

## CAT: "De rol van de snelle immunochromatografische test in de diagnosestelling van malaria"

<b>Author</b>	<b>Pieter Vermeersch</b>
<b>Supervisor</b>	<b>Prof. J. Verhaegen</b>
<b>Search verified by</b>	
<b>Date</b>	<b>30- 03 - 2004</b>
<b>Expiry date</b>	

### **Clinical bottom line**

De NOW ICT Malaria P.f./P.v. sneltest is snel (15 min) en eenvoudig uit te voeren. De sensitiviteit ( $\geq 95\%$ ) en specificiteit ( $\geq 95\%$ ) voor *Plasmodium falciparum* is zeer goed in vergelijking met expert microscopie (UpToDate). Aangezien misdiagnose van malaria bij microscopie in West-Europa niet ongewoon is, is het aangewezen de sneltest systematisch uit te voeren in het kader van de diagnose van malaria, zeker buiten de normale werkuren wanneer geen expert-microscopist aanwezig is.

Een positief resultaat voor P.v. dient te worden geïnterpreteerd als non-falciparum malaria. De teststrook voor P.v. zou in de toekomst malaria worden gelabeld. De specificiteit voor non-falciparum malaria is goed ( $\geq 97,7\%$ ), doch de sensitiviteit is  $< 90\%$ , vooral bij een parasitemie van  $< 500$  P/ $\mu$ l. Microscopie blijft bijgevolg steeds noodzakelijk om op een betrouwbare manier non-falciparum malaria uit te sluiten en om het species te identificeren.

Aangezien de parasitemie cyclisch varieert, zeker bij P.f., is dient men in geval van een initiële negatieve dikke druppel en negatieve sneltest beide om de 12 uur voor de komende 36-48 uur te herhalen (3x herhalen). Malaria is echter onwaarschijnlijk na een initieel negatief resultaat. In het UZ Leuven werden tussen 2001 en 2003 alle 36 geconfirmeerde gevallen van malaria bij de eerste staalname gediagnosticeerd. De intensiteit van de teststrook laat een ruwe schatting van de parasitemie toe, doch microscopie is noodzakelijk om de parasitemie te bepalen.

Antigentesten kunnen dagen tot weken positief blijven na eliminatie van parasieten uit het bloed door succesvolle chemotherapie. De antigenetest wordt bijgevolg niet herhaald in het kader van het opvolgen van de therapie.

## Clinical/Diagnostic scenario

Malaria is de belangrijkste parasitaire ziekte wereldwijd en wordt door de anopheles-mug van mens tot mens overgedragen ([levencyclus](#)). De belangrijkste endemische gebieden bevinden zich in Sub-Sahara Afrika, Latijns Amerika en Zuid-Oost-Azië ([zie kaart](#)). Ten gevolge van de steeds verder toenemende mobiliteit lopen jaarlijks naar schatting 30.000 reizigers uit de geïndustrialiseerde wereld het risico geïnfecteerd te worden. Malaria is in de Westerse wereld de belangrijkste oorzaak van koorts bij mensen die recent naar een endemisch gebied op reis zijn geweest (NEJM), zeker wanneer geen profylaxie wordt genomen. Zo schat men het risico om malaria op te lopen indien men 1 maand verblijft in Sub-Sahara Afrika zonder profylaxie te nemen op 2% ([cfr. tabel](#)).

Het klassieke verloop van een acute malaria-aanval start met rillingen en stijfheid die leiden tot een plotse koorts die 1 tot 2 uur duurt en eindigt met profuus zweten en normaliseren van de temperatuur. De koorts wordt vaak voorafgegaan of vergezeld van hoofdpijn, myalgie, malaise en braken ( $\pm 20\%$ ) en diarree ( $< 5\%$ ). Deze gastro-intestinale symptomen kunnen de clinicus afleiden van de diagnose van malaria. Andere klinische kenmerken zijn onder andere splenomegalie, anemie en hypoglycemie. De symptomen van niet-gecompliceerde malaria kunnen echter weinig specifiek zijn en het klinisch beeld kan sterk variëren afhankelijk van het species, de parasitemie en de immunestatus van de patiënt.

Elke patiënt met koorts die in de laatste 2 maand in een endemische gebied is geweest heeft malaria tot het tegendeel bewezen is, ongeacht de duur of het nemen van profylaxie (White 1994). 90% van de mensen die malaria oplopen in een endemisch gebied doen maar symptomen na hun terugkeer. Van cruciaal belang voor de kliniek is het feit dat *P. falciparum* infecties in tegenstelling tot niet-falciparum species snel en dodelijk kunnen verlopen (binnen 36-48 uur na de eerste symptomen) (Kain 1998). Complicaties van P.f. zijn onder andere coma ten gevolge van cerebrale malaria, zware anemie (Hct  $< 20\%$ ), hypoglycemie (glc  $< 40$  mg/dl), diffuse intravasculaire coagulatie, shock en ARDS. Daarom moet een *P. falciparum* infectie ook steeds worden overwogen bij koorts van ongekende oorsprong, onafhankelijk van enige geografische blootstelling. De andere species veroorzaken enkel in zeldzame gevallen overlijden ten gevolge van een spontane of traumatische miltruptuur (alle species) of een nefrotisch syndroom (enkel P.m.). P.v. en P.o. veroorzaken zelden parasitemies van meer dan 2%, terwijl P.m. zelden een acuut beeld geeft ([cfr. tabel](#)). Ongeveer 90% van de gevallen van *P. falciparum* worden opgelopen in Sub-Sahara Afrika en 90% van de reizigers hebben symptomen binnen 1 maand na hun terugkeer. In België hebben 75% van de malaria patiënten *P. falciparum*. Bij *P. vivax* en *P. ovale* infecties daarentegen krijgen slechts 50% van de geïnfecteerde personen symptomen binnen 1 à 2 maand na hun terugkeer.

Microscopisch onderzoek van een Giemsa-gekleurde dikke druppel en perifeer uitstrijkje is de standaard voor de diagnose van malaria. Dit vereist de nodige ervaring. Het is echter ongewoon dat laboratoria in West-Europa en Noord-Amerika meer dan enkele tientallen gevallen per jaar te zien, hetgeen vermoedelijk verklaard waarom misdiagnose van malaria in de Westerse wereld niet ongewoon is (cfr. [Malaria in UZLeuven](#), [Malaria in België](#)). Laattijdige diagnose houdt in het bijzonder voor *P. falciparum* een verhoogd risico in op morbiditeit en mortaliteit. In 2001 stierven in de VS 11 mensen ten gevolge van malaria (meest recente officiële cijfers CDC).

Er zijn verschillende nieuwe technieken die worden gebruikt voor de diagnose van malaria zoals immunochromatografische sneltesten en PCR. Tot op heden echter nog geen officiële richtlijnen over de plaats die deze testen innemen in de diagnose en behandeling van malaria. Zij kunnen echter helpen om de kans op misdiagnose te verminderen.

## Questions

Welke rol is weggelegd voor immunochromatografische sneltesten (RDT) in de diagnostiek en behandeling van malaria?

## Search terms

- MESH terms: malaria (MESH), diagnostic test (MESH)
- Vrije tekst: ICT, rapid diagnostic test, Binax, immunochromatographic

Databases: Pubmed, Pubmed Clinical queries (diagnostic, malaria) Cochrane library, national Guideline Clearinghouse ([www.guideline.org](http://www.guideline.org)), Sumsearch, Google, UpToDate.

Websites: WHO: [www.who.int](http://www.who.int)

CDC: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov) ([www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx))

ITG: [www.itg.be](http://www.itg.be)

## Relevant Articles/References

### Guideline

1. Richtlijnen voor de diagnostiek van malaria voor laboratoria in de gezondheidszorg in Nederland (opgesteld door o.a. Nederlandse Vereniging voor Parasitologie en de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie, positief advies van de Nederlands Vereniging voor Medische Microbiologie). *Ned. Tijdschr. Klin. Chem.* 1999;24:44-46.

### Draft Guideline

2. Malaria Rapid Diagnosis: Making it work, WHO South East Asia Meeting Report, Manilla, 20-23 januari 2003. [w3.whosea.org/malaria/database1.htm#Rapid](http://w3.whosea.org/malaria/database1.htm#Rapid)

### Boeken

3. Manual of Clinical Microbiology, 8<sup>th</sup> ed (2003). Murray et Al.
4. The Sanford Guide to Antimicrobial therapy (2003-2004), Belgium/Luxembourg version
5. Diagnostische en Therapeutische gids, 6<sup>de</sup> ed (2002). Verhaeghe R. et Al.
6. Blood Cells, a Practical Guide, 2<sup>nd</sup> ed (1995). B. Bain
7. Médecine Tropicale, 5<sup>ième</sup> éd (1993). Gentilini et al.

### Review

8. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Moody A *Clin. Microbiol Rev.* 2002;15:66-78.
9. Illness after International Travel. Ryan et Al. *N. Engl. J. Med.* 2002;347:505-516.
10. Malaria in travelers. Epidemiology, disease, and prevention. Kain K *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 1998 Jun;12:267-284.
11. The treatment of malaria. White N N. *Engl. J. Med.* 1996 335:800-806.

### Update

12. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. Hanscheid T *Clin. Microbiol. Infect.* 2003;9:497-504.

### Letters to the editor

13. Malaria rapid diagnostic tests: one size may not fit all. *Bell Clin. Microbiol. Rev.* 2002 Oct;15(4):771; discussion 771-2.
14. Performance of two rapid tests for Plasmodium falciparum malaria in patients with rheumatoid factors. Bartoloni N. *Engl. J. Med.* 1998; 338:1075.μ

### Articles

15. Comparison of the OptiMAL rapid antigen test with field microscopy for the detection of Plasmodium vivax and P. falciparum: considerations for the application of the rapid test in Afghanistan. Kolaczinski et Al. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2004;98:15-20.
16. Performance of an immunochromatographic test for the rapid diagnosis of malaria. Richter et Al. *Parasitol. Res.* 2004 Mar 9 [Epub ahead of print]
17. Rapid diagnostic devices for malaria: field evaluation of a new prototype immunochromatographic assay for the detection of Plasmodium falciparum and non-falciparum Plasmodium. Wongsrichanalai C et Al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003;69:26-30.
18. Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of falciparum malaria in travellers returning to Berlin, Germany. Grobusch et Al. *Parasitol. Res.* 2003 Mar;89:354-357.
19. Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a Plasmodium falciparum/vivax endemic area in Thailand. Coleman RE et Al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;66:379-83.
20. Comparison of three Antigen Detection Methods for Diagnosis and Therapeutic Monitoring of Malaria: a Field Study from Southern Vietnam. Huong et Al. *Trop. Med. Int. Health* 2002;7:304-308.
21. Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travellers. Playford et al. *J. Clin. Microbiol.* 2002 40:4166-4171.
22. A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. Mason et Al. *Acta Trop.* 2002 Apr;82:51-59.
23. Comparison of Two commercial Assays with Expert Microscopy for Confirmation of Symptomatically Diangosed Malaria. Iqbal et Al. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:4675-4678.
24. Detection of Plasmodium Ovale by the ICT malaria P.f/P.v. Immunochromatographic Test. Win et Al. *Acta Trop.* 2001 ; 80:283-284.
25. Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. Hänscheid T *Am J Trop Med Hyg.* 2001 May-Jun;64(5-6):290-2.
26. Field Evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v. Immunochromatographic Test for Detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in Patients with a Presumptive Clinical Diagnosis of Malaria in Eastern Indonesia. Tjitra et Al. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2412-7.
27. Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. Lema et Al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999;60:177-182
28. Automated malaria detection by depolarization of laser light. Mendelow B *Br. J. Haematol.* 1999 Mar;104(3):499-503
29. A Rapid Immunochromatographic Test (ICT) for Diagnosis of Plasmodium Falciparum. Valecha et Al. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998 ;30 :257-260.
30. Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in travelers. Humar et Al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997;56:44-48.
31. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. Milne et Al. *J. Clin. Pathol.* 1994;47:740-742.

#### Electronic Information

32. UpToDate: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, and Diagnosis of Malaria.
33. CDC: Malaria Information ([www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm))

#### Surveillance Reports

34. Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid: Surveillance van Infectieuze Aandoeningen door een Netwerk van Laboratoria voor Microbiologie 2001 G. Ducoffre
35. CDC: Malaria surveillance: United States, 2001. Filler et Al.

