



MALARIA DIAGNOSTIEK IN NEDERLANDSE LABORATORIA: VERSCHILLEN IN DE PRAKTIJK

Marrit Boonstra

Arts-microbioloog te Maastricht ziekenhuis

11 februari 2021



Erasmus MC
Universitair Medisch Centrum Rotterdam



Disclosure belangen spreker

**Geen (potentiële)
belangenverstrengeling**

**Voor bijeenkomst mogelijk
relevante relaties¹**

- Sponsoring of onderzoeksgeld²
- Honorarium of andere (financiële) vergoeding³
- Aandeelhouder⁴
- Andere relatie, namelijk ...⁵

Bedrijfsnamen

Geen

Aanleiding

- Microscopie is de gouden standaard in huidige richtlijnen
- In non-endemische landen ook aanvullende methoden:
 - ICT
 - QBC
 - PCR / LAMP

Richtlijnen
onvolledig of niet
eenduidig



- Variatie in methoden?
- Wat doen labs in Nederland?

Onderzoeksvragen

1. Wat is de variatie in diagnostische strategie (combinatie methoden)?
 - Wat en wanneer
2. In welke mate is er variatie in microscopie, de belangrijkste methode voor malaria diagnostiek?

Richtlijnen vergeleken obv bovenstaande

Vragenlijsten deelnemers SKML

O.a.

- **Aantal aanvragen / positieven per jaar**
- **Diagnostische strategie (wat en wanneer)**
- **Details over methode microscopisch onderzoek**

