

# Malaria rapid diagnostic tests : Laboratory aspects in the diagnostic setting

Citation for published version (APA):

Gillet, P. (2011). *Malaria rapid diagnostic tests : Laboratory aspects in the diagnostic setting*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht; CAPHRI. <https://doi.org/10.26481/dis.20110622pg>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20110622pg](https://doi.org/10.26481/dis.20110622pg)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## **Chapter VII**

### **Summary, general discussion and future perspectives**

## Summary, general discussion and future perspectives

The present thesis aimed to close some gaps in knowledge about the test characteristics of malaria RDTs, end-user performance and the quality of the malaria RDT kits' packages and information inserts.

In **Chapter II**, the test characteristics of two one step malaria RDTs targeting *P. vivax* were assessed: SD FK70 malaria Ag Pv (only *P. vivax* detection) en SD FK80 Pf/ Pv (*P. falciparum* and *P. vivax* detection). Although the sensitivities of both malaria RDTs for the detection of *P. vivax* withstand comparison with the best among other malaria RDTs, there were some concerns. First, the sensitivity for the diagnosis of *P. vivax* is still not high enough to exclude the diagnosis of *P. vivax* in a reliable way. Further, it was noted – as for other malaria RDT brands - that sensitivity declines at parasite densities below 5,000/μl and particularly below 500/μl. Moreover, the sensitivities for the diagnosis of *P. falciparum* (for SD FK80) were lower compared to those obtained for other malaria RDT brands, including malaria RDTs using identical antibodies produced by the same manufacturer. Finally, the apparent cross-reactions of *P. falciparum* with the *P. vivax* test line are a serious limitation as to the applicability of these malaria RDTs in a field setting, in particular the two-band SD FK70. On the positive side, the clear and unequivocal distinction between *P. vivax* and *P. ovale* samples proved to be helpful in the reference diagnosis; SD FK70 is currently used in CLKB as a back-up tool for the microscopic diagnosis of both species pending species-specific PCR.

**Chapter III** assessed the occurrence and the intensity of the prozone effect in a laboratory and in a field setting. HRP-2 RDTs but not Pf-pLDH RDTs were demonstrated to be affected by prozone, although at a different extent and with lot-to-lot variations. Prozone was found to be rare in terms of intensity and frequency: negative and faint test lines accounted for a minority of prozone-positive samples (18.2% of 124 prozone positive samples) and the most affected brand among the malaria RDT brands assessed showed prozone with faint or negative test lines in 1.2% of all *Plasmodium* positive samples. However, faint test lines and even weak test lines tend to be disregarded as negative by end-users in endemic and non-endemic settings. Also the deployment of malaria RDTs to the community setting - where laboratory facilities for dilution of samples are not available - is of further concern [1-3]. In addition, the proportion of samples with elevated parasite densities will depend on local factors such as malaria endemicity and background immunity. The present findings should be taken into account when making the choice between either Pf-pLDH or HRP-2 based RDTs.

**Chapter IV** describes false-positive results in malaria RDTs caused by buffer substitution. About three quarters of malaria RDTs assessed showed a false-positive test line with at least one sample and one substitute buffer. Although no data on the use of substitute buffers exist, we observed many of such buffer replacements in the field and were also addressed by alumni colleagues about this problem. The results of this study might contribute to further adaptations in the design of malaria RDT kits, such as adding more than one buffer vial to the malaria RDT kits and adding a

warning to the information insert mentioning to stick to the dedicated buffer of the RDT kit.

In **Chapter V** the results of an external quality assessment session on malaria RDTs in a non-endemic setting are reported. The results indicated an excellent analytical performance of the malaria RDTs but pointed also to small albeit consistent errors in the test results interpretations, part of which were caused by errors in the malaria RDT kits' information inserts. The answers to the questionnaire confirmed the low exposure of the laboratory staff to *Plasmodium* positive samples but most importantly revealed a reliance on malaria RDTs as the primary and single tool for the diagnosis of malaria outside opening hours of the laboratory. In view of the possible diagnostic errors and the technical limitations of malaria RDTs, this practice should be avoided.

In **Chapter VI**, malaria RDTs were assessed for adequate and correct package, design and labelling of boxes and components as well as for readability and accuracy of information. Numerous shortcomings were noted, also among CE-labelled, ISO13485 certified products and products included in the WHO/FIND procurement list. Most relevant shortcomings were ambiguous labelling of the reading scales and deficient labelling of the buffer vials. The readability level of the information inserts was too elevated and the typography was user-unfriendly. Essential topics such as measures of biosafety were frequently not addressed and incomplete or incorrect information was observed with regard to depicted devices and interpretation of test lines. However, most of these errors may be easily corrected and clear instructions from professional and regulatory authorities might improve the quality of RDT packages and information inserts at a limited additional cost. Leading authorities such as the WHO or the European Community could stimulate such corrections and consolidate them, for instance as part of prequalification requirements or by adding to the so-called "Annex II products" for which the EU directive on in vitro diagnostics (IVD) prescribes lot testing prior to market release [4-7].