#### Externe Kwaliteitscontrole

36. Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid: Externe Kwaliteitscontrole Microbiologie

## Diagnose van Malaria

Microscopisch onderzoek van een Giemsa- of May-Grunwald-Giemsa-gekleurde dikke druppel en perifeer uitstrijkje is de standaard techniek voor de diagnose van malaria. Omwille van de cyclische aard van de parasitemie dient een negatieve dikke druppel de eerste 36-48 uur (iedere 12 uur) 3 maal te worden herhaald alvorens malaria mag worden uitgesloten (Murray, White 1996). De diagnose van malaria is echter onwaarschijnlijk indien de eerste dikke druppel negatief is (White 1996). De eerste dikdruppel is volgens UpToDate positief in 95% van de gevallen. Dit is zeker het geval voor een acute P.f. infectie. In een recente studie in Duitsland was de initiële dikke druppel positief in 202/204 (99%) van de patiënten met P.f. en bij de 2 overige was de dikke druppel 6 en 12 uur later positief. De initiële sneltest was bij alle 204 patiënten positief (Richter 2004). In het UZ Leuven werden alle 36 geconfirmeerde gevallen van malaria tussen 2001 en 2003 bij de eerste staalname gediagnosticeerd (dikke druppel+sneltest).

Bij acute malaria toont het bloedonderzoek meestal thrombocytopenie (50-68%) met een normaal hemoglobine (75%) en normale WBC (66-88%). De WBC zijn slechts in 1 tot 5% van de gevallen gestegen (Kain 1998).

Er zijn verschillende nieuwe technieken die worden gebruikt voor de diagnose van malaria (zie tabel p. 7). Er zijn tot op heden nog geen officiële richtlijnen over de plaats die deze testen innemen in de diagnose en behandeling van malaria. Binnen de WHO wordt er wel gewerkt aan een richtlijn over immunologische sneltesten (draft guideline 2003)

Bij het evalueren van het nut en de accuraatheid van de verschillende methodes dienen we rekening te houden met verschillende mogelijke klinisch-diagnostische scenarios:

- 1) Betreft het een reiziger of betreft het een persoon die langdurig in een endemisch gebied heeft verbleven?
- 2) Is er een klinisch vermoeden van een acute infectie?
- 3) Werd profylaxie genomen? Werd reeds chemotherapie gestart?
- 4) Wenst men dringend een acute P. falciparum infectie uit te sluiten?
- 5) Vraagt men om de parasitemie bepalen voor het opvolgen van de chemotherapie?
- 6) Is er een expert-microscopist beschikbaar?

**Table: diagnostische Methoden**

<b>Method</b>	<b>Remarks</b>
<b>Microscopy</b>	
(a) Giemsa thin/thick smears	(a) Routine method, continuous practice important
(b) Auramine thin/thick smears centrifuged capillary blood (QBC)	(b) Rapid, expertise required, good sensitivity,
(c) Hemozoin detection dark field polarized light	(c) Requires expertise, poor species identification
<b>Antigen detection (RDT)</b>	
(a) HRP2	(Immunochromatographic 'dipstick') (a) Detects only <i>P. falciparum</i> (various manufacturers)
(b) HRP2/aldolase (combination)	(b) <i>P. falciparum/vivax (ovale and malariae)</i> marketed as Now ICT P.f./P.v. by Binax
(c) pLDH (combination)	c) <i>P. falciparum/vivax (ovale and malariae)</i> marketed as OptiMAL by Flow Inc.
<b>Molecular methods</b>	
(a) Conventional PCR	(a) Best sensitivity, long turnaround time, not useful in routine/on-call
(b) Real-time Quantitative PCR	(b) faster than conventional PCR, expensive equipment and kits
<b>Other methods</b>	
Hemozoin-containing leukocytes- automated FBC analyzer	Low/variable sensitivity, expensive equipment, detects clinically unsuspected cases

QBC, quantitative buffy coat, capillaries still commercially available, equipment no longer marketed; HRP2, histidine-rich protein-2; pLDH, parasite lactate dehydrogenase; FBC, full blood count.

From: Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. Hanscheid T *Clin. Microbiol. Infect.* 2003;9:497-504.

## Lichtmicroscopie

Het microscopisch onderzoek van de dikke druppel en het perifeer uitstrijkje door een expert microscopist is de gouden standaard voor de diagnose van malaria.

### 1.1 Principe

- De dikke druppel is een concentratiemethode (ongeveer 10 WBC dik,  $\pm 10 \mu\text{l}$  bloed) en is gevoeliger voor de diagnose van malaria dan het perifeer uitstrijkje. Zones met meer dan 20 WBC (zonder afwijking van het aantal WBC) zijn te dik om goed te analyseren.
- Het perifeer uitstrijkje laat anderzijds een beter evaluatie van de morfologische kenmerken van de RBC en de parasieten toe en is de gouden standaard om het species te identificeren.
- Bij een hoge parasitemie wordt de parasitemie bepaald op het uitstrijkje en uitgedrukt in verhouding tot het totaal aantal RBC (5000 RBC tellen). Bij lage dichtheden ( $< 0,1\%$ ) wordt in de dikke druppel het aantal parasieten geteld per 200 WBC. Wanneer er minder dan 10 parasieten werden geteld, dient men de telling verder te zetten tot 500 WBC. Bijzonderheden zoals de aanwezigheid van rijpe trofozoieten, schizonten en gametocyten wordt vermeld bij de uitslag (NTKC).
- Er dienen minstens 200 velden te worden onderzocht alvorens een preparaat als negatief mag worden beschouwd. Een negatieve dikke druppel sluit malaria niet uit. Hiervoor dient iedere 12 uur voor de komende 36-48 uur een extra dikke druppel te worden onderzocht (3x herhalen). Op dat moment is de diagnose van malaria onwaarschijnlijk.

### 1.2 Pre-analytische factoren

- Biologische variatie: . Alhoewel de parasitemie hoger is op of kort na de koortspiek, wordt er niet gewacht op een koortspiek (Kain 1998, UpToDate). Een dikke druppel en uitstrijkje moeten steeds gedaan worden wanneer de diagnose van malaria wordt vermoed. Omwille van de cyclische aard van de parasitemie dient de dikke druppel iedere 12 uur herhaald te worden voor 36-48 uur (3x herhalen) alvorens malaria mag worden uitgesloten.
- Interferentie: de dikke druppel kan al 24 uur na de start van chemotherapie negatief zijn.
- Staal: - type: capillair bloed is te verkiezen (de vingertop niet ontsmetten).
  - afname: Hierbij wordt de druppel met de hoek van een dekglasje opgedraaid tot de grootte van een muntstuk en totdat het preparaat bijna droog is. Hierdoor wordt het bloed gedefibrineerd. Vers bloed uit een EDTA-buis geeft ook bevredigende resultaten (zie opmerking 1). Bloed uit een heparine-buis vertoont sneller artefacten. Een goede staalafname is belangrijk en tijdens de wacht vaak een probleem.
  - voorbereiding: - dikke druppel: wij laten de dikke druppel aan de lucht drogen tot hij niet meer vochtig is. Verschillende bronnen vermelden dat de dikke druppel langere tijd moet drogen voor een optimaal resultaat (Gentilini: 4 tot 24 uur drogen, afhankelijk van de temperatuur, Murray: 15-30 min aan  $37^{\circ}\text{C}$ ).
    - uitstrijkje: wordt gedroogd aan de lucht en gefixeerd met methanol
  - stabiliteit: enkele dagen na het drogen
- kleuring: dikke druppel en uitstrijkje worden gekleurd met Giemsa of May-Grunwald-Giemsa (Gentilini). Volgens sommigen (CDC, B. Bain) geeft de Giemsa



kleuring ( 30 tot 45 minuten kleuren in een 3% Giemsa oplossing met pH 7.2) een beter resultaat.

- Opmerking: 1) Plasmodium kan zich verder ontwikkelen in de EDTA-buis, waardoor schizonten van *P. falciparum* aanwezig kunnen zijn in het preparaat, hetgeen tot een verkeerde diagnose kan leiden.
- 2) In het geval van diagnostische uitstrijkjes mag niet gewacht worden om deze te analyseren omwille van het gevaar van overlijden ten gevolge van een acute *P. falciparum*-infectie.

### 1.3 Analytische factoren

- Accuraatheid: de ervaring van de microscopist is van cruciaal belang. De dikke druppel is moeilijker af te lezen dan het uitstrijkje. Er worden door talrijke instanties cursussen georganiseerd (o.a. WHO, SPLD (stichting Parasitologische Laboratorium Diagnostiek))
- meetbereik: dikke druppel en uitstrijkje vullen elkaar aan. De sensitiviteit van een expert microscopist is ongeveer 50 P/μl. De betrouwbaarheid van microscopie staat of valt met de ervaring van de expert microscopist. Een laboratorium in West-Europa ziet hooguit enkele tientallen positieve gevallen/jaar (UZ Leuven ongeveer 12/jaar). Een analyse van gegevens van het Britse Malaria Reference Laboratory toonde echter aan dat de gemiddelde gevoeligheid van Britse routinelaboratoria 500 P/μl is (Moody 2002). Misdiagnose is dan ook niet ongewoon. Ook species-identificatie is vaak een probleem. Een studie in Engeland toonde aan dat slechts 73,6% van de 227 stalen met een single-species infectie die naar het referentielaboratorium werden doorgestuurd correct was gediagnosticeerd (Milne 1994). Van de 6 gemengde infecties werd slechts 1 correct gediagnosticeerd en in 11 van de 34 waarin door het referentielaboratorium geen parasieten teruggevonden werden door het verwijzende laboratorium parasieten gezien ([cfr. Resultaten kwaliteitsbewaking WIV](#)).

Opmerking: Een klassiek probleem is het over elkaar liggen van plaatjes en RBC.

### 1.4 Sterkte-zwakte-analyse

Lichtmicroscopisch onderzoek is de gouden standaard voor de diagnose en identificatie van malaria. De techniek op zich is goedkoop en vereist enkel een lichtmicroscop, kleurstof en electriciteit. De kostprijs wordt nagenoeg volledig bepaald door de geïnvesteerde tijd. De boordtabellen van het LAG schatten de kostprijs van lichtmicroscopie op 7,60 euro. De terugbetaling is 4 euro.

Deze techniek vereist echter de nodige ervaring en de accuraatheid staat of valt met de ervaring van de expert microscopist. Zeker in de derde wereld is expert microscopie slechts beperkt beschikbaar en ontbreekt vaak de nodige technische infrastructuur. De meeste microscopie wordt gedaan in landen met een matige tot lage transmissie zoals India en Brazilië.

Beschikbaarheid van een ervaren microscopist is in de geïndustrialiseerde wereld vaak een probleem, zeker buiten de normale werkuren. Het is ongewoon dat laboratoria in West-Europa en Noord-Amerika meer dan enkele tientallen gevallen per jaar te zien krijgen. Dit verklaart vermoedelijk waarom misdiagnose van malaria in de Westerse wereld niet

ongewoon is. In een studie in Engeland werd slechts 73,6% van de single-species infecties correct gediagnosticeerd. In 1/3 van de gevallen waren er technische fouten in de preparaten. Meestal werd een zure pH gebruikt. In Leuven gebruiken we oplosttabletten voor het maken van de buffer die bij een controle een correcte pH gaven. Er was in dezelfde studie wel geen correlatie tussen de aanwezigheid van technische fouten en misdiagnose (Milne 1994). Dit is wel door anderen gemeld.

Opmerking: *P. vivax* en *P. ovale* kunnen niet altijd microscopisch worden gedifferentieerd op basis van de morfologie. Het gebruik van moleculaire technieken (PCR) kan dan duidelijkheid bieden. (CDC)

### **Fluorescentie-microscopie**

Hierbij wordt gebruik gemaakt van fluorescerende kleurstoffen die het nucleïnezuur in de kern van aanwezige parasieten kleuren. Deze kleurstoffen worden geëxciteerd met UV licht. Twee frekwent gebruikte kleurstoffen zijn acridine orange (AO) en benzothiocarboxypurine (BCP). Eén van de bekendste technieken is de quantitative buffy-coat (QBC). Deze techniek vereist een fluorescentiemicroscopie en de nodige ervaring, doch is minder moeilijk dan microscopie. In ervaren handen is deze techniek zeer gevoelig, doch laat geen goede differentiatie van de species toe. Uit een vergelijkende studie ten opzichte van conventionele microscopie bleek dat deze test duidelijk zwakker was dan microscopie of een immunologische sneltest. De resultaten van 2 verschillende onderzoekers kwamen slechts in 73% van de gevallen overeen (Lema 1999). Een gelijkaardige techniek kan eventueel worden uitgevoerd met behulp van sterk daglicht, hetgeen zeer nuttig is in afgelegen gebieden. Fluorescentie-microscopie kan expert microscopie echter niet vervangen. De toegevoegde waarde in West-Europa lijkt dan ook beperkt.

