux microscopistes expérimentés dont l'un est accrédité par l'OMS niveau 2 pour le diagnostic du paludisme. Habituellement, autant d'attention n'est pas accordée pour la lecture en routine des lames de GE/FS du fait de la charge de travail du personnel technique dans les laboratoires de pays à ressources limitées.

had a history of fever in the 24 hours prior to the consultation. The socio-demographic data of the patients are summarized in Table III.

The detection of the *Plasmodium* genome by PCR was carried out on all 553 included (Table I). Comparing the two methods, PCR detected more positive cases, i.e. 29.1% (161/553) against 25% (138/553) by microscopy (Table I).

The frequency of submicroscopic *Plasmodium* spp. infections was 5.5% (23/415) [95% CI: 3.7-8.2]. The majority of these infections were by *P. falciparum*, i.e. 83% (19/23) [95% CI: 60-94] of cases. *P. malariae* was found in 9% (2/23) [95% CI: 2-31] of these submicroscopic infections, as was the *P. falciparum*-*P. malariae* association, in 9% (2/23) [95% CI: 2-31] of cases (Table II). No cases of submicroscopic *P. vivax* or *P. ovale* infection were identified among the patients studied.

Among the 415 samples that were TBF/BS-negative and tested by PCR, the participants from the Anié and Kouvé sites had 6 (OR, 6.47 [95% CI: 1.74-24.03]; $p = 0.005$) and 7 (OR, 7.49 [95% CI: 2.01-27.88]; $p = 0.003$) times more likely to have an SI. Although the frequency of these infections was higher in children under five years of age, no significant difference based on age or sex was observed. Self-medication, occupation and place of residence were also not associated with submicroscopic infection (Table III).

Discussion

This study has several limitations. Because the participants in our study were recruited from health facilities all located in the south of the country, our results cannot be extrapolated to the whole country. In addition, the population considered was that of symptomatic patients, so the assessment of SI did not include asymptomatic infections. Despite these limitations, our study has highlighted the existence of SI cases in Togo, which must be taken into account in future malaria control strategies. Our microscopy results were derived from a double reading control by two experienced microscopists, one of whom is WHO level 2 accredited for malaria diagnosis. Routine reading of TBF/BS slides is not usually given such close attention due to the workload of technical staff in laboratories in resource-limited countries. It is conceivable that more cases with low parasitemia escape detection as positive cases

Tableau II : Fréquence de la parasitémie submicroscopique et des espèces de *Plasmodium* identifiéesTable II: Frequency of submicroscopic parasitemia and identified *Plasmodium* species

Sites / Sites	Kouvé	HD Anié	CHR-LC	Total [IC 95 %]
GE/FS négative / TBF/BS-negative (n)	99	113	203	415
submicroscopie / subicroscopy n (%)	10 (10,1)	10 (8,8)	3 (1,5)	23 (5,5) [03,7-08,2]
espèces plasmodiales / <i>Plasmodium</i> species				
<i>Pf</i> *, n (%)	9	7	3	19
<i>Pm</i> *, n (%)	1	1	0	2
<i>Pf/Pm</i> , n (%)	0	2	0	2

* *Pf* : *Plasmodium falciparum*, *Pm* : *Plasmodium malariae*Tableau III : Association entre les caractéristiques démographiques et les infections submicroscopiques à *Plasmodium* sppTable III: Association between demographic characteristics and sub-microscopic *Plasmodium* spp. infections