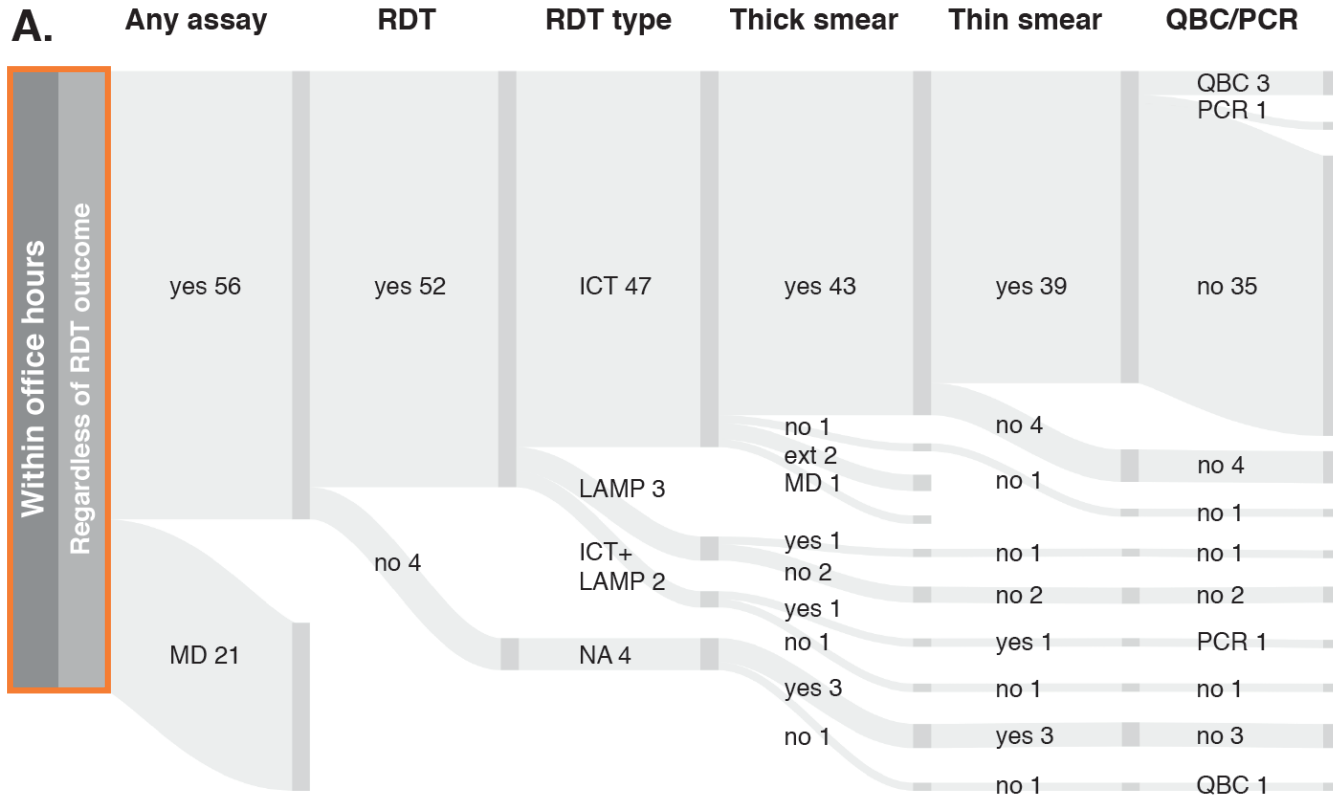
Ingevulde vragenlijsten

- **(gedeeltelijk) ingevuld door 67/77 (87%) vd deelnemende labs**

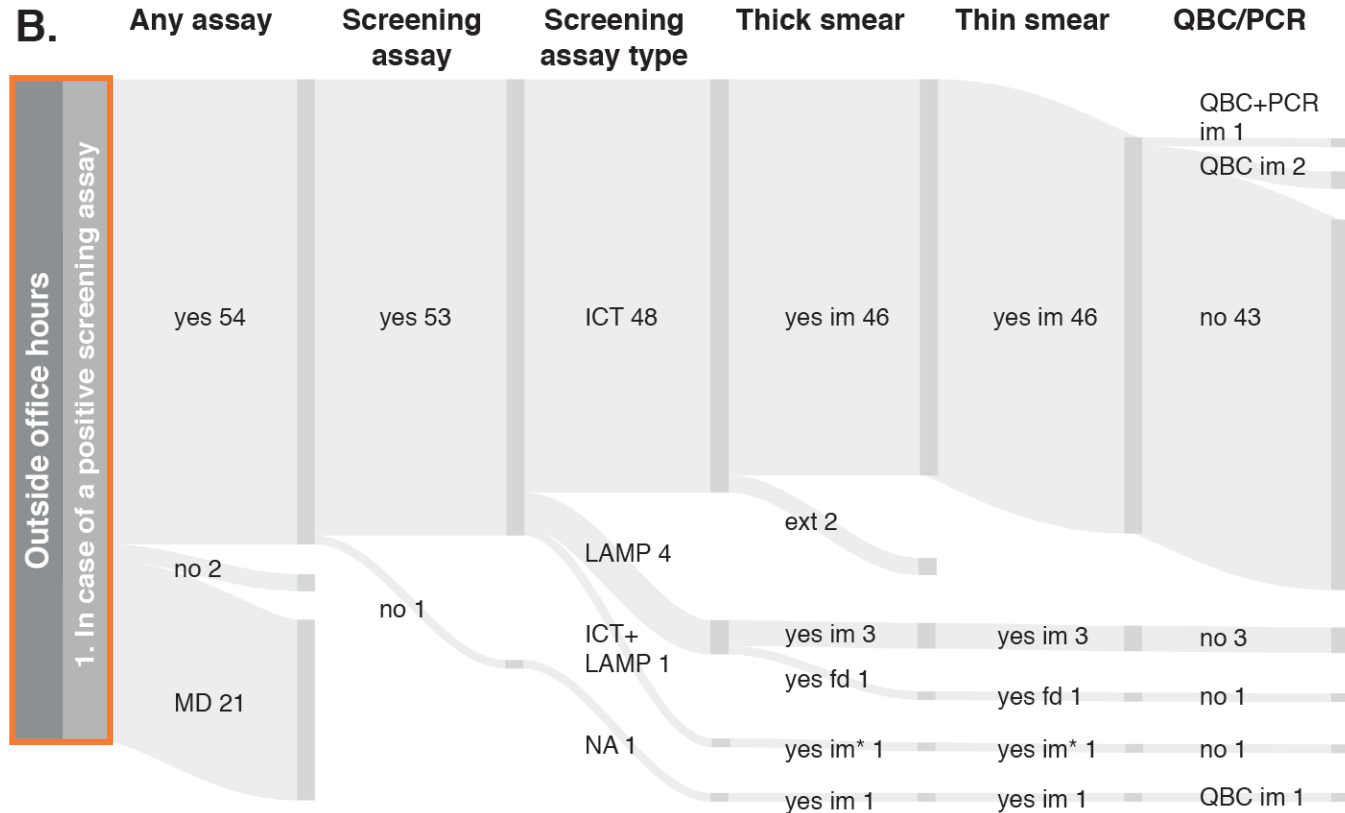
Aantal malaria aanvragen en pos casus per lab