### **Immunologische Sneltest**

Immunologische sneltesten (RDT) zijn eenvoudig en snel (15 minuten) uit te voeren. Aanvankelijk waren er enkel tests voor de detectie van *P. falciparum*. Er zijn nu reeds verscheidene jaren kits op de markt die ook non-falciparum-malaria kunnen opsporen. De WHO stelt in haar draft guideline betreffende het gebruik van RDTs van januari 2003 dat over het algemeen “immunochromatografische sneltesten even gevoelig zijn als routine microscopie voor de detectie van Plasmodium”.

Aangezien deze testen nog in volle ontwikkeling zijn, worden ze regelmatig bijgewerkt. Hierdoor zijn niet altijd vergelijkende studies beschikbaar tussen de nieuwste kits. De 3 onderstaande kits zijn onder verschillende vormen al verscheidene jaren op de (wereld)markt en zijn het uitgebreidst onderzocht. Er zijn tot op heden geen kits goedgekeurd door de FDA voor gebruik in de VS. Het Amerikaanse leger heeft FDA-goedgekeurde trials uitgevoerd met de ICT Malaria Pf/Pv test en met de OptiMAL test. Het aanvragen van de FDA goedkeuring zelf kost echter minstens 250.000 dollar. De markt in de VS is volgens Binax te klein om een definitieve goedkeuring aan te vragen.

- 1) ParaSight F test (Becton Dickinson): enkel P.f.
- 2) NOW ICT Malaria test (Binax, Portland, ME): P.f./non-falciparum
- 3) OptiMAL test (Flow Inc., Portland, OR): P.f./non-falciparum

## 1.1 Principe

- Immunochromatografie is gebaseerd op de detectie van in het bloed aanwezige antigenen met behulp van monoclonale antistoffen. Anti-Plasmodium antistoffen worden geconjugeerd aan een liposoom met een selenium kleurstof of aan goudpartikels in de mobiele fase. Tijdens de migratie van het antigen-antistof complex wordt dit laatste gevangen door een andere monoclonale antistof die vastzit op een nitrocellulose-membraan en fungeert als immobiele fase. Er wordt gebruik gemaakt van een dipstick of een kaartje. Hierdoor wordt een gekleurde lijn zichtbaar wordt. Er wordt een gelabelde antistof gebruikt voor de negatieve controle.
- Er worden antistoffen tegen 3 verschillende eiwitten gebruikt: HRP (histidine-rijk eiwit), pLDH (Plasmodium lactaat dehydrogenase) en Plasmodium Aldolase.
  - 1) **HRP**: Antistoffen tegen HRP-2, een wateroplosbaar eiwit dat door de asexuele stadia en jonge gametocyten van P.f. wordt gevormd, worden gebruikt in de NOW ICT Malaria Pf/Pv test en de ParaSight F test voor de detectie van P. falciparum . Het antigen kan tot minstens 28 dagen na het verdwijnen van de parasieten uit het perifere bloed aanwezig blijven, hetgeen tot vals positieve resultaten kan leiden (Humar 1997)
  - 2) **pLDH**: pLDH wordt geproduceerd door de asexuele en sexuele stadia van de Plasmodium parasieten. Antistoffen tegen pLDH isovormen worden gebruikt in de OptiMAL test.
  - 3) **pAldolase**: een ander enzyme uit de glycolytische pathway. Een antistof tegen Aldolase wordt gebruikt in de NOW ICT Malaria Pf/Pv test voor P.v.

## 1.2 Pre-analytische factoren

- Biologische variatie:
  - 1) de parasitemie varieert cyclisch. Er zijn geen studies die het nut van het herhalen van een negatieve sneltest hebben onderzocht of het effect van het wachten op de koortspiek. In een studie bij reizigers in Duitsland was de initiële sneltest positief bij alle 204 patiënten met P.f. (Richter 2004).
  - 2) sneltesten tegen HRP-2 hebben een slechte sensitiviteit indien alleen sexuele vormen aanwezig zijn in het perifere bloed. Dit is uitzonderlijk in West-Europa en een teken de acute aanval voorbij is en er geen direct gevaar is.
- Interferentie:
  - 1) chemotherapie kan leiden tot “vals-positieve” en “vals-negatieve” resultaten (cfr. opmerking). Positieve resultaten voor HRP-2 zijn beschreven tot minstens 28 dagen na start van succesvolle chemotherapie (Humar 1997).
  - 2) reumatoïde factoren kunnen vals positieve resultaten geven. Dit is vooral een probleem voor de ParaSight F test.
- Staatype: capillair bloed of bloed uit een EDTA-buis. Plasmodium kan zich verder ontwikkelen in een EDTA-buis.
- Staalstabiliteit: de EDTA tube mag 3 dagen worden bewaard op 2-8°C voor de NOW ICT Malaria sneltest.
- Kit: - bewaring van de NOW ICT P.f./P.v. test mag tussen 4 en 30°C
  - in de literatuur is melding gemaakt van slechte badges van verschillende kits

### 1.3 Analytische factoren

- Meetbereik: de sensitiviteit van immunologische sneltesten voor *P. falciparum* is zeer goed bij een parasitemie >100/μl. (>95%). Voor *P.v.* hebben ze echter een duidelijk lager meetbereik met over het algemeen een sensitiviteit van >80% bij een parasitemie >500/μl..
- Accuraatheid: wordt klassiek uitgedrukt ten opzicht van expert microscopie
  - 1) afhankelijk van de populatie
    - reizigers vs. residenten van een endemisch gebied
    - klinisch vermoeden vs. screening
    - neemt patiënt chemoprophylaxie?
  - 2) afhankelijk van het species: even betrouwbaar als routine microscopie voor de detectie van *P.f.*, doch minder goed voor non-*falciparum* malaria
  - 3) afhankelijk van de gebruikte test (type antistoffen, concentratie, ...)
  - 4) in de literatuur is melding gemaakt van slechtere badges die minder gevoelig zijn. BD en Binax hebben recent de productie-procedure voor hun sneltesten gewijzigd om een beter kwaliteitsgarantie te hebben. Binnen de WHO Organisation wordt nagedacht over het opzetten van een systeem van kwaliteitscontrole
  - 5) de test is snel en eenvoudig uit te voeren door laboratoriumpersoneel. Bij 2 studies bij reizigers bleek minstens 20% problemen te hebben met het uitvoeren of aflezen van de ICT Malaria *P.f.* test (Whitty 2000).

#### **- Evaluatie van de performantie van verschillende sneltesten**

- De performantie van sneltesten wordt meestal enkel vergeleken met de gouden standaard, expert microscopie. Hierdoor kan een positief resultaat van de sneltest bij een lage parasitemie verkeerdelijk als vals-positief worden geklasseerd (cfr. infra). Er wordt vaak niet ingegaan op de performantie van routine microscopie ten opzicht van de controle door de expert microscopist in het kader van de studie.
- Een tweede probleem dat zich vooral stelt bij het interpreteren van studies in endemische gebieden is het vaak ontbreken van voldoende informatie over het al dan niet nemen van chemotherapie. Sommige sneltesten kunnen positief blijven tot minstens 28 dagen na het verdwijnen van de parasieten uit het bloed, hetgeen een “vals-positief” resultaat kan geven. Anderzijds kunnen ten gevolge van de chemotherapie alle parasieten reeds dood zijn, terwijl er nog steeds parasieten te zien zijn op de Giemsa stain, waardoor de sneltest “vals-negatief” wordt. Om een goed beeld te krijgen van de betrouwbaarheid verdient het daarom aanbeveling om voort te gaan op studies waarin de sneltest zowel met microscopie als PCR werd vergeleken (Playford 2002, Wongsrichanalai 2003). Vooral studies waarbij screening bij symptoomloze patiënten die reeds medicatie nemen/hebben genomen op het moment van de staalname zijn in dit verband problematisch.
- Bij studies in afgelegen tropische gebieden stelt zich ook de vraag of de sneltesten correct werden bewaard.
- Tenslotte dient men ook rekening te houden met het opzet van de studie. Een belangrijk probleem in de wereldwijde strijd tegen malaria is dat een meerderheid van de landen waar malaria zeer endemisch voorkomt arme landen zijn, waar een goede laboratoriumdiagnose door middel van microscopie (dikdruppel+uitstrijkje) niet mogelijk is door gebrek aan getraind personeel en de nodige nodige laboratorium-infrastructuur. In deze landen wordt dan ook veelal enkel op klinische symptomen

voortgegaan. Dit leidt tot een significante overdiagnose die als noodzakelijk wordt beschouwd om de mortaliteit bij kinderen te verminderen. Sneltesten hebben het potentieel om de behandeling van malaria sterk te verbeteren in die gebieden waar het alternatief, goede microscopie, niet beschikbaar is (WHO Roll Back Malaria). In veel van deze landen wordt maar enkele euro per jaar aan gezondheidszorg uitgegeven. Een sneltest kost er ongeveer 0,5 euro, terwijl een behandeling voor multiresistente P.f. al gauw 2 euro kost. In deze landen beoordeelt men de kostenefficiëntie dan ook op een totaal andere manier dan in West-Europa.

#### 1) ParaSight F test (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

Deze test detecteert enkel P.f. In verschillende studies was de sensitiviteit en specificiteit voor de ParaSight F test 88 tot 95 procent en 95 tot 97 procent in vergelijking met PCR (UpToDate). Deze test is zeer goed voor de diagnose van P.f., maar heeft het probleem dat er kruisreactiviteit is met reumafactor. Dit wordt door verschillende auteurs gemeld. De ParaSight F test maakt gebruik van een monoclonale IgG antistof, terwijl de ICT Malaria P.f./P.v. test een IgM antistof gebruikt. Hiermee zijn er veel minder problemen gemeld van vals positieve resultaten door reumafactoren. De ParaSight test kan positief blijven tot 42 dagen na de microscopische eliminatie van de parasieten (Grobusch 2003). In een kleine studie bij 23 patiënten met reumafactoren zonder malaria waren 19 van de 23 patiënten positief met de ParaSight F test, terwijl geen enkele patiënt positief was met de ICT Malaria P.f./P.v. test (Bartoloni 1998). Deze test wordt niet meer gecommercialiseerd in België. De prijs was ongeveer 7 euro.

#### 2) NOW ICT Malaria test (Binax, Portland, ME)

De originele ICT Malaria P.f. test (ICT Diagnostics) bevatte enkel HRP-2 antistoffen voor de detectie van *P. falciparum* en wordt nog steeds gecommercialiseerd als MalaQuick test. In 1999 werden na de overname door AMRAD monoclonale antistoffen toegevoegd tegen Plasmodium aldolase voor de detectie van *Plasmodium vivax*. De naam werd veranderd in ICT Malaria P.f./P.v. test. Deze naam was echter misleidend aangezien een positief resultaat voor P.v. ook te wijten kon zijn aan P.o. of P.m (Win 2001). In 2000 werd de productie overgenomen door Binax. Binax behield het principe van een anti-HRP-2 antistof voor P.f. en een panmalaria anti-aldolase antistof (verfijnd), doch wijzigde de gebruikte materialen, reagentia en de productiemethode en herdoopte de test tot NOW ICT Malaria test. Het was onder andere de bedoeling een betere kwaliteitsgarantie te bieden en gevoeligheid voor non-falciparum malaria te verbeteren. Het principe van de detectie van P.f. werd niet veranderd. De teststroken waren nog steeds P.f. en P.v. gelabeld, alhoewel de bijsluiter duidelijk vermeldde dat de test een onderscheid maakt tussen P.f. en non-f. Bij de nieuwste reeks van de NOW ICT Malaria test zouden volgens Herman Diagnostics de teststroken nu P.f. en Malaria moeten noemen.