Caractéristiques / Characteristics	Fréquence n (%) / Frequency n (%)	Infections submicroscopiques n (%) / Submicroscopic infections n (%)	Rapport de cotes (IC 95 %) / Odds ratio (IC 95 %)	p-value / p-value
Sites d'étude / Study site				
CHR-LC	203 (48,9)	3(1,5)	1	
HD Anié	113 (27,2)	10(8,8)	6,47 [1,74-24,03]	0,005
Kouvé	99 (23,9)	10(10,1)	7,49 [2,01-27,88]	0,003
Sexe / Gender				
féminin / female	185 (44,6)	12(6,5)	1	
masculin / male	230 (55,4)	11(4,8)	0,72 [0,31-1,68]	0,452
Âge en années / Age in years				
<5	212 (51,1)	20(9,4)	1	
[5-34]	55 (13,3)	3(5,5)	0,55 [0,16-1,94]	0,355
≥35	148 (35,7)	0(0)	1	1
Température / Temperature (°C)				
<37,5	92 (22,2)	6(6,5)	1	
≥37,5	323 (77,8)	17(5,3)	0,80 [0,30-2,08]	0,642
Automédication / Self-medication				
non / no	336 (81,0)	22(6,5)	1	
oui / yes	79 (19,0)	1(1,3)	0,18 [0,02-1,38]	0,099
Profession / Occupation				
travail salarié / salaried work	83 (20,0)	0(0)	1	
travail à la tâche / piecework	96 (23,1)	1(1,1)	0,13 [0,02-1,00]	0,051
élève/étudiant / pupil/student	69 (16,6)	10(14,5)	2,05 [0,84-4,99]	0,115
enfant / child	157 (37,8)	12(7,6)	1	1
autre / other	10 (2,4)	0(0)	1	1
Résidence / Residence				
urbain / urban	268 (64,6)	11(4,1)	1	
rural / rural	147 (35,4)	12(8,2)	2,08 [0,89-4,83]	0,09

Davantage de cas à parasitémie faible échappent à la détection des cas positifs par la microscopie considérée jusque-là comme la méthode de référence en pratique routinière.

Nous n'avons pas utilisé de TDR. Outre leur sensibilité similaire à celle de la microscopie, ils ne détectent pas des parasites mais des antigènes présents dans le sang des personnes infectées, que l'infection soit récente ou non. Ils peuvent donc constituer de faux positifs. En outre, il n'entrait pas dans notre objectif de valider cette technique dans le cadre de la détection d'infections submicroscopiques. Cependant, leur utilisation en routine permet un résultat similaire avec l'avantage de ne pas nécessiter un personnel qualifié en microscopie.

Dans notre étude, le portage submicroscopique a été influencé par la période à laquelle les patients ont été enrôlés: les inclus des sites d'Anié et de Kouvé reçus de septembre à janvier, avaient respectivement 6 et 7 fois plus de risque de présenter une infection submicroscopique que ceux du site de CHR-LC reçus de juillet à décembre, période ayant un lien étroit avec la modulation de la transmission palustre dans le pays. L'évolution des cas de paludisme dans le sud du pays (régions Grand Lomé, Maritime et Plateaux) est marquée par deux pics de mai à juillet et de septembre à novembre, périodes correspondant à la saison des pluies caractérisées par un fort taux d'inoculation et de transmission palustre. Nos données sont corroborées par les résultats de Whittaker *et al.* [30] qui ont démontré lors d'une revue systématique et d'une méta-analyse, l'influence significative des saisons sur les IS, qui sont plus fréquentes pendant la saison sèche. Cette variation pourrait se justifier par le fait que pendant les saisons des pluies, les densités parasitaires augmentent légèrement [24], devenant plus susceptibles d'être détectées par la microscopie. Ainsi, les sites de notre étude étant tous localisés dans le sud du Togo, la variation notée entre les sites d'Anié et de Kouvé et celui du CHR-LC serait liée à la période d'enrôlement, les patients du CHR-LC étant enrôlés de septembre à janvier, période caractérisée par une relative faible pluviométrie. Cette différence peut également être liée au fait que les deux premiers sites étaient des hôpitaux de district, représentant le premier niveau de contact avec les patients alors que le CHR-LC, structure de niveau intermédiaire, était un centre de référence, les patients qui y étaient admis avaient peut-être été déjà traités pour le paludisme avant leur admission. En outre, ce dernier site draine majoritairement une population urbaine probablement sujette à une transmission

by microscopy, which has been considered the reference method in routine practice.