- **De helft vd deelnemende labs krijgen <50 aanvragen per jaar**
- **Meer dan de helft vd deelnemende labs rapporteren <6 positieve casus per jaar**
- **9 labs rapporteren >10 casus per jaar**

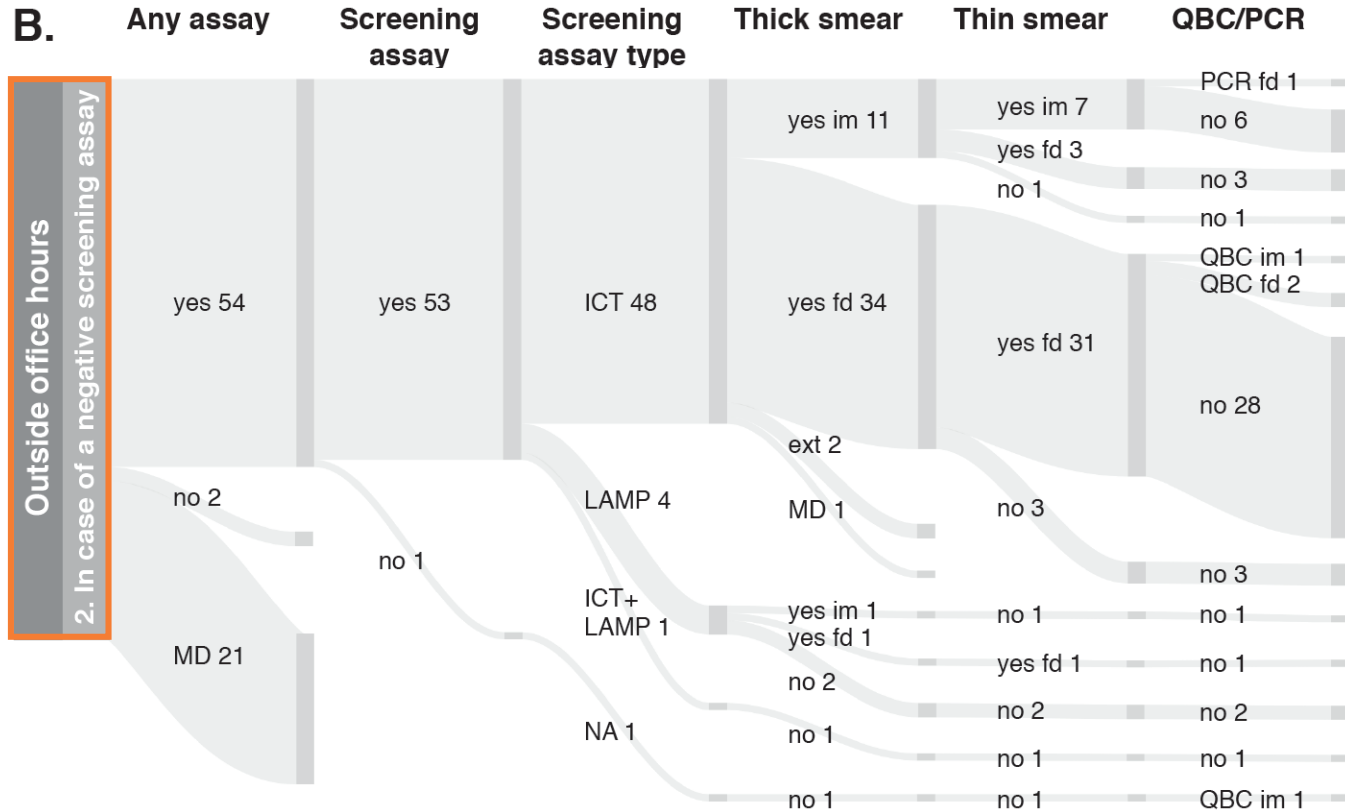
Diagnostische strategie (A)



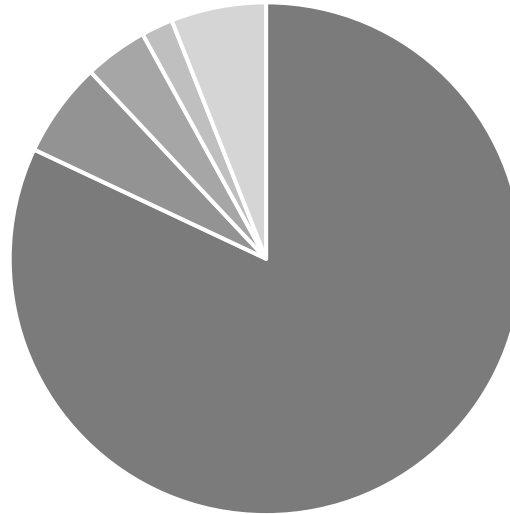
Diagnostische strategie (B1)