From the present studies it is clear that RDTs represent an essential part of malaria diagnosis, both in endemic and non-endemic settings. **Relevant conclusions emerging from the above described chapters** address the analytical, pre- and post-analytical characteristics of malaria RDTs. As part of the analytical characteristics, we demonstrated the diagnostic characteristics of two one-step RDTs targeting *P. vivax* and studied technical factors linked to the design of RDTs including the prozone effect and the false-positive results after buffer substitution. Both factors are in part related to the design of immunochromatographic tests, with no washing step to remove blocking antigens or non-specific interactions. Pre-analytical and post-analytical conclusions were revealed by the external quality assessment session of the malaria RDTs: they included errors with regard to (i) indications and diagnostic strategy (pre-analysis) and (ii) interpretation and reporting (post-analysis). Such errors may swiftly be corrected by simple measures and procedures which could be incited by working documents issued by professional organizations. As the errors in interpretation and reporting were related to the manufacturer's instructions, we further explored RDT packages and information inserts and pointed to a number of shortcomings, which may be easily corrected at a reasonable cost.

In the present study we also identified tracks and **additional research questions**. Chapters II and III cited the study of test characteristics of Pf-pLDH based RDTs. Of those, the SD FK40 (Standard Diagnostics Inc., Hagal-Dong, Korea), which is a Pf-pLDH/pan-pLDH based RDT, has been evaluated in a laboratory setting [8]. Evaluations of CareStart Pf-pLDH/pan-pLDH (Access Bio Inc, Monmouth Junction, NJ, USA) and SD FK90 (Standard Diagnostics Inc., Hagal-Dong, Korea), a combined HRP-2 and Pf-pLDH malaria RDT, are ongoing. The latter RDT would be – provided excellent test characteristics at a reasonable price – a good candidate for field settings: it is known that HRP-2 can persist for weeks after treatment of *P. falciparum* infection [9]. The combined detection of HRP-2 and Pf-pLDH by a RDT such as SD FK90 would not only counter the prozone effect, but also enable distinction between recent or treated *P. falciparum* infections. In addition, in Chapter II we observed occasional cross reactions of *P. falciparum* with the *P. vivax*-specific Pv-pLDH, reason why we decided to explore this phenomenon: we challenged a panel of *P. vivax*-detecting RDTs with a set of *P. falciparum* samples with high parasite densities. False positive Pv-pLDH lines were observed in 6/9 RDTs at frequencies ranging from 8.2% to 29.1% of 85 samples tested [10]. The readability problems of the package inserts of RDTs described in Chapter VI raised questions about interpretation and knowledge of diagnostic symbols developed by ISO 15223-1:2007 and EN 980:2008, which are used to circumvent the problem of the different languages of potential end-users. Together with our colleagues in the South, we conducted a survey among health care professionals in the Democratic Republic of the Congo, Cuba, Cambodia and Belgium in order to assess their actual and contextual knowledge of diagnostic and hazard symbols. For all participants combined, knowledge of symbols proved to be poor, with only three out of 20 symbols meeting the 67% correct score (ISO 3864 criteria). The two hazard symbols were familiar to most of the participants, but scored poor (< 50%). The poor comprehension of the symbols clearly evidenced the need of targeted training for a correct application of RDTs and *in-vitro* diagnostics in general, and manufacturers should include in the information inserts glossaries explaining the meaning of the symbols [11].

**Future research** will focus on the use of RDTs in resource-poor malaria endemic settings. In these settings, external quality assessments of RDTs such as performed in Chapter V require alternative test specimens resistant to harsh tropical climate conditions. Recently, dried tube specimens (DTS) have been developed as a simple and stable vehicle for serum samples in proficiency testing of HIV-antibody detection [12]. A similar system will be developed for blood specimens infected with *Plasmodium* species; it will be validated together with our partners in Lima, Peru.

Observations made in Chapter II and in other RDT evaluations performed at CLKB indicated that up to one third of positive test lines showed faint and weak intensities [8,13-17]. The problem of disregarding such low line intensities as negative might be higher than expected. Indeed, presbyopia (an accommodation deficit resulting in near vision failure) often goes unrecognised. In native Africans, its prevalence has been reported to be higher as compared to Europeans and its onset apparently occurs at lower ages [18,19] A role of presbyopia as an error in reading RDTs has been hypothesised [20], but the actual extent of the problem however is not known. Therefore, in collaboration with our partners in Kinshasa, a study measuring the

prevalence of presbyopia among end-users is presently set-up in the Democratic Republic of the Congo.

Observations made in Chapter VI about shortcoming in packaging, labelling and information of malaria rapid diagnostic tests will need a follow-up and should be expanded to other IVD. This work will be realized through the QUAMED network. The QUAMED network - hosted by ITM - brings together operational and academic organizations from the North and the South with as objective to contribute to build universal access to quality medicines.