We did not use RDTs. In addition to their sensitivity, which is similar to that of microscopy, they do not detect parasites, but antigens present in the blood of infected individuals, whether the infection is recent or not. They can therefore produce false positives. Furthermore, it was not our aim to validate this technique in the context of detecting submicroscopic infections. However, its routine use provides a similar result, with the advantage of not requiring personnel trained in microscopy.

In our study, submicroscopic carriage was influenced by the period in which the patients were enrolled: the samples from the Anié and Kouvé sites received from September to January had a 6 and 7 times higher risk of presenting a submicroscopic infection, respectively, than those from the CHR-LC site received from July to December, a period closely linked to the modulation of malaria transmission in the country. The evolution of malaria cases in the south of the country (Grand Lomé, Maritime and Plateaux regions) is characterized by two peaks from May to July and from September to November, periods corresponding to the rainy season, characterized by a high rate of malaria transmission. Our data are corroborated by the results of Whittaker *et al.* [30] who, in a systematic review and meta-analysis, demonstrated the significant influence of the seasons on SI, more frequent during the dry season. This variation could be explained by the fact that during the rainy season, parasite densities increase slightly [24] and are more likely to be detected by microscopy. As the sites in our study are all located in the south of Togo, the variation observed between the Anié and Kouvé sites and the CHR-LC site would be related to the enrollment period, with CHR-LC patients enrolled from September to January, a period characterized by relatively low rainfall. This difference may also be related to the fact that the first two sites were district hospitals, representing the first level of contact with patients, while the CHR-LC, an intermediate level structure, was a reference center. Patients admitted there may have already been treated for malaria prior to admission. In addition, the latter site mainly serves an urban population, which is likely to be less exposed to transmission than the other two areas.

In this study, age was not associated with a high parasite burden. The frequency of SI was higher in children under five years of age. Our results contrast with those in the literature. It has been

moindre que celle des deux autres zones.

Dans cette étude, l'âge n'était pas associé à un portage élevé de parasites. La fréquence des IS était plus élevée chez les moins de cinq ans. Nos résultats contrastent avec ceux de la littérature puisqu'il a été prouvé que les adultes ont des niveaux d'immunité plus élevés et maintiennent les parasites à de faibles densités [8,22,25] et qu'en zones d'endémie palustre, le développement d'une immunité adaptative due à une exposition fréquente au *Plasmodium* spp., est fonction de l'âge [3]. De ce fait, les adultes sont davantage porteurs de parasites asymptomatiques comparés aux enfants dont l'immunité antipaludique est en développement [33]. Aucune différence n'a été non plus notée entre l'IS et la présence de fièvre dans notre étude. Cette fièvre, un des premiers symptômes de l'accès palustre, est présente chez les sujets ayant un résultat positif à la PCR. Elle aurait pu davantage conforter notre diagnostic d'IS bien qu'un portage plasmodial asymptomatique et une autre pathologie fébrile puissent coexister chez le même patient [31]. C'est le cas pour d'autres maladies vectorielles fébriles comme la dengue, le Zika et le chikungunya qui ont la fièvre en symptôme commun avec le paludisme [10].

Malgré ces considérations, la PCR semble être le meilleur outil diagnostique (c'est-à-dire le plus sensible) pour l'estimation de la prévalence du parasite dans la population générale. Une étude complémentaire sur cette IS, qui prendrait en compte non seulement les patients asymptomatiques mais couvrirait également la partie nord du pays dont le profil épidémiologique palustre est différent, aiderait à confirmer nos résultats préliminaires. Par ailleurs, des études longitudinales avec davantage de variables telles que l'utilisation de moustiquaires imprégnées, la prise récente de déparasitant et le nombre de personnes vivant dans le ménage pourraient enrichir l'analyse des facteurs associées à l'IS. En vue de limiter le risque de survenue de cas d'IS, nos résultats doivent inciter les autorités sanitaires à mettre en œuvre des formations continues pour la mise à niveau du personnel de laboratoire, en insistant davantage sur le respect strict du temps de lecture et de l'examen du nombre minimal requis de champs microscopiques en pratique de routine de confirmation parasitologique du paludisme [18]. Cette étude suggère également de compléter la microscopie par des tests de diagnostic rapide du paludisme ultrasensibles (à défaut de la PCR) ciblant les patients présentant des symptômes similaires à ceux du paludisme.