Diagnostische strategie (B2)

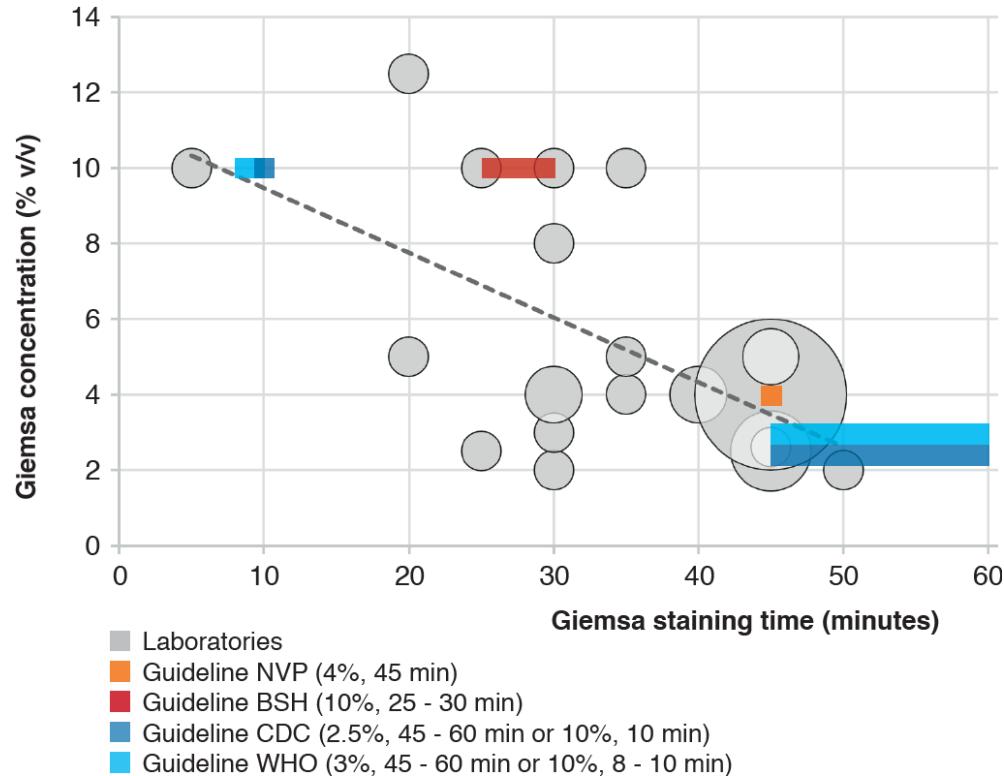


Kleuring bloedpreparaten (50 / 77 labs)



- Giemsa only (n = 41)
- Diff Quick only (n = 3)
- Diff Quick, Giemsa bij twijfel (n = 2)
- Diff Quick + Giemsa (n = 1)
- May-Grunwald Giemsa (n = 3)