De NOW ICT Malaria test had in beide gepubliceerde studies in het geval van een klinisch vermoeden van malaria een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 96 tot 99,8% in vergelijking met expert microscopie en PCR voor de diagnose van P.f (Richter 2004, [Wongsrichanalai 2003](#)). Deze goede resultaten liggen in de lijn van de resultaten van de ICT Malaria P.f./P.v. Deze test haalde in verschillende studies in het geval van een klinisch vermoeden van malaria bij reizigers een sensitiviteit van >97% en een specificiteit van >98% (Grobusch 2002, Playford 2002, Richter 2004). In een studie bij klinisch vermoeden in de Indonesië was de sensitiviteit 95,5%. Er werd 1 infectie met een parasitemie van 4000 P/µl gemist. Aangezien de "vals-positieve"

resultaten niet werden gecontroleerd met PCR is de en de helft van de vals positieve patiënten chloroquine hadden genomen in de voorbije 4 weken is de gemelde specificiteit (89,8%) zeker een onderschatting (Tjitra 1999). Herman Diagnostics die de test in België commercialiseert heeft met de ICT P.f./P.v. test op meer dan 3000 verkochte ICT P.f./P.v. tests slechts 1 maal een melding gekregen van een vals-negatief resultaat voor P.f. (5000 P/μl). Ze kregen nog geen melding van vals negatieve resultaten met de NOW ICT Malaria test. In een recente studie met beide versies waarin retrospectief de resultaten van het samen gebruiken van de dikke druppel en de sneltest bij reizigers die koorts hadden en terugkwamen uit een endemisch gebied werden bekeken, was de eerste dikke druppel positief voor P.f. in 202 van de 2547 patiënten ([Richter 2004](#)). Bij 2 andere patiënten werden slechts bij een volgende dikke druppel trofozoieten gevonden (6 uur en 12 uur later). De initiële sneltest was positief in alle 204 patiënten met P.f. Daarnaast waren er 4 discordante positieve resultaten waarvoor geen gegevens over chemotherapie of PCR beschikbaar zijn. De sensitiviteit en specificiteit voor de diagnose van malaria waren bijgevolg 100% en  $\geq 99,8\%$ . Deze gegevens komen overeen met de gegevens in het UZ Leuven waarbij wij 36 gevallen hebben gehad op 327 aanvragen (11%) en de diagnose van malaria in alle 36 gevallen bij de eerste staalname (dikke druppel+sneltest) werd gediagnosticeerd. Deze sensitiviteit en specificiteit voor P.f. van de combinatie dikke druppel en de NOW ICT Malaria test zijn superieur aan microscopie alleen.

De sensitiviteit voor de diagnose van non-falciparum malaria bij een klinisch vermoeden is echter ook met de nieuwe kit nog steeds duidelijk minder goed dan voor P.f.. Met de ICT Malaria P.f./P.v. test was de sensitiviteit rond de 60-75% en een specificiteit van 98-100% bij een klinisch vermoeden van malaria (Tjitra 1999, Iqbal 2002, Gatti 2002). De nieuwe NOW ICT Malaria test werd in 1 studie geëvalueerd voor de diagnose van non-falciparum malaria en had een specificiteit van 87,5% en een sensitiviteit van 97,7%. Dit komt omdat de gevoeligheid afneemt bij een parasitemie  $\leq 500$  P/μl. De sensitiviteit was 100% bij een parasitemie  $>500$  P/μl (49/49), doch slechts 6/9 van de patiënten met een parasitemie van 101-500 P/μl en 2/5 van de patiënten met een parasitemie  $\leq 100$  P/μl waren positief (Wongsrichanalai 2003). 4 van de 5 patiënten met *P. malariae* waren positief. HRP2 gebaseerde sneltesten zoals de NOW ICT Malaria sneltest zijn niet geschikt voor screening bij asymptomatische patiënten omwille van het langere tijd positief blijven van de test en de verminderde gevoeligheid bij lagere parasitemies voor non-falciparum malaria (Mason 2002, Coleman 2002). Bij de ICT P.f./P.v. test werd nog een positieve sneltest gezien 32 dagen na het microscopisch negatief worden van de dikke druppel (Grobusch 2003).

P.f	P.v.	interpretatie
++		P.f., een gemengde infectie is mogelijk (P.v. mono-infectie kan)
+-		P.f. (<10% van de P.f. infecties), (P.v. is beschreven)
- +		non-falciparum malaria (P.f. is beschreven)
- -		P.f. is nagenoeg uitgesloten bij correct uitgevoerde test

Er zijn 60 laboratoria die deze test gebruiken ( $\pm 3000$  tests/jaar in België).

### 3) OptiMAL (Flow Inc., Portland, OR)

In een studie in 144 reizigers met een klinisch vermoeden van malaria in Australië werden de ICT Malaria P.f./P.v. test (voorloper van de NOW ICT Malaria P.f./P.v. test) en de OptiMAL test vergeleken. De sensitiviteit en specificiteit voor de detectie van malaria in vergelijking met expert microscopie waren 97% en 90%, voor de ICT Malaria

P.f./P.v. test en 85% en 96% voor de OptiMAL test (Playford 2002). Andere studies gaven een sensitiviteit van 90% tot 95% gegeven. De ICT Malaria P.f./P.v. test miste 1 P.f. infectie met een densiteit van 45/ $\mu$ l, terwijl de OptiMAL test P.f. infecties miste tot 2500/ $\mu$ l. De ICT Malaria P.f./P.v. test bleek in deze studie beter voor het uitsluiten van een P.f. infectie. Beide testen hadden een sensitiviteit van respectievelijk 44 en 80% voor de detectie van P.v. en gaven beide vals negatieve resultaten bij een parasitemie van meer dan 5000/ $\mu$ l. De specificiteit was wel  $\geq 97\%$  voor beide testen. Geen van beide testen laat dus toe op een betrouwbare manier een P.v. infectie uit te sluiten. Microscopie blijft dus noodzakelijk om non-falciparum malaria uit te sluiten. Het resultaat van voor P.v. kan gezien de goede specificiteit wel gebruikt worden ter ondersteuning van de microscopie. De OptiMal test kost ongeveer 2,5 euro. De firma heeft een nieuwe dipstick ontwikkeld die een onderscheid toelaat tussen alle 4 de species. Hiermee zijn echter nog geen publicaties gedaan en de test is niet commercieel beschikbaar. De OptiMal test is wel de beste van deze 3 testen voor de detectie van non-falciparum malaria. De OptiMal test blijft echter maximaal 2 dagen positief na microscopische eliminatie van de parasieten door chemotherapie (Grobusch 2003). De ontwikkeling van een test met de combinatie van een anti-HRP-2 antistof tegen P.f. en een anti-pLDH antistof voor de detectie van non-falciparum malaria lijkt dan ook wenselijk.

#### 1.4 Sterkte-Zwakke Analyse

De Murray, UpToDate en de informele guideline van de WHO stellen dat sneltesten waarschijnlijk even goed zijn voor de detectie van malaria als routine microscopie. In dit verband werd een interessant studie gedaan door de WHO met de OptiMAL test in Afghanistan waar malaria endemisch is (Kolaczinski 2004).

De 3 meest bestudeerde testen, de ParaSight F test, de ICT Malaria P.f./P.v. test en de OptiMAL test, werden in een recente studie vergeleken voor de detectie van P.f. in reizigers (Grobusch 2003). De sensitiviteit en specificiteit voor elk van de 3 testen waren als volgt: ParaSight F test (95,1% en 97,1%), ICT Malaria P.f./P.v. test (97,7% en 98,8%) en OptiMAL test (76,2% en 99,7%). De resultaten van de OptiMAL test voor de detectie van P.f. in deze studie zijn onvoldoende. Dergelijke zwakke sensitiviteit voor de OptiMAL test in vergelijking met de ICT Malaria P.f./P.v. test is ook elders reeds beschreven (Playford 2002). Dit is mogelijk te wijten aan slechte badges. Zonder bijkomende kwaliteitsgaranties en nieuwe studies lijkt het dan ook of te raden om op de OptiMAL test over te schakelen. De ParaSight F test en de NOW ICT Malaria test zijn minstens even gevoelig voor de detectie van P.f. als routine microscopie. De ParaSight F test heeft het nadeel dat hij enkel P.f. detecteert en dat er kruisreactiviteit is met reumafactor. Deze test wordt niet meer gecommercialiseerd in België.

In een recente studie (Richter 2004) waarin retrospectief de resultaten van het samen gebruiken van de dikke druppel en de sneltest bij 2547 reizigers die koorts hadden en terugkwamen uit een endemisch gebied was de eerste dikke druppel positief voor P.f. in 202 van de 204 patiënten met P.f. Bij de 2 andere patiënten werden 6 uur en 12 uur later in een volgende dikke druppel trofozoieten gevonden. De initiële sneltest was positief in alle 204 patiënten met P.f. Daarnaast waren er 4 discordante positieve resultaten op 2547 patiënten waarvoor geen gegevens over chemotherapie of PCR beschikbaar zijn. De sensitiviteit en specificiteit voor de diagnose van malaria waren bijgevolg 100% en 99,8%. Deze gegevens komen overeen met de gegevens in het UZ Leuven waarbij wij in de periode 2001-2003 36 gevallen van malaria hebben gehad op 327 aanvragen (11%) en de diagnose van malaria in alle 36 gevallen bij de eerste staalname (dikke druppel+sneltest) werd gediagnosticeerd. Een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 99,8% voor P.f. van de NOW ICT Malaria test in

combinatie met de dikke druppel is superieur aan microscopie alleen. Een specificiteit van de sneltest van  $\geq 99,8\%$  komt neer op  $\leq 1$  vals positief resultaat/8 jaar in het UZ Leuven.

De sensitiviteit voor een non-falciparum infectie van  $< 90\%$  is onvoldoende om microscopie te vervangen. Gezien de hoge specificiteit ( $\geq 97,7\%$ ) is de test ook hier nuttig. Een positieve sneltest voor non-falciparum malaria heeft in minstens 1 geval geleid tot de diagnose zeldzame trofozoieten van *P. vivax* door professor Verhaegen. Voor het UZ Leuven betekent een specificiteit van  $98\% \leq 2$  vals positieve resultaten voor non-falciparum/jaar.

De NOW ICT Malaria test kost in België 6,56 euro. Het uitvoeren van de test kan gebeuren tijdens het analyseren van de dikke druppel en vergt in totaal hoogstens 5 minuten. De terugbetaling is 6,90 euro (B250: identificatie van een infectieus agens in diverse, geen cumulatie met chlamydia-kweek). Bijgevolg is het aanvullend uitvoeren van deze sneltest naast de dikke druppel een nul-operatie voor het laboratorium. (de boordtabellen geven een kost aan van 15,1 euro, dit lijkt veel te hoog). Het Tropisch Instituut gebruikt een sneltest (UltiMed Quicktest) die enkel *P. falciparum* detecteert omdat deze ongeveer 3,5 euro kost. Er zijn nog enkele andere laboratoria die deze test gebruiken. Deze test gebruikt een HRP-2 antistof voor de detectie van P.f. Er zijn echter geen studies met deze test in PubMed te vinden. Een omschakeling zou voor het UZ Leuven neerkomen op een besparing van ongeveer 400 euro/jaar. Over deze test zijn echter bijna geen studies beschikbaar.

Het is dan ook aangewezen om de NOW ICT Malaria test systematisch uit te voeren in het kader van de diagnose van malaria. Het heeft echter geen nut de sneltest te gebruiken voor het opvolgen van de therapie.

### **Immunologische Antistof-bepaling**

De bepaling van anti-Plasmodium antistoffen geeft geen enkele plaats in de acute diagnostiek van malaria. Zij is enkel aangewezen om een niet-bewezen vroegere malaria-infectie te bevestigen bij een niet-immune patiënt, bijvoorbeeld wanneer een reiziger in Afrika chemotherapie kreeg op basis van een klinisch vermoeden zonder diagnostische bevestiging. Het ITG rekent hiervoor een identificatie van antistoffen tegen een hemoprotozoa aan (B500). Voor de 4 species is dit dus meer dan 50 euro.

### **PCR en kwantitatieve PCR**

PCR reacties gebaseerd op de detectie van Plasmodium-specifiek DNA of mRNA hebben een gevoeligheid van 5 parasieten/ $\mu$ l en kunnen gemengde infecties opsporen. De sensitiviteit en specificiteit ten opzichte van expert microscopie is bijna 100%. De techniek kan geen onderscheid maken tussen levende en dode parasieten.