shown that adults have higher levels of immunity and maintain parasites at low densities [8,22,25]. In areas where malaria is endemic, the development of adaptive immunity due to frequent exposure to *Plasmodium* spp. depends on age [3]. As a result, adults are more likely to be asymptomatic parasite carriers than children, whose antimalarial immunity is still developing [33]. In our study, no difference was found between SI and the presence of fever. This fever, one of the first symptoms of malaria, is present in subjects with positive PCR results. It could have further supported our diagnosis of SI, although asymptomatic *Plasmodium* carriage and another febrile pathology may coexist in the same patient [31]. This is the case for other febrile vector-borne diseases such as dengue, Zika, and chikungunya, which share fever as a symptom with malaria [10]. Despite these considerations, PCR seems to be the best diagnostic tool (i.e. the most sensitive) for estimating the prevalence of the parasite in the general population. A complementary study on this SI, which would not only include asymptomatic patients but also cover the northern part of the country, where the epidemiologic profile of malaria is different, would help to confirm our preliminary results. In addition, longitudinal studies with more variables such as the use of impregnated bed nets, recent antimalarial treatments, and the number of people living in the household could enrich the analysis of factors associated with SI. In order to limit the risk of SI cases, our results should encourage health authorities to implement continuous training of laboratory staff, with greater emphasis on strict adherence to reading time and examination of the minimum number of microscopic fields required for routine parasitological confirmation of malaria [18]. This study also suggests complementing microscopy with ultrasensitive rapid diagnostic tests for malaria (in the absence of PCR), targeting patients with symptoms like those of malaria.

Conclusion

Une faible proportion d'IS à *Plasmodium* spp. a été retrouvée dans les trois sites couverts par notre étude au Togo. Ces individus porteurs de parasites non détectés par les examens de routine, constituent un réservoir pouvant entretenir la transmission du paludisme dans la population. La mise en place d'approches pour améliorer leur détection et envisager leur prise en charge thérapeutique par les nouvelles stratégies adaptées s'avère nécessaire pour accélérer l'atteinte de l'objectif mondial d'élimination du paludisme dans le monde.

Remerciements et sources de financement

Cette étude a bénéficié du soutien de la Division des laboratoires, du Programme national de lutte contre le paludisme du Togo, de l'Université de Lomé et de l'Université de Strasbourg. L'analyse PCR des confettis a été rendue possible grâce au soutien financier du Fonds mondial de lutte contre le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme au niveau national et de la Fondation Bill et Melinda Gates par l'intermédiaire de l'OMS-Genève. Les auteurs remercient les directeurs régionaux et préfectoraux de la santé des trois sites d'étude, l'équipe de recherche et les membres des équipes locales des sites pour leur implication à tous les niveaux. Les auteurs remercient également les participants à l'étude ainsi que leurs parents et tuteurs des enfants.

Contribution des auteurs et autrices

Teou DC, Dorkenoo AM, Ataba E et Yakpa K ont rédigé le protocole d'étude.

Dorkenoo AM a dirigé la formation et supervisé la mise en œuvre du projet.

Dorkenoo AM, Ataba E, Yakpa K, Sossou E, Hemou M, Abdou-Kerim A, Kotosso A et Bawe LD ont supervisé la collecte des données.

Ménard D a supervisé l'analyse moléculaire et la validation desdits résultats.

Teou DC et Alidou S ont analysé et interprété les résultats.

Teou D.C, Dorkenoo A.M, Ataba E, Ménard D et Alidou S ont rédigé la première version du manuscrit.

Conclusion

A low proportion of *Plasmodium* spp. IS was found in the three sites included in our study in Togo. These individuals carrying parasites not detected by routine examinations represent a reservoir that can maintain malaria transmission in the population. Approaches to improve their detection and consider their therapeutic management through new and adapted strategies are necessary to accelerate the achievement of the global goal of eliminating malaria worldwide.