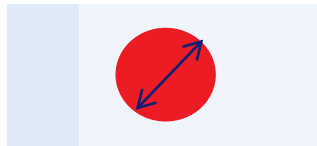
Kleuring van bloedpreparaten – Giemsa



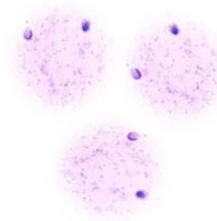
Sensitiviteit dikke druppel



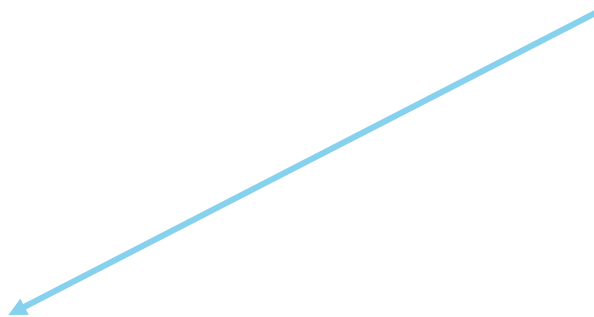
Volume



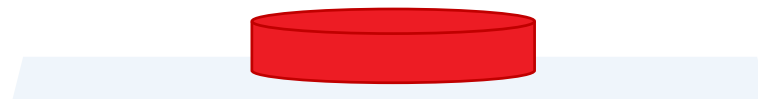
Diameter



Aantal microscopische beelden



versus



Sensitiviteit dikke druppel

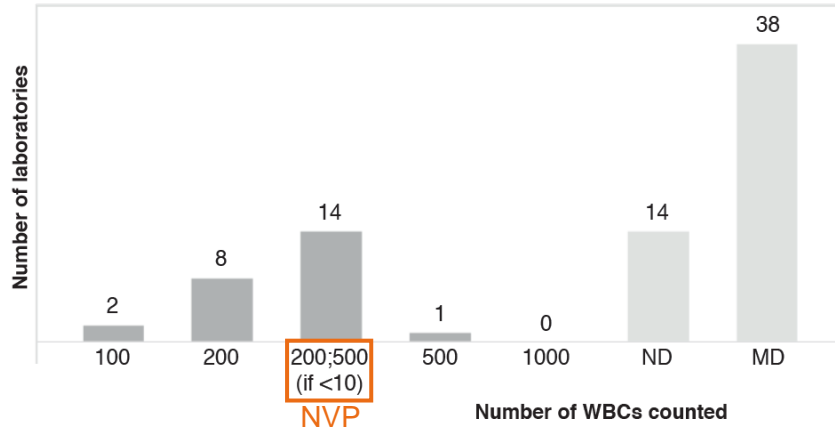
Thick smear					
Guideline/ laboratory	Volume of thick smear	Diameter of thick smear	Number of fields examined	Theoretical total examined volume	Theoretical limit of detection (based on 2 trophozoites)
Guideline	μL	mm	number	μL	Trophozoites / μL
NVP	6	12	200	0.3	7.41
BSH	several drops	-	200	.	.
CDC	small drop	17.9**	100 - 300	.	.
WHO	6	12	100	0.1	14.29
Range					
Minimum	6	6	75	0.09	1.2
Maximum	15	23.25*	413	1.65	21.9
Mean	8	14	207	0.47	7.4
Median	6	13	200	0.31	6.5

* the size of 1 euro coin; ** the size of a US dollar dime

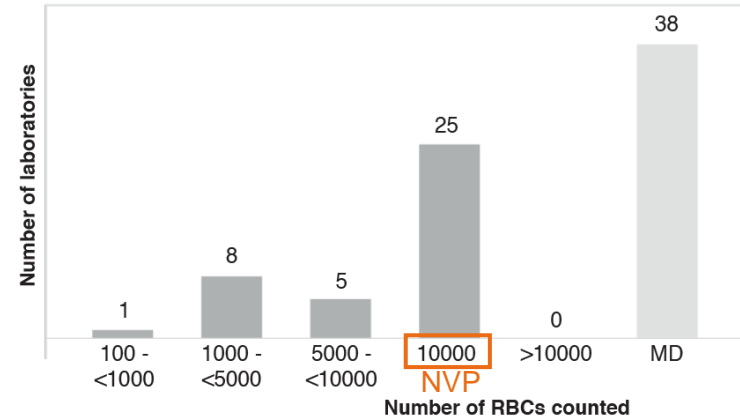
Parasitemie telling



A. Determination of parasite density in thick smear



B. Determination of parasite density in thin smear



Afkortingen; MD = missing data; NP = not performed; WBCs = white blood cells; RBCs = red blood cells.

Conclusie

- **Grote variatie in diagnostische strategie**
 - Binnen en buiten werktijd in labs
 - Tussen labs
- **Grote variatie tussen laboratoria in microscopie**
 - Giemsa kleuring, sensitiviteit DD, telling parasitemie



- **Invloed van variaties op kwaliteit van malaria diagnose is onbekend (moeilijk te onderzoeken)**

Aanbevelingen

- **Elk lab dient kritisch te zijn op eigen diagnostische strategie**
- **Verdere standaardisatie lijkt voor de hand te liggen, maar pas op**
 - **Invloed verschillen op kwaliteit is onbekend**
 - **Mogelijk is de specifieke strategie een zorgvuldige afweging van**
 - **Ervaring analisten**
 - **Beschikbaarheid van analisten binnen en buiten kantoor tijd**
 - **Aantal malaria aanvragen per jaar**
 - **Kosten**

Table 3 Strengths and limitations compared to the golden standard (microscopic examination of thick and thin smears) of additional methods to diagnose malaria.