Deze techniek vereist echter verschillende uren en voldoende expertise, dure reagentia en dure apparatuur. Eerst dient het DNA of mRNA uit het bloed te worden geïsoleerd. Hiervoor bestaan verschillende kits. Voor gewone PCR wordt vervolgens een exponentiële amplificatie uitgevoerd met behulp van een DNA-polymerase in een PCR-apparaat. Vervolgens dient het reactieproduct op gel te worden gezet. Er dient telkens een negatieve en een positieve controle te worden uitgevoerd. Men heeft dus 12 reacties (3/primer set) nodig voor de identificatie van het species bij 1 patiënt. De kostprijs voor 1 run voor 1 gen is zeker 30 euro.

Bij kwantitatieve PCR bestaat de mogelijkheid te vertrekken van mRNA (met eerst een RT-stap om cDNA te maken) of DNA. Vervolgens wordt de amplificatie van het cDNA of DNA continu of semi-continu gevolgd (real-time, niet te verwarren met reverse transcriptase) waardoor een schatting van de hoeveelheid aanwezig cDNA/DNA kan worden gemaakt ten opzichte van een referentiestaal of een standaardcurve. Indien van mRNA wordt vertrokken scheidt de niet gekende efficiëntie van de reverse transcriptase-stap een bijkomend probleem en dient men mRNA te gebruiken voor het referentiestaal of de standaard. Kwantitatieve PCR



vereist nog duurdere apparatuur en duurdere reagentia. Het produkt dient echter niet op gel te worden gezet, hetgeen een tijdsbesparing oplevert. Er dient echter opgemerkt te worden dat kwantitatieve reacties klassiek in tweevoud of drievoud uitgevoerd. Het is in tegenstelling met gewone PCR ook mogelijk om verschillende reacties in dezelfde well te doen. Dit kan echter problemen opleveren indien 1 product in overmaat aanwezig is en alle nucleotiden opgebruikt zijn alvorens de amplificatie van de andere producten boven de detectiegrens komt. In de praktijk wordt dit typisch gebruikt om een intern controle-gen (18S RNA, HPRT) te kwantificeren in “semi-quantitatieve” reacties zoals de detectie van polymorfismen (0,1 of 2 copieën/diploid genoom). Een gekochte Q-PCR kit kost gemakkelijk 100 euro/run. Een in huis ontworpen test voor 1 gen kost per run ongeveer 25 euro, hetgeen neerkomt op 100 euro/run voor species-identificatie.

#### Sterkte-Zwakte analyse

PCR reacties gebaseerd op de detectie van Plasmodium-specifiek DNA of mRNA hebben een gevoeligheid van  $\leq 5$  parasieten/ $\mu$ l en kunnen gemengde infecties opsporen. De sensitiviteit en specificiteit ten opzichte van expert microscopie is bijna 100%. Aangezien een PCR-reactie echter verschillende uren vergt en duur is, kan zij niet als een snelle diagnostische test voor malaria worden beschouwd. PCR is wel nuttig ter ondersteuning van microscopie en voor de identificatie van het species indien er twijfel is bij microscopie. Een andere mogelijke rol voor PCR is misschien weggelegd in de opvolging van therapie.

Het gebruik van PCR voor de identificatie van het species bij een diagnose van malaria (gem. 12/jaar in UZ Leuven) kan zeker een meerwaarde bieden vanuit diagnostisch oogpunt. De kostprijs hiervan is echter vermoedelijk zo'n 1500 euro/jaar. Gezien het beperkte aantal nieuwe gevallen van malaria in België kan PCR voor species-diagnostiek indien gewenst best op 1 plaats worden aangeboden.

#### **Malaria detectie met behulp van de Cell-Dyn CD3500 Celteller**

Er zijn verschillende rapporten verschenen in de literatuur over de diagnose van malaria door middel van het opsporen van hemazoïne bevattende leukocyten met behulp van de Cell-Dyn CD3500 geautomatiseerde celteller (Abbott). Het verschijnen van “monocyten” in de eosinofiele regio is een teken van de fagocytose van hemazoïne en bijgevolg van malaria. Deze techniek kan alle vormen van malaria opsporen. Er is echter geen specifieke software beschikbaar om deze events op te sporen. In 1 studie in Portugal werd een threshold van 2 events gebruikt. Dit gaf een sensitiviteit van 95% en een specificiteit van 88% vs. microscopie (Hänscheid 2001). In een andere studie met een threshold van 1 event was de sensitiviteit 72% en de specificiteit 96% (Mendelow 1999). Het verschil zou te wijten kunnen zijn aan een verschil in de kinetiek van pigment-bevattende WBC tussen verschillende bevolkingsgroepen. Deze techniek laat echter geen identificatie van het species toe. De sensitiviteit en specificiteit zijn onvoldoende om lichtmicroscopie te vervangen. Er is ook geen specifieke software voor de diagnose van malaria op de markt. Dit gegeven is interessant om weten voor wie een Cell-Dyn CD3500 heeft aangezien zo een diagnose kan worden gesteld bij een patiënt waarbij er geen klinisch vermoeden van malaria was. De bovenvermelde resultaten zijn echter niet van die aard dat zij de aankoop van dit toestel rechtvaardigen voor de diagnose van malaria.

## To do

### 1) Voorstellen procedure voor het gebruik van de sneltest

1. De sneltest wordt systematisch uitgevoerd naast de dikke druppel en het perifeer uitstrijkje in het kader van de diagnose van malaria.
2. indien 's nachts de sneltest en het perifeer uitstrijkje beide negatief zijn en de dikke druppel van slechte kwaliteit is, wordt een nieuwe dikke druppel met sneltest gevraagd 12 uur later wanneer een supervisor/assistent microbiologie aanwezig zal zijn.
3. Indien de initiële sneltest en dikke druppel negatief zijn worden beide om de 12 uur herhaald (3x) gedurende 36-48 uur alvorens malaria wordt uitgesloten. De diagnose van malaria is echter onwaarschijnlijk indien de initele dikke druppel en sneltest negatief zijn.
4. Een positieve sneltest wordt niet herhaald binnen 1 maand na de laatste positieve dikke druppel zoals in het kader van de opvolging van de chemotherapie aangezien de test vals positief kan blijven dagen tot weken na de eliminatie van de parasieten.

### 2) Voorstel aanpassen LIS:

1. De teststrook voor P.v. is niet specifiek voor P.v. De omschrijving P.v. dient daarom gewijzigd te worden in non-falciparum Plasmodium. Op de nieuwste sneltesten staat bij de teststrook malaria ipv. P.v.
2. Het resultaat van de sneltest wordt momenteel ingevoerd als positief/negatief voor de teststrook voor P.f en voor P.v (cfr. uitzicht kit). Dit scheidt echter onduidelijkheid aangezien indien beide teststroken positief zijn soms P.f+/P.v.- en soms P.f./P.v.+ wordt ingevuld. Dit resultaat wordt als dusdanig op het rapport vermeld. Geen van beide mogelijkheden geeft eigenlijk het resultaat correct weer. Er zou voor non-falciparum Plasmodium "niet te beoordelen" dienen te worden ingevuld aangezien een menginfectie niet uitgesloten kan worden. Een andere mogelijkheid is om een lijntje toe te voegen aan het verslag met uitleg over de interpretatie.
3. Het lijkt aangewezen dat bij validatie het rapport dat naar de clinici vertrekt automatisch zichtbaar zou zijn. Een goede opvolging van de resultaten kan ons toelaten om de performantie van de sneltest op te volgen. Bij 1 patiënt met P. falciparum stond op het verslag verkeerdelijk negatief voor de sneltest terwijl deze eigenlijk niet was uitgevoerd. Bij een tweede patiënt kregen de clinici de eerste 2 dagen "niet uitgevoerd" voor de dikke druppel en de sneltest op het rapport en de 4<sup>de</sup> dag "Plasmodium vivax". Op dat moment was het staal reeds 3 dagen opgestuurd naar het ITG ter confirmatie van de diagnose van P. vivax. Tenslotte was er 1 patiënt waarbij de dikke druppel en de sneltest 2 maal negatief waren. De derde dag was de sneltest opnieuw negatief en werd Plasmodium species gevalideerd. Deze diagnose werd echter nooit geconfirmeerd en er lijkt verkeerdelijk te zijn ingebracht.
4. Het resultaat voor de microscopie is volgens de richtlijnen van de NVKC "geen parasieten gezien" te zijn in plaats van "negatief".
5. Indien het LAG geen sneltesten meer doet binnen 1 maand na een positieve sneltest zou dit een besparing geven van ongeveer 280 euro/jaar (40 testen/jaar). Het LIS dient in geval op de weklijst indien er een positieve dikke druppel was in de laatste 28 dagen bij de sneltest "overbodig, sneltest wordt niet herhaald binnen 28 dagen na diagnose malaria". Er is momenteel 1 aanvraagnummer voor malaria.

#### 4) vraag naar de clinici voor goede klinische informatie

- vermelden van volgende gegevens op de aanvraagbon voor een diagnose van malaria:
  1. Klachten en klinische verschijnselen: koorts? ...
  2. Duur, plaats en tijdstip van het verblijf in endemische gebieden
  3. Overzicht van de gebruikte geneesmiddelen en de gevolgde profylaxie
  4. Is de patiënt gekend met malaria?
  5. Eventueel ander (onderliggend) lijden
  6. Koorts op moment van staalafname?
  7. resultaat eventuele vorige dikke druppel/sneltest?

(cfr. Murray, NTKC)

#### 4) Informatie Intranet

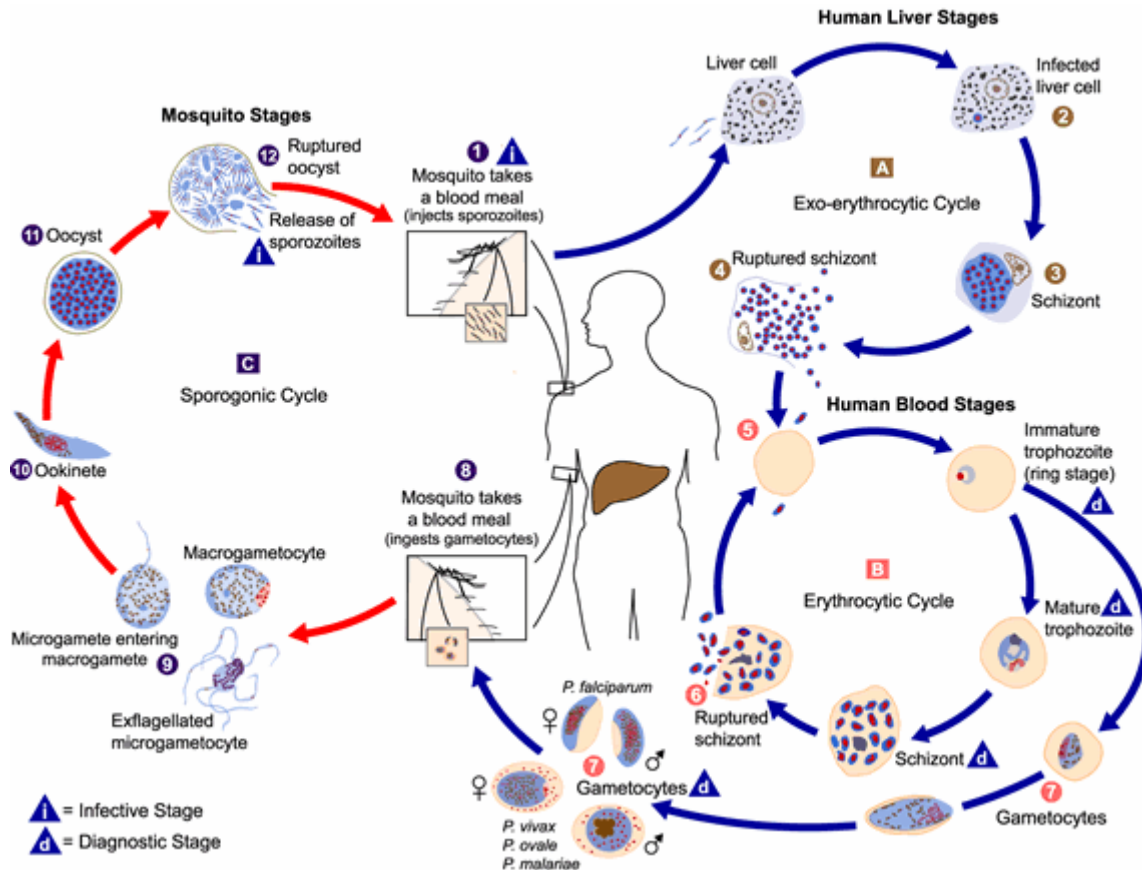
- procedure dikke druppel niet enkel bij “patiëntenzorg, maar ook bij “Protocols” vermelden.
- antwoordtijd voor de dikke druppel is nu <2 uur. Dit zou beter 2 uur zijn. Mogelijk is het zinvol om hier informatie te zetten over repetitieve staalnames.