Acknowledgements and funding

This study was supported by the Laboratory of the National Malaria Control Program of Togo, the University of Lomé and the University of Strasbourg. The PCR analysis of confetti was made possible thanks to the financial support of the Global Fund to Fight HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria at the national level and the Bill & Melinda Gates Foundation through WHO Geneva. The authors would like to thank the regional and prefectural directors of health in the three study sites, the research team, and the members of the local site teams for their commitment at all levels. The authors would also like to thank the study participants and their parents and guardians.

Authors' contributions

Teou DC, Dorkenoo AM, Ataba E, and Yakpa K drafted the study protocol.

Dorkenoo AM led the training and supervised the implementation of the project.

Dorkenoo AM, Ataba E, Yakpa K, Sossou E, Hemou M, Abdou-Kerim A, Kotosso A, and Bawe LD supervised the data collection.

Ménard D supervised the molecular analysis and validation of the results.

Teou DC and Alidou S analyzed and interpreted the results.

Teou D.C, Dorkenoo A.M, Ataba E, Ménard D and Alidou S drafted the first version of the manuscript.

All authors read, revised, and approved the final manuscript.

Tous les auteurs ont lu, révisé et approuvé le manuscrit final.

Conflit d'intérêt

Les auteurs ne rapportent aucun conflit d'intérêt.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests.

Auteurs et autrices / Authors

Diwaba Carmel TEOU* (1), Essoham ATABA (2, fidelcab10@gmail.com), Smaila ALIDOU (3, ismoson@gmail.com), Kossi YAKPA (2, yakpakossi@yahoo.fr), Efoe SOSSOU (4, sossoustephane@yahoo.fr), Manani HEMOU (5, mhemou@yahoo.fr), Aguerregna ABDOU-KERIM (6, aaguerregnasabitiou@yahoo.fr), Awéréou KOTOSO (7,8, kotosso02@yahoo.fr), Lidaw Déassoua BAWÉ (7, alainbawé@yahoo.fr), Didier MÉNARD (9, dmenard@unistra.fr), Ameyo Monique DORKENOO (10, monicadork@yahoo.fr)

1. Faculté des sciences, Université de Lomé, Boulevard Eyadema, 01BP 1515 Lomé, Togo
2. Programme national de lutte contre le paludisme, ministère de la Santé, de l'hygiène publique et de l'accès universel aux soins, Quartier administratif, 01BP 518 Lomé, Togo
3. Département de santé publique, Unité de formation et de recherche en sciences de la santé, Université Joseph KI-ZERBO, Ouagadougou, Burkina Faso
4. Service des laboratoires, Centre hospitalier universitaire Sylvanus Olympio, 198 rue de l'Hôpital, Tokoin Hôpital, BP 57, Lomé, Togo
5. Département de pédiatrie, Campus hospitalier universitaire de Lomé, Boulevard Gnassingbé Eyadéma, Campus, Cité OUA - 03 BP 30284 Lomé, Togo
6. Institut national d'hygiène, ministère de la Santé et de l'hygiène publique, Quartier administratif, 01BP 1396 Lomé, Togo
7. Service des maladies infectieuses et tropicales, CHU Sylvanus Olympio, Lomé, Togo
8. Centre hospitalier des armées de Lomé, Togo
9. Malaria Genetics and Resistance Team (MEGATEAM), UR 3073 - Pathogens Host Arthropods Vectors Interactions, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France ; Laboratory of Parasitology and Medical Mycology, CHU de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France ; Malaria Parasite Biology and Vaccines, Institut Pasteur, Université Paris Cité, 75015 Paris, France ; Institut universitaire de France, Paris, France
10. Faculté des Sciences de la santé, Université de Lomé, Boulevard Eyadema, 01BP 1515 Lomé, Togo