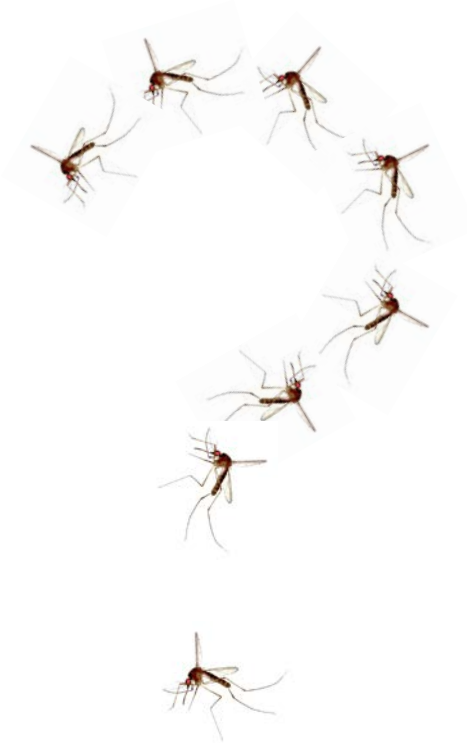
	Microscopic examination of thick and thin smear	ICT	LAMP assay	QBC examination	Real-time PCR
Sensitivity (detection limit)*	<i>Reference method</i>	--	+++	++	+++
<i>Plasmodium</i> species determination	<i>Reference method</i>	-	---	--	++
Parasitaemia determination	<i>Reference method</i>	--	---	--	-
Speed of examination	<i>Reference method</i>	+++	±	+++	--
Simplicity of examination	<i>Reference method</i>	+++	++	--	+
Inexpensive	<i>Reference method</i>	+++	±	-	±
Possible function in diagnostic strategy	All-round method that can be used as stand-alone method if experienced technicians are available	Fast and simple screening assay that can be organized close to the patient	Reliable exclusion of malaria by less experienced technicians	Fast screening for malaria parasites if experienced technicians are available	Slow confirmation assay in case other methods are non-conclusive

Abbreviations; ICT = immunochromatographic test; LAMP = loop mediated isothermal amplification; QBC = Quantitative Buffy Coat; PCR = polymerase chain reaction; *based on an experienced laboratory technician.

Bedankt!

- **Alle participerende laboratoria + analisten!**

- **Jaap van Hellemond (EMC)**
- **Rob Koelewijn (EMC)**
- **Sectie parasitologie SKML: Bert Mulder, Foekje Stelma, Theo Mank, Lisette van Lieshout en Welmoed Silvis**
- **Nicolette van der Ham (EMC)**



Aantal malaria aanvragen en pos casus per lab

Table 1 Characteristics of the 77 participating laboratories.

Malaria laboratory requests per year	Malaria positive patients per year							TOTAL no. of labs
	<1	1 - 5	5 - 10	10 - 25	25 - 50	> 50	MD	
<10	3	5	0	0	0	0	1	9
10 - 50	3	15	0	0	0	0	2	20
50 - 100	1	4	4	0	0	0	0	9
100 - 250	0	3	5	4	0	0	0	12
250 - 500	0	2	1	2	0	0	0	5
> 500	0	0	0	0	2	1	0	3
MD	0	0	0	0	0	0	19	19
TOTAL no. of labs	7	29	10	6	2	1	22	77

Abbreviations; MD = missing data; no. of labs = number of laboratories.

Is variatie gekoppeld aan de performance score van de labs?

Niet te onderzoeken,

- **Te veel variatie**
- **Te weinig waarnemingen**
- **Met de SKML-rondzending microscopie bloedparasieten toets je de morfologische beoordeling.**
 - **Dit is maar 1 facet van de gehele strategie**
- **Testen van gehele strategie is in praktijk onmogelijk**

- **FN (mm) = Field number = diameter beeldveld na vergroting oculair**
 - **Field of view = FN / vergroting objectief**
 - Vb: $20 / 10 = 2 \text{ mm}$; $20 / 100 = 0.2 \text{ mm}$
 - **FN 18mm voor oculair 10x; FN 16mm voor oculair 12,5x**
- **Berekening opp en dikte DD, middels volume en diameter**
 - **Oppervlakte cirkel = $r^2 \cdot \pi$ (mm² cirkel)**
 - **Theoretische dikte = uL / opp cirkel**
- **Sensitiviteit: #trofo's/uL (uitgaande van minimaal 2 gezien)**
 - **Aanname: 1 uL = 5.000.000 RBC's**