#### 5) Diagnostische en Therapeutische Gids.

- update informatie over nieuwe sneltest
- voorstel sectie over malaria: Elke patiënt met koorts die in de laatste 2 maand in een is geweest waar malaria endemisch is heeft malaria tot het tegendeel bewezen is. 90% van de mensen die malaria oplopen in een endemisch gebied doen maar symptomen na hun terugkeer. *P. falciparum* infecties kunnen in tegenstelling tot *P. vivax*, *P. ovale* of *P. malariae* snel dodelijk verlopen door cerebrale malaria. Ongeveer 90% van de gevallen van *P. falciparum* infectie wordt opgelopen in Sub-Sahara Afrika en 90% hebben symptomen binnen 1 maand na hun terugkeer. Slechts 50% van de patiënten met *P. vivax* of *P. ovale* krijgen symptomen binnen 1 maand na hun terugkeer. Een acute episode van *P. malariae* is zeldzaam. Indien de eerste dikke druppel en de sneltest negatief zijn is de diagnose van malaria onwaarschijnlijk.

## Levenscyclus Malaria

Er zijn meer dan 170 species van intracellulaire *Plasmodium* parasieten bekend die een ganse reeks dieren, van amfibieën tot vertebraten, infecteren. Er zijn 4 *Plasmodium* species gekend die frekvent de mens infecteren: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*. De levenscyclus van speelt zich af in 2 gastheren. De parasiet plant zich asexueel voort in de mens en sexueel in de vrouwelijke Anopheles-mug. Zij heeft ongeveer iedere 48 tot 72 uur een nieuwe bloedmaaltijd nodig om eitjes te kunnen leggen en leven maximaal 1 maand.



Tijdens een bloedmaaltijd inoculeert een malaria-geïnfecteerde vrouwelijke anophelesmug sporozoïeten in de menselijke gastheer ①. Deze sporozoïeten infecteren levercellen ② and rijpen uit tot schizonten ③, die openbarsten en elk 1000den merozoïeten vrijzetten ④. Na deze initiële replicatie in de lever (exo-erythrocytaire schizogonie A), ondergaan de parasieten een asexuele vermenigvuldiging in de rode bloedcellen (erythrocytaire schizogonie B). De merozoïeten dringen dan binnen in de rode bloedcellen door endocytose en vormt zich om tot een trofozoïet (2-3 µm lang) ⑤. De trofozoïeten in het ringstadium rijpen uit tot schizonten, dewelke openbarsten en merozoïeten vrijstellen ⑥. Deze merozoïeten kunnen opnieuw rode bloedcellen infecteren. Deze cyclus duurt klassiek 48 uur voor *P. falciparum*, *P. vivax* en *P. ovale*, en 72 uur voor *P. malariae*. Een fractie van de merozoïeten differentiëren tot sexuele erythrocytaire stadia (gametocyten) ⑦. De klinische symptomen treden op tijdens de erythrocytaire stadia. Voor *P.f.* is de incubatieperiode klassiek 12-14 dagen, doch incubatieperiodes van meer dan 12 maand zijn beschreven, vooral bij semi-immune personen of mensen die die profylaxie namen op het moment van de infectie.

De gametocyten (mannelijke microgametocyten en vrouwelijke macrogametocyten) worden opgezogen door de vrouwelijke *Anopheles* mug tijdens een bloedmaaltijd ⑧. De parasitaire vermenigvuldiging in de mug wordt sporogonie genoemd C. In de maag van de mug bevrucht de microgameet de macrogameet met de vorming van een zygoot (diploid) ⑨. De zygoot wordt mobiel (ookineet) ⑩ en dringt door de wand van maag en ontwikkelt zich aan de buitenzijde tot een oocyste ⑪. In de oocyste worden haploïde sporozoïeten gevormd die worden vrijgezet na het openspringen van de oocyste ⑫. De sporozoïeten verplaatsen zich naar de speekselklier van de mug. De inoculatie in een nieuwe menselijke gastheer doet de cyclus van voor af aan herbeginnen ①. De

sexuele cyclus in de Anopheles-mug duurt 10 tot 40 dagen, afhankelijk van de buitentemperatuur en het Plasmodium species. De ontwikkeling valt stil bij een gemiddelde temperatuur van minder dan 16°C voor *P. vivax* en bij minder dan 18°C voor *P. falciparum*. In de tropen duurt de sexuele cyclus 12 dagen voor *P. falciparum*.

De vrouwelijke anophelesmug draagt de infectie over van mens op mens. Er zijn verschillende soorten Anopheles-muggen die verschillende soorten Plasmodium overdragen. Veel minder frequente mechanismen van besmetting zijn congenitaal verworven, na transfusie, via naalden en na orgaantransplantatie.

De parasieten verteren eiwitten en hemoglobine uit de rode bloedcellen. Ze halen hun energie uit de anaerobe omzetting van glucose tot lactaat, hetgeen aanleiding kan geven tot hypoglycemie en lactaat acidose. De rode bloedcelmembraan wordt rigider waardoor er hemolyse optreedt en een verhoogde afbraak in de milt, hetgeen aanleiding kan geven tot splenomegalie.

Er zijn belangrijke verschillen tussen de verschillende species:

**P.f.:** Bij *P.f.* wordt in de late trofozoieten en schizonten een antigenisch variabel eiwit in de celmembraan ingevoegd dat verantwoordelijk is voor de adhesie aan vasculair endotheel aan andere niet-geïnfecteerde rode bloedcellen. Hierdoor ontstaat ook een sequestratie van van RBC in de capillairen en venulen. Hierdoor worden late trofozoieten en schizonten niet aangetroffen in het perifere bloed. Deze sequestratie kan dan aanleiding geven tot microvasculaire pathologie, secundaire orgaanfunctie en overlijden van de patiënt. Dit is de reden waarom specifiek *P.f.* zeer gevaarlijk is. De shizogonie duurt 48 uur of minder. Dit patroon kan echter niet zo duidelijk zijn omdat schizonten op verschillende momenten kunnen openbreken. De sexuele cyclus valt stil bij een gemiddelde temperatuur van minder dan 18°C, hetgeen verklaart waarom deze parasiet niet voorkomt in gematigde streken en in de bergen in de tropen. De erythrocytaire cyclus duurt slechts 7-15 dagen en de parasiet dringt in alle RBC binnen, ongeacht de leeftijd. Er zijn zeer uitzonderlijke rapporten van een eerste aanval tot 24 maand na terugkeer. Er kunnen tot 3 parasieten/RBC zijn. Er is geen laattijdige heropflakking.

**P.v./P.o.:** De erythrocytaire cyclus van *P.o.* en *P.v.* duurt 48 uur. Zij veroorzaken geen acute mortaliteit, maar geven aanleiding tot anemie en splenomegalie. In het geval van *P. vivax* en *P. ovale* kan na het binnendringen van de merozoïet de ontwikkeling stilvallen met de vorming van een hypnozoïet. Deze inactieve hypnozoïet kan dan persistenten in de lever en een nieuwe opstoot veroorzaken weken, maanden of zelfs enkele jaren later door zich te ontwikkelen tot een schizont (secundaire schizogonie). Het is bij *P.v.* en *P.o.* ook mogelijk dat de initiële opstoot niet optreedt wanneer alle geïnfecteerde levercellen tot hypnozoïeten worden omgevormd. Bij de behandeling van *P.v.* en *P.o.* dient daarom aan de gewone behandeling primaquine-fosfaat te worden toegevoegd om de hypnozoïeten te elimineren. Het is geweten dat *P. vivax* het Duffy antigen nodig heeft om in de RBC te kunnen binnendringen. *P.v.* parasiteert vooral jonge RBC (reticulocyten). *P.o.* is lange tijd verward met *P.v.* en infecteert ook de jonge RBC. *P.o.* werd slechts in 1921 60 jaar na de 3 andere species geïdentificeerd.

**P.m.:** De merozoïeten van *P. malariae* infecteren bij voorkeur mature RBC, hetgeen resulteert in lage parasitemies (<1/100 RBC) en milde symptomen. *P.m.* kan aanleiding geven tot glomerulonefritis door de chronische neerslag van immuuncomplexen. Een acute opstoot is zeldzaam en laag-gradige infecties kunnen voor jaren persistenten. Er kunnen laattijdige opflakkingen zijn, doch er zijn geen hypnozoïeten. De heropflakkingen zouden te wijten zijn aan latente erythrocytaire vormen. Deze kunnen bijvoorbeeld tot uiting komen na een abdominale ingreep, in het bijzonder na een splenectomie. *P.m.* infecteert oude RBC. De shizogonie van deze parasiet duurt 72 uur in tegenstelling tot de andere species en werd daarom malaria quartana genoemd.

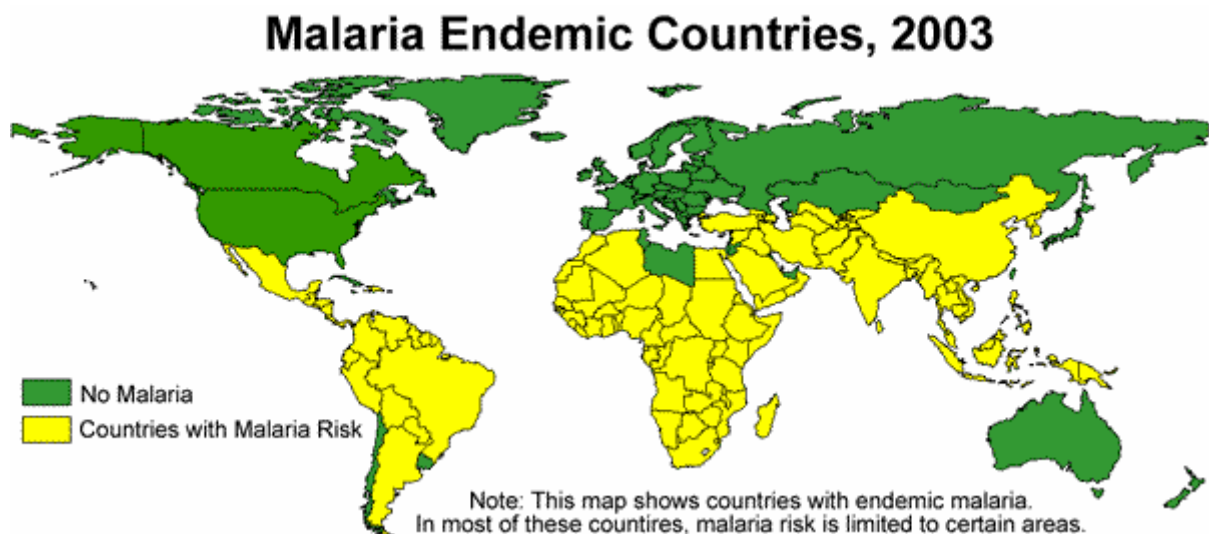
Een aantal genetische variaties van rode bloedcel-eiwitten (b.v. sikkelcelanemie) verhogen de weerbaarheid van de patiënt tegen malaria. Patiënten die in endemische gebieden wonen kunnen een partiële immuniteit ontwikkelen. Deze semi-immuniteit belet de infectie niet, doch de ernst van symptomen ten gevolge van de parasitemie zijn meestal beperkt. Deze gaat verloren indien men langere tijd in een niet-endemisch gebied verblijft.

(figuur: [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm))

(tekst: Murray, CDC, UpToDate)

## Endemische gebieden

Het verspreidingsgebied van malaria wordt ingegeven door leefgebied van de vector, de anopheles-mug. De endemische gebieden beperken zich tot tropische and subtropische gebieden. De vermenigvuldiging van de anopheles-mug vereist bloed, water en warmte. Besmetting kan niet optreden bij temperaturen lager dan 16°C of hoger dan 33°C en boven de 2000m. Klimaatveranderingen zouden echter kunnen leiden tot het (opnieuw) opduiken van malaria in Noord-Amerika en West-Europa. De anopheles-mug is in de zomer aanwezig in alle staten van de continentale VS. Hierdoor bestaat het risico op autochtone infectie indien de mug indien de mug een malaria-geïnfecteerd persoon bijt. Zo werden in 2003 in West Palm Beach, Florida, 7 personen geïnfecteerd door eenzelfde *P. vivax* stam.