Auteur correspondant : dicarmelteou@gmail.com

Références / References

1. Abate A, Bouyssou I, Mabilotte S, Doderer-Lang C, Dembele L, Menard D, Golassa L. Vivax malaria in Duffy-negative patients shows invariably low asexual parasitaemia: implication towards malaria control in Ethiopia. *Malar J.* 2022 Aug 1;21(1):230. doi: 10.1186/s12936-022-04250-2.
2. Agonhossou R, Akoton R, Dossou YA, Avokpaho E, Mbama DNJ, Boussougou-Sambe TS, Francis NN, Ndo C, Ntouni F, Wondji CS, Adegnik AA, Borrmann S, Issifou S, Djogbénou LS. Surveillance of *Plasmodium* malariae infection among inhabitants of rural areas in Ouidah-Kpomasse-Tori Bossito health district, Benin. *Parasitol Res.* 2022 Jan;121(1):275-286. doi: 10.1007/s00436-021-07398-z.
3. Agwu E, Ihongbe JC, Okogun GR, Inyang NJ. High incidence of co-infection with Malaria and Typhoid in febrile HIV infected and AIDS patients in Ekpoma, Edo State, Nigeria. *Braz J Microbiol.* 2009 Apr;40(2):329-32. doi: 10.1590/S1517-838220090002000022.
4. Amoah LE, Asare KK, Dickson D, Anang SF, Busayo A, Bredu D, Asumah G, Peprah N, Asamoah A, Abuaku B, Malm KL. Nationwide molecular surveillance of three *Plasmodium* species harboured by symptomatic malaria patients living in Ghana. *Parasit Vectors.* 2022 Jan 28;15(1):40. doi: 10.1186/s13071-022-05153-6.

5. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Dec;12(12):833-40. doi: 10.1038/nrmicro3364.

6. Canier L, Khim N, Kim S, Eam R, Khean C, Loch K, Ken M, Pannus P, Bosman P, Stassijns J, Nackers F, Alipon S, Char MC, Chea N, Etienne W, De Smet M, Kindermans JM, Ménard D. Malaria PCR detection in Cambodian low-transmission settings: dried blood spots versus venous blood samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Mar;92(3):573-7. doi: 10.4269/ajtmh.14-0614.

7. Canier L, Khim N, Kim S, Sluydts V, Heng S, Dourng D, Eam R, Chy S, Khean C, Loch K, Ken M, Lim H, Siv S, Tho S, Masse-Navette P, Gryseels C, Uk S, Van Roey K, Grietens KP, Sokny M, Thavrin B, Chuor CM, Deubel V, Durnez L, Coosemans M, Ménard D. An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field. *Malar J.* 2013 Nov 9;12:405. doi: 10.1186/1475-2875-12-405.

8. Dal-Bianco MP, Köster KB, Kombila UD, Kun JF, Grobusch MP, Ngoma GM, Matsigui PB, Supan C, Salazar CL, Missinou MA, Issifou S, Lell B, Kremsner P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in Gabonese adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Nov;77(5):939-42. PMID: 17984357.

9. Delaunay P, Estran-Pomares C, Marty P. Diagnostic du paludisme : frottis sanguin, goutte épaisse et tests antigéniques. *Med Mal Infect.* 2008 Jun;38 Suppl 2:S121-3. doi: 10.1016/s0399-077x(08)73052-x.

10. Dorkenoo AM, Gbeasor-Komlanvi FA, Gbada K, Zida-Compaore WIC, Teou D, Konu YR, Lack F, Sadio AJ, Tchankoni MK, Dagnra AC, Ekouevi DK. Prevalence of Malaria and Covid-19 in Febrile Patients in Lomé, Togo in 2020. *Acta Parasitol.* 2022 Sep;67(3):1335-1342. doi: 10.1007/s11686-022-00586-6.

11. Dorkenoo AM, Yehadij D, Agbo YM, Layibo Y, Agbeko F, Adjeleh P, Yakpa K, Sossou E, Awokou F, Ringwald P. Therapeutic efficacy trial of artemisinin-based combination therapy for the treatment of uncomplicated malaria and investigation of mutations in k13 propeller domain in Togo, 2012-2013. *Malar J.* 2016 Jun 22;15:331. doi: 10.1186/s12936-016-1381-8.

12. Golassa L, Enweji N, Erko B, Aseffa A, Swedberg G. Detection of a substantial number of sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malar J.* 2013 Oct 3;12:352. doi: 10.1186/1475-2875-12-352.

13. Imwong M, Stepniewska K, Tripura R, Peto TJ, Lwin KM, Vihokhern B, Wongsan K, von Seidlein L, Dhorda M, Snounou G, Keereecharoen L, Singhasivanon P, Sirithiranont P, Chalk J, Ngoun C, Day NP, Nosten F, Dondorp A, White NJ. Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. *J Infect Dis.* 2016 Apr 15;213(8):1322-9. doi: 10.1093/infdis/jiv596.

14. Manjurano A, Okell L, Lukindo T, Reyburn H, Olomi R, Roper C, Clark TG, Joseph S, Riley EM, Drakeley C. Association of sub-microscopic malaria parasite carriage with transmission intensity in north-eastern Tanzania. *Malar J.* 2011 Dec 16;10:370. doi: 10.1186/1475-2875-10-370.

15. Ministère de la Santé, de l'hygiène publique et de l'accès universel aux soins, Programme national de lutte contre le paludisme. Revue à mi-parcours de performance du plan stratégique national de lutte contre le paludisme 2017-2022 au Togo. Période 2017-2019. 2020.

16. Ministère de la Santé, de l'hygiène publique et de l'accès universel aux soins, Programme national de lutte contre le paludisme. Plan stratégique national de lutte contre le paludisme 2017-2022 au Togo. Rapport annuel d'activités 2022. 2023.

17. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012;3:1237. doi: 10.1038/ncomms2241.
18. Organisation mondiale de la santé (OMS). Diagnostic microscopique du paludisme: manuel d'assurance qualité [Internet]. 2017 [cité 22 oct 2023].
19. Organisation mondiale de la santé (OMS). Lignes directrices sur le paludisme. 2022 [cité 12 juill 2024].
20. Organisation mondiale de la santé (OMS). Protocole du test d'efficacité thérapeutique.
21. Rek J, Katrak S, Obasi H, Nayebara P, Katureebe A, Kakande E, Arinaitwe E, Nankabirwa JI, Jagannathan P, Drakeley C, Staedke SG, Smith DL, Bousema T, Kamya M, Rosenthal PJ, Dorsey G, Greenhouse B. Characterizing microscopic and submicroscopic malaria parasitaemia at three sites with varied transmission intensity in Uganda. *Malar J.* 2016 Sep 15;15:470. doi: 10.1186/s12936-016-1519-8.
22. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Bruce J, Carneiro I, Olomi R, Cox J, Nkya WM, Lemnge M, Greenwood BM, Riley EM. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe *Plasmodium falciparum* malaria. *JAMA.* 2005 Mar 23;293(12):1461-70. doi: 10.1001/jama.293.12.1461.
23. Sattabongkot J, Suansomjit C, Nguitragool W, Sirichaisinthop J, Warit S, Tiensuwan M, Buates S. Prevalence of asymptomatic *Plasmodium* infections with sub-microscopic parasite densities in the northwestern border of Thailand: a potential threat to malaria elimination. *Malar J.* 2018 Sep 12;17(1):329. doi: 10.1186/s12936-018-2476-1.
24. Slater HC, Ross A, Felger I, Hofmann NE, Robinson L, Cook J, Gonçalves BP, Björkman A, Ouédraogo AL, Morris U, Msellem M, Koepfli C, Mueller I, Tadesse F, Gadisa E, Das S, Domingo G, Kapulu M, Midega J, Owusu-Agyei S, Nabet C, Piarroux R, Doumbo O, Doumbo SN, Koram K, Lucchi N, Udhayakumar V, Mosha J, Tiono A, Chandramohan D, Gosling R, Mwingira F, Sauerwein R, Paul R, Riley EM, White NJ, Nosten F, Imwong M, Bousema T, Drakeley C, Okell LC. The temporal dynamics and infectiousness of subpatent *Plasmodium falciparum* infections in relation to parasite density. *Nat Commun.* 2019 Mar 29;10(1):1433. doi: 10.1038/s41467-019-09441-1. Erratum in: *Nat Commun.* 2019 Jun 11;10(1):2644. doi: 10.1038/s41467-019-09441-1.
25. Steenkeste N, Rogers WO, Okell L, Jeanne I, Incardona S, Duval L, Chy S, Hewitt S, Chou M, Socheat D, Babin FX, Arie F, Rogier C. Sub-microscopic malaria cases and mixed malaria infection in a remote area of high malaria endemicity in Rattanakiri province, Cambodia: implication for malaria elimination. *Malar J.* 2010 Apr 22;9:108. doi: 10.1186/1475-2875-9-108.
26. Sumbele IUN, Teh RN, Nkeudem GA, Sandie SM, Moyeh MN, Shey RA, Shintouo CM, Ghogomu SM, Batiha GE, Alkazmi L, Kimbi HK. Asymptomatic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection in children in the Mount Cameroon area: a cross-sectional study on altitudinal influence, haematological parameters and risk factors. *Malar J.* 2021 Sep 26;20(1):382. doi: 10.1186/s12936-021-03916-7.
27. Tadesse FG, van den Hoogen L, Lanke K, Schildkraut J, Tetteh K, Aseffa A, Mamo H, Sauerwein R, Felger I, Drakeley C, Gadisa E, Bousema T. The shape of the iceberg: quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malar J.* 2017 Mar 3;16(1):99. doi: 10.1186/s12936-017-1749-4.
28. Telfils R, Dossou AY, Djénontin A, Adimi E, Akoho R, Bailly J, Bouraïma A, Matondo D, Sissinto-Savi de Tove Y, Houinato D, Massougboji A, Dechavanne C, Cottrell G. Dynamics of submicroscopic and microscopic asymptomatic malaria infection and associated factors: A longitudinal study in South Benin. *PLoS One.* 2024 Dec 12;19(12):e0311217. doi: 10.1371/journal.pone.0311217.
29. Wanja EW, Kuya N, Moranga C, Hickman M, Johnson JD, Moseti C, Anova L, Ogutu B, Ohrt C. Field evaluation of diagnostic performance of malaria rapid diagnostic tests in western Kenya. *Malar J.* 2016 Sep 7;15(1):456. doi: 10.1186/s12936-016-1508-y.
30. Whittaker C, Slater H, Nash R, Bousema T, Drakeley C, Ghani AC, Okell LC. Global patterns of submicroscopic *Plasmodium falciparum* malaria infection: insights from a systematic review and meta-analysis of population surveys. *Lancet Microbe.* 2021 Aug;2(8):e366-e374. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00055-0.
31. Willcox ML, Sanogo F, Graz B, Forster M, Dakouo F, Sidibe O, Falquet J, Giani S, Diakite C, Diallo D. Rapid diagnostic tests for the home-based management of malaria, in a high-transmission area. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009 Jan;103(1):3-16. doi: 10.1179/136485909X384983.
32. Zaw MT, Thant M, Hlaing TM, Aung NZ, Thu M, Phumchuea K, Phusri K, Saeseu T, Yorsaeng R, Nguitragool W, Felger I, Kaewkungwal J, Cui L, Sattabongkot J. Asymptomatic and submicroscopic malaria infection in Kayah State, eastern Myanmar. *Malar J.* 2017 Apr 4;16(1):138. doi: 10.1186/s12936-017-1789-9.
33. Zhou Z, Mitchell RM, Kariuki S, Odero C, Otieno P, Otieno K, Onyona P, Were V, Wiegand RE, Gimnig JE, Walker ED, Desai M, Shi YP. Assessment of submicroscopic infections and gametocyte carriage of *Plasmodium falciparum* during peak malaria transmission season in a community-based cross-sectional survey in western Kenya, 2012. *Malar J.* 2016 Aug 19;15(1):421. doi: 10.1186/s12936-016-1482-4.