*Plasmodium falciparum* en *P. malariae* komen voor in alle endemische gebieden (waarbij *P. falciparum* veruit het frekwentste is), terwijl van *Plasmodium vivax* en *P. ovale* traditioneel wordt gesteld dat ze complementaire niches innemen. 90% van de *P. falciparum* infecties worden opgelopen in sub-Sahara Afrika. *P. falciparum* is vooral endemisch in de tropische gebieden waar het warm en vochtig is en is er het ganse jaar endemisch. *P. vivax* veroorzaakt klassiek seizoensgebonden epidemies in de subtropische en gematigde klimaatzones.

Jaarlijks zijn er naar schatting wereldwijd meer dan 300 tot 500 miljoen nieuwe gevallen van malaria infectie en sterven 1,5 tot 2,7 miljoen mensen ten gevolge van malaria, waarvan 90% kinderen zijn uit Sub-Sahara Afrika. De meeste dodelijke epidemies vinden plaats in gebieden met een lage prevalentie van malaria. Vooral in Afrika is malaria een belangrijk socio-economisch probleem. De kostprijs voor Afrika wordt geschat op meer dan 10 miljard euro/jaar en malaria vertraagt de economische groei met 1,3%/jaar (RBM, Kain 1998)

In Noord-Afrika is malaria zeldzaam en komt men *P.v.* en *P.m.* tegen.

## Intensiteit van transmissie

De intensiteit van transmissie wordt met 3 verschillende indices gemeten: de splenische index (splenomegalie bij kinderen tussen 2 en 9 jaar), de Plasmodium-index (percentage kinderen <10 jaar met asexuele vormen in het bloed) en de gametocytaire index (percentage dragers van gametocyten). Een nieuwere index is de incidentie van klinische gevallen.

De onderstaande lijst schat het risico om malaria op te lopen voor een naïeve reiziger die 1 maand in een endemisch gebied verblijft en die geen profylaxie neemt en geeft een idee van de intensiteit van transmissie:

Oceanië	1/30 of meer
Sub-Sahara Afrika	1/50
Indiaas subcontinent	1/250
Zuid-Oost-Azië	1/1.000
Zuid-Amerika	1/2.500
Centraal-Amerika	1/10.000

(bron: CDC, UpToDate)

## Vergelijking van de 4 malaria species

	<b>P. falciparum</b>	<b>P. vivax</b>	<b>P. ovale</b>	<b>P. Malariae</b>
Prevalentie	Frekwent	Frekwent	Zeldzaam	Zeldzaam
Incubatie-periode	12 dagen (8-25)	14 (10-30) (soms maanden)	15 dagen (10-20)	18 dagen (15-35) (soms maanden)
Prepatente periode	11 dagen	12 dagen	12 dagen	32 dagen
Duur erythrocytaire schizogonie	48 uur	48 uur	48 uur	72 uur
RBC voorkeur	Alle leeftijden	Jonge RBC	Jonge RBC	Oudere RBC
Gem. parasitemie	1%	0,5%	0,05%	0,1%
Max. parasitemie	>40%	2%	2%	2%
Herval vanuit lever	Geen	Hypnozoieten	Hypnozoieten	geen
Ernst ziekte	risico op orgaanfalen en dood	Ongewoon	ongewoon	Zeldzaam (nefrotisch S. kan)

Ongeveer 90% van de gevallen van *P. falciparum* worden opgelopen in Sub-Sahara Afrika en 90% van de reizigers hebben symptomen binnen 1 maand na hun terugkeer, doch incubatieperiodes van meer dan 12 maand zijn beschreven, vooral bij semi-immune personen of mensen die profylaxie namen op het moment van de infectie.

Bij *P. vivax* en *P. ovale* infecties daarentegen krijgen slechts 50% van de geïnfecteerde personen symptomen binnen 1 à 2 maand na hun terugkeer. De initiële aanval kan bovendien zelfs uitblijven indien alle geïnfecteerde levercellen zich tot inactieve hypnozoieten ontwikkelen. Inactieve hypnozoiet kunnen persisteren in de lever en een opstoot veroorzaken weken, maanden of zelfs enkele jaren later. Bij de behandeling van P.v. en P.o. dient daarom aan de behandeling primaquine-fosfaat te worden toegevoegd om de hypnozoieten te elimineren. Primaquinine kan echter hemolytische anemie veroorzaken bij sommige patiënten met glucose-6-fosfaat dehydrogenase deficiëntie. Correcte identificatie van het species belet nodeloos gebruik van primaquine-fosfaat.

*P. malariae* tenslotte veroorzaakt zelden een acuut beeld in gezonde personen, doch laaggradige infecties kunnen jarenlang (tot meer dan 40 jaar) persisteren. *P. malariae* kan glomerulonefritis veroorzaken door depositie van chronische immuuncomplexen.

(Bron: Murray, NEJM, UpToDate, CDC, Gentilini)

Opmerking: het extract van de quinina plant werd reeds door de Incas gebruikt als middel tegen moeraskoorts en maakten een onderscheid tussen gevoelige en resistente moeraskoorts. In 1820 wordt het actieve alkaloid, kine, voor het eerst geïsoleerd. Tijdens de tweede wereldoorlog werd het synthetische chloroquine ontwikkeld door de Amerikanen.

De parasiet werd ontdekt in 1880 door Laveran. Initieel werden slechts 3 soorten beschreven. *P. ovale* werd pas in 1922 geïsoleerd.



## Malaria in het UZ Leuven

Microscopie	2001	2002	2003	Totaal	(2004) (jan+feb)
aantal dikke druppels	151	144	162		23
aantal patiënten *	106	112	109	327	18
aantal diagnoses malaria	18	6	12	36	3
eerste dikke druppel +	18	6	12	36	3

\* patiënten: heropname 1 maand later wordt als een nieuwe patiënt beschouwd, in tegenstelling tot herhaalde staalnames over verschillende opeenvolgende dagen bij dezelfde patiënt

### Populatie UZ Leuven

malaria: 36 gevallen  
geen malaria: 291 patiënten  
totaal: 327 patiënten

### Species-identificatie/patiënt

P.f.: 23 (70%) (2 niet geconfirmeerd)  
P.v.: 8 (24%) (1 niet-geconfirmeerd)  
P.o.: 2 (4%) (1 mogelijk menginfectie met P.v.)  
P.m.: 0

(diagnose referentielaboratorium Instituut voor Tropische Geneeskunde)

### Analyse ingevoerde resultaten van de dikke druppel en de sneltest in het LIS

(de ingevoerde resultaten zijn NIET onafhankelijk van elkaar en zijn louter informatief)

- Er werd geen enkele maal een vals positief resultaat in het KWS ingevoerd voor de sneltest.
- De oude ICT Malaria P.f. test was positief voor alle P.f. infecties (ik heb geen vals-positieve of vals-negatieve resultaten in het LIS gezien). De ICT Malaria P.f./P.v. test en NOW ICT Malaria test gaven bij elke nieuwe diagnose van P.f. en P.v. het correcte resultaat. De ICT Malaria P.f./P.v. test was 1 maal negatief bij een positieve dikke druppel. Het betrof volgens het ITG een P.o. infectie, al dan niet gemengd met P.v. Er zijn nog geen P.o. infecties geweest sedert de omschakeling naar de NOW ICT Malaria test.
- Patiënten die met een interval van 1 maand verschillende keren positief waren.
  - 1) Patiënt E.T. werd in februari 2001 en in juli 2001 gediagnosticeerd met *P. falciparum*. Er zijn geen andere resultaten voor malaria beschikbaar. In 2003 was patiënt negatief. De verschillende episodes zijn vermoedelijk te wijten aan verschillende reizen.
  - 2) Patiënt P.V. werd in oktober 2001 gediagnosticeerd met *P. v.* Twee maand later in december werd opnieuw *P. vivax* vastgesteld en in april 2002 opnieuw. Er zijn geen andere resultaten voor malaria beschikbaar.
  - 3) Bij patiënt J.L. werd in oktober 2002 *P.v.* gediagnosticeerd (DD+sneltest). Begin januari 2003 werd opnieuw *P.v.* vastgesteld (DD+sneltest). Eind

februari was de patiënt negatief op DD en sneltest. Eind maart 2003 werd echter opnieuw P.v. gediagnosticeerd.

Bij beide laatste gevallen was er vermoedelijk sprake van een verminderde gevoeligheid aan primaquine.

### **Malaria-registratie in België**

<b>Jaar</b>	<b>aantal gevallen</b>	<b>gem. aantal/lab/jaar</b>
1991	314	2,3
1992	249	1.9
1993	320	2.5
1994	423	3.2
1995	304	2.4
1996	326	2.5
1997	316	2.5
1998	334	2.6
1999	369	2.9
2000	337	2.6
2001	327	2.6

P. falciparum 73%  
P. vivax 15%  
P. ovale 9%  
P. malariae 3%

Het ITG heeft in 2001 65% van de gevallen geregistreerd.

Tussen 1994 en 2001 werd de infectie in 80-90% van de gevallen waarin de oorsprong was gekend in Afrika opgelopen.

Bron: Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid: Surveillance van Infectieuze Aandoeningen door een Netwerk van Laboratoria voor Microbiologie 2001 G. Ducoffre

## Kwaliteitsbewaking WIV uitstrijkjes parasitologie

P/4151 (2003)

Een 21-jarige man uit Burkina faso verblijft sinds een tiental jaar in België. Hij is 3 weken terug na een bezoek aan zijn thuisland. Op het ogenblik van de staalname vertoont de patiënt hoge rilkoorts en diarree.

Het preparaat bevatte trofozoieten van *P. falciparum*.

### Resultaten

<b>Parasiet</b>	<b>Aantal</b>
<i>P. falciparum</i>	186
<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>	3
<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i> + <i>P. ovale</i>	1
<i>P. malariae</i>	7
<i>P. vivax</i>	2
<i>P. ovale</i>	1
Plasmodium species	3
<i>Enteromonas hominis</i>	1
Microsporidia	1
<b>Totaal</b>	<b>205</b>

Slechts 2 laboratoria meldden niet de aanwezigheid van Plasmodium. In antwoord van beide suggesties vroeg het WIV om de recentste code-lijst te gebruiken. Indien we abstractie maken van beide onverwachte resultaten hebben alle laboratoria Plasmodium gezien. Bijna 10% slaagt er niet in de mono-infectie met *P.f.* als dusdanig te identificeren. De schattingen voor de parasitemie liepen sterk uiteen (minimum 0,8%, mediaan 5%, maximum 40%). Er dient ten slotte opgemerkt te worden dat *P. vivax* niet voorkomt in West-Afrika.

P/2920 (2001)

Een 45-jarige man komt op raadpleging naar het ITG na een fotosafari in het Krugerpark. Hij heeft regelmatige koortsposten.

De patiënt heeft *P. falciparum*.

### Resultaten

<b>Parasiet</b>	<b>Aantal</b>
<i>P. falciparum</i>	140
<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>	8
<i>P. falciparum</i> + <i>P. ovale</i>	1
<i>P. malariae</i>	43
<i>P. vivax</i>	9
<i>P. ovale</i>	5
Plasmodium species	17
<i>Trypanosoma brucei</i>	1
<b>Totaal</b>	<b>224</b>

Bijna 20% van de laboratoria vermelden *P. malariae*. Ook in bovenstaande test was *P. malariae* de meest frekwente verkeerde species-identificatie. *P. malariae* is nogthans relatief weinig frekwent in België en wereldwijd.

P/3562 (2002)

Een man van 30 jaar was 2 maand voor hospitalisatie in Madagaskar. Hij biedt zich aan met hoesten, algemene malaise sinds 3 dagen en koorts.

De patiënt heeft *P. vivax*.

### Resultaten

<b>Parasiet</b>	<b>Aantal</b>
<i>P. vivax</i>	113
<i>P. malariae</i>	42
<i>P. ovale</i>	22
<i>P. falciparum</i>	11
Plasmodium species	16
<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>	1
<i>P. malariae</i> + <i>P. vivax</i>	1
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	2
Geen parasieten gevonden	1
<b>Totaal</b>	<b>209</b>

Opnieuw heeft bijna iedereen Plasmodium gezien.

De differentieel diagnose *P. vivax* en *P. ovale* kan heel moeilijk zijn. *P. ovale* is slechts 60 jaar na de identificatie van de andere 3 species in 1921 als een onafhankelijk species ontdekt. Opnieuw is *P. malariae* de frekwentste verkeerde species-diagnose. 20% van de laboratoria antwoordden *P. malariae*.

P/ 4165 (2003)

Een 45-jarige man maakte een rondreis doorheen Zuid-Amerika. Sinds zijn terugkeer vertoont hij tekens van malaise, koorts en vermoeidheid. Hij nam tijdens zijn verblijf de correcte profylaxie.

Het preparaat was negatief.

### Resultaten

<b>Parasiet</b>	<b>Aantal</b>
Negatief	200
<i>P. vivax</i>	2
Bartonella species	2
Mansonella ozzardi	1
Trypanosoma cruzi	1
<b>Totaal</b>	<b>205</b>

P/3299 (2002)

Een jonge vrouw van 28 jaar heeft een reis van 6 weken doorheen Afrika ondernomen. Ze voelt zich ziek en heeft lichte koorts.

Het preparaat is negatief.

**Resultaten**

<b>Parasiet</b>	<b>Aantal</b>
Negatief	194
<i>P. falciparum</i>	4
<i>P. ovale</i>	3
<i>P. malariae</i>	1
<i>Plasmodium species</i>	2
<b>Totaal</b>	<b>205</b>

P/2919 (2001)

Een 32-jarige vrouw komt op raadpleging naar het ITG na een rondreis doorheen Zuidelijk Afrika: Zimbabwe, Malawi en Tanzania. Ze herinnert zich gebeten te zijn door een tse-tse vlieg. Ze voelt zich ziek en suf.

2 van de 224 laboratoria zien *P. falciparum* in de plaats van *Trypanosoma*.

**Wongsrichanalai 2003: Rapid diagnostic devices for malaria: field evaluation of a new prototype immunochromatographic assay for the detection of *Plasmodium falciparum* and non-falciparum *Plasmodium*. Wongsrichanalai C et Al. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003;69:26-30.**

Deze studie werd in Thailand door het Amerikaanse leger uitgevoerd met de NOW ICT Malaria test bij patiënten met een orale temperatuur van 38°C, hoofdpijn of een voorgeschiedenis van koorts in de laatste 72 uur, onafhankelijk van het al niet nemen van chemotherapie. De resultaten worden uitgedrukt ten opzichte van expert microscopie.

TABLE 1  
Cross-tabulation of NOW<sup>®</sup> ICT Malaria *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium vivax* (NOW ICT) results by Giemsa microscopy results \*

Microscopy	NOW <sup>®</sup> ICT Malaria test				Total
	Neg	Pf only	Non-Pf only	Pf +/- non-Pf	
Negative	135	5 <sup>°</sup>	–	–	140
Pf asexual	–	3	–	25	28
Pf asexual plus gametocytes	–	–	–	4	4
Pv asexual	4	1	18	0	23
Pv asexual plus gametocytes	1	0	37	2*	40
Mixed Pf and Pv	–	–	–	6	6
Pm	1	–	4	–	5
Total	141	9	59	37	246

° 2 van de 5 vals-positieven voor P.f. waren positief op PCR.

\* bij de 1 P.v. infecties die "vals-positief" waren voor P.f. en "vals-negatief" voor P.v. toonde PCR een gemengde infectie van P.v. en P.f.

- *P. falciparum*: sensitiviteit 100%, specificiteit 96,2% (>90% beide teststroken positief)

-non-falciparum: sensitiviteit 87,3%, specificiteit 97,7%

TABLE 2  
Cross-tabulation of NOW<sup>®</sup> ICT Malaria *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium vivax* (NOW<sup>®</sup> ICT) upper test line intensity by *P. falciparum* density \*

Pf density (P/μL)	NOW <sup>®</sup> ICT intensity of the HRP-2 (upper) Test line						Total
	0	0.25	0.50	1.0	2.0	3.0	
≤100	–	1	–	–	–	–	1
101–500	–	–	1	–	4	–	5
501–1,000	–	–	–	–	1	1	2
1,001–5,000	–	–	–	–	3	–	3
>5,000	–	–	–	–	13	8	21
Total	0	1	1	0	21	9	32

Alle infecties met P.f. werden gevonden met de sneltest. De laagste parasitemie was 20 P/μl.

TABLE 3

**Cross-tabulation of NOW<sup>®</sup> ICT Malaria *Plasmodium falciparum*/ *Plasmodium vivax*  
lower test line intensity by *Plasmodium* species and density \***

<b>Pv density (P/μL)</b>	<b>NOW<sup>®</sup> ICT intensity of the pan-<i>Plasmodium</i> (lower) test line</b>						<b>Total</b>
	<b>0</b>	<b>0.25</b>	<b>0.50</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>	<b>3.0</b>	
≤100	3	2	–	–	–	–	5
101–500	3	2	4	–	–	–	9
501–1,000	–	1	5	2	–	–	8
1,001–5,000	–	–	7	7	2	–	16
>5,000	–	1	–	4	18	2	25
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>63</b>

sensitiviteit: - >500 P/μl: 95,9% (100% vs. PCR)  
 - 101-500 P/μl: 66,7%  
 - ≤100 P/μl: 40%

**Richter 2004: Performance of an immunochromatographic test for the rapid diagnosis of malaria. Richter et Al. *Parasitol. Res.* 2004 Mar 9 [Epub ahead of print]**

Retrospectieve analyse van de combinatie van de eerste dikke druppel met de ICT Malaria P.f./P.v. test/NOW ICT Malaria test bij 2547 patiënten met koorts die recent in een endemisch gebied zijn geweest.

<b>Dikke Druppel</b>	<b>ICT Malaria P.f./P.v. test/NOW ICT Malaria test</b>	
	P.f. neg	P.f. +
P.f. neg	2337	6*
P.f. +	0	202

(\* 2 van 6 patiënten waren positief voor P.f. op 6 of 12 uur later)

De sensitiviteit van de sneltest voor de detectie van P.f. was 100% en de specificiteit >99,8%. Er waren 4 vals-positieve resultaten met de sneltest die niet met PCR werden gecontroleerd en waarover in de elektronische voorpublicatie geen veredere informatie werd gegeven.

De data over de gevoeligheid voor non-falciparum malaria zijn moeilijk te interpreteren aangezien deze in de test veranderd. De gemelde specificiteit van 37,5% doet vermoeden dat alle gevallen van mono-infectie met P.f. waarin de teststroken voor P.f. en P.v. beide positief waren als vals negatief werden beschouwd. In andere publicaties was de sensitiviteit bij symptomatische patiënten vaak slechts rond 70% (44-87%), doch de specificiteit voor non-falciparum malaria van zowel de ICT Malaria P.f./P.v. test en de NOW ICT Malaria test was overal  $\geq 98\%$  (Iqbal 2002, Huong 2002, Tjitra 1999, Playford 2002, Wongsrichanalai 2003)



**Playford 2002: Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travellers. Playford et al. *J. Clin. Microbiol.* 2002 40:4166-4171.**

Studie in australië bij symptomatische reizigers waarbij de ICT P.f./P.v. test en de OptiMAL test werden vergeleken met microscopie en PCR.

Table1. Comparison of the results of microscopy and PCR

Microscopy	Result by PCR							Total
	PF	PM	PO	PV	PF/PV	PF/PO	NEG	
PF (asexual±sexual)	32	-	-	-	-	-	-	32
PF (only sexual)	3	-	-	-	-	-	-	3
PM	-	2	-	-	-	-	-	2
PO	-	-	3	-	-	-	-	3
PV	-	-	1	50	-	-	-	51
PF/PV	-	-	-	-	1	-	-	1
PF/PO	-	-	-	-	-	1	-	1
NEG	3*	-	-	-	-	-	62	65
Total	38	2	4	50	1	1	62	158

\*Therapy was started before microscopy

Table 2: Comparison of the results of the ICT P.f./P.v. test and OptiMal test with PCR

Result by PCR	ICT P.f./P.v.			Total	OptiMal		
	PF	PV	NEG		PF	PV	NEG
PF	37	-	1*	38	28	-	10°
PM	-	-	2	2	-	-	2
PO	-	-	4	4	-	3	1
PV	-	22	28	50	2	40	8
PF/PV	1	-	-	1	1	-	-
PF/PO	1	-	-	1	1	1	-
NEG	2	-	60	62	1	-	61
Total	41	22	95	158	33	43	82

\* 45 P/μl

° up to 2500 P/μl

Table 3. Performance characteristics of ICT P.f./P.v and OptiMal compared with PCR and microscopy

Assay	Result by PCR or microscopy <sup>a</sup>	% Sensitivity (95% CI)	% Specificity (95% CI)	% PPV (95% CI)	% NPV (95% CI)
ICT P.f./P.v. test	Any parasite	63,5%	96,8%	96,8%	63,2%
	PF (all stages)	97,5%	98,3%	95,1%	99,1%
	PF (only sexual)	97,0%	90,4%	78,1%	99,1%
	PV	44,0%	100%	100%	79,4%
	Non-PF	39,3%	100%	100%	76,1%
OptiMAL test	Any parasite	78,1%	98,4%	98,7%	74,4%
	PF (all stages)	75,0%	97,5%	90,9%	92,0%
	PF (only sexual)	84,8%	96,0%	84,8%	96,0%
	PV	80,0%	97,2%	93,0%	91,3%
	Non-PF	76,8%	100%	100%	88,7%

De sensitiviteit van de OptiMal test (75%) voor P.f. is duidelijk onvoldoende om een betrouwbare diagnose van P.f. op basis van de sneltest uit te voeren aangezien het missen van P.f. dodelijk kan zijn voor de patiënt. De OptiMal test is duidelijk beter dan de ICT test voor het opsporen van non-falciparum Plasmodium. De nieuwe NOW ICT Malaria test heeft een hogere specificiteit voor non-falciparum malaria (Wongsrichanalai 2003), doch deze lijkt nog steeds mindere goed dan die van de OptiMal test. Beide testen werden echter nog niet in dezelfde studie vergeleken voor de diagnose van non-falciparum malaria.

**Grobusch 2003: Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of falciparum malaria in travellers returning to Berlin, Germany. Grobusch et Al. *Parasitol. Res.* 2003 Mar;89:354-357.**

Studie bij patiënten met koorts en vermoeden van malaria met de ParaSight test, de ICT P.f. test, de ICT P.f./P.v. test en de OptiMal test vs. microscopie. Enkel de performantie voor P.f. werd geëvalueerd.

Table 1: Performance of all 4 individual tests vs. microscopy.

Test	Result	Microscopy			Total	Sensitivity	Specificity
		Negative	P.f.	Non-P.f.			
<b>ParaSight</b>	Negative	368	7	30	405	95,1%	97,1%
	Positive	11	137	1	149		
	Total	379	144	31	554		
<b>ICT P.f.</b>	Negative	0	5	13	177	90,6%	99,4%
	Positive	159	48	1	49		
	Total	0	53	14	226		
<b>ICT P.f./P.v.</b>	Negative	332	3	19	354	97,7%	98,8%
	Positive	4	128	6	138		
	Total	336	131	25	492		
<b>OptiMal</b>	Negative	383	31	3	417	76,2%	99,7%
	Positive	1	99	22	122		
	Total	384	130	25	539		

De ICT P.f. test werd tijdens de studie door de fabrikant vervangen door de ICT P.f./P.v. test. Het aantal patiënten dat werd getest met de OptiMal test and the ParaSight test is kleiner dan met de ICT testen doordat er toeleveringsproblemen waren met beide tests.. Het resultaat van de subgroep van 310 patiënten die met de ParaSight test, de OptiMal test en 1 van de 2 ICT testen werden getest gaven ongeveer dezelfde resultaten.

De sensitiviteit en specificiteit van de ParaSight en de ICT testen voor de diagnose van P.f. is goed. Het principe van de ICT P.f. en de ICT P.f./P.v. test voor de detectie van P.f. is hetzelfde (anti-HRP2 antistof), doch er zijn wijzigingen aangebracht in de fabricage, hetgeen het verschil kan verklaren.

Table 2: Characteristics of follow-up data. Between 2 and 7 seven samples/patient were tested.

	Number of points	Total number of samples	Discordant results with microscopy	Positive 14 days after cure	Max. days positive after cure
<b>ParaSight</b>	74	117	51	15	42
<b>ICT P.f.</b>	20	28	9	2	18
<b>ICT P.f./P.v.</b>	85	139	57	12	34
<b>OptiMal</b>	61	100	5	0	2