The results of the studies conducted as part of this thesis's well as those of other publications in the field of laboratory aspects of RDTs are synthesized in two **concluding tables**. They have been compiled and published as part of the didactic report addressed to the participants of the external quality assessment session described in Chapter V [21]. Table 1 lists the added value of malaria RDTs in the laboratory diagnosis of malaria in a non endemic setting, with the strengths, limitations and particularities of the different antigens and *Plasmodium* species. Table 2a and 2b lists the "do's and don'ts" to be respected in the daily laboratory use of RDTs.

It can be concluded that RDTs are of clear benefit in malaria diagnosis. Sound knowledge of their characteristics and limitations by the end-user will increase their value as a diagnostic tool.

## Chapter VII: Summary, general discussion and future perspectives

**Table 1:** How can malaria rapid diagnostic tests add to the diagnosis of malaria in a non-endemic setting?

Requirements for malaria diagnosis	Contribution of malaria RDTs	Comments
Timely confirmation or exclusion of the diagnosis of malaria with prompt referral in case of doubt	Considerably helpful in the diagnosis of malaria	Excellent sensitivity, especially for <i>P. falciparum</i> > 100 parasites/μl
		False-negatives for <i>P. falciparum</i> at low parasite densities (<100/μl), occasionally above
	Do not rule out malaria in a confident way (microscopy needed as well)	Certain HPR-2 mutations may not be picked-up
		Prozone effect is rare but occurs, particularly in HRP-2 based malaria RDTs
Distinction between <i>P. falciparum</i> (possible life-threatening) and the non- <i>falciparum</i> species	Of considerable help in the identification of <i>P. falciparum</i>	Only of moderate help for diagnosis of <i>P. vivax</i> and of little help for <i>P. ovale</i> and <i>P. malariae</i>
Assessment of parasite densities, in particular recognition of critical values (>2% of red blood cells infected)	Of no help	Mixed infections are rare but not excluded if <i>P. falciparum</i> - and pan-species antigen lines are present
Recognition of <i>P. falciparum</i> stages and hemozoin	Of no help	Line intensities are indicative for parasite density but here is a very large overlap
		Unique HRP-2 line may point to low parasite density

## Chapter VII: Summary, general discussion and future perspectives

**Table 2a:** Do's and don'ts of malaria diagnostic tests (endemic and non-endemic settings).

DO	Comments
Check the control line – repeat malaria RDT if control line is not visible	Absence of control line means invalid test and no conclusion can be drawn
	Too little blood may cause false-negative results
Respect the correct volume (you may use a pipette instead of the transfer device)	Too much blood will cause decreased clearance of the strip, hindering reading
	Too much blood may increase the risk/intensity of prozone effect
Consider a faint line also as a positive line	Any visible line is a positive line
Repeat a negative malaria RDT in case of suspicion of malaria	Repeat after 8-12 hours for a successive 4 times over 36 hours to rule out malaria
DON'T	Comments
Do not store malaria RDTs in the freezer	Freezing will destroy colloidal gold
Do not read before or beyond the recommended reading time	Reading too early may cause false-negative results
	Waiting too long may cause false-positive results
Do not use malaria RDTs for treatment follow-up	HRP-2 based malaria RDTs remain positive for weeks after <i>P. falciparum</i> infection, gametocytes express pLDH and aldolase

**Table 2b:** Do's and don'ts of malaria diagnostic tests (addendum for non-endemic settings).

DO	Comments
Always combine malaria RDT with microscopy	See Table 1
Use a transfer pipette	Transfer devices of malaria +RDT kits tend to be small and somewhat difficult to manipulate
Send any positive or doubtful sample to the reference laboratory for confirmation	For Belgium, see request form and instructions on: <a href="https://www.iph.fgov.be/epidemie/epin/plabnl/N_Plasmodium.pdf">https://www.iph.fgov.be/epidemie/epin/plabnl/N_Plasmodium.pdf</a> <a href="https://www.iph.fgov.be/epidemie/epifr/plabfr/F_Plasmodium.pdf">https://www.iph.fgov.be/epidemie/epifr/plabfr/F_Plasmodium.pdf</a>



## References

1. Batwala V, Magnussen P, Nuwaha F: **Are rapid diagnostic tests more accurate in diagnosis of plasmodium falciparum malaria compared to microscopy at rural health centres?** *Malar J* 2010, **9**: 349.
2. World Health Organization: **Guidelines for the treatment of malaria, second edition**, 2010. [[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf)].
3. World Health Organization: **World malaria report 2010**. 2010. [[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf)].
4. European Commission: **European standards in vitro diagnostic medical devices**. 1998. [[http://ec.europa.eu/enterprise/policies/european-standards/documents/harmonised-standards-legislation/list-references/iv-diagnostic-medical-devices/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/policies/european-standards/documents/harmonised-standards-legislation/list-references/iv-diagnostic-medical-devices/index_en.htm)].
5. World Health Organization: **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance; Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 1 (2008)**. 2009. [[http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports\\_brochures/malaria-diagnostics-report-2009.html](http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports_brochures/malaria-diagnostics-report-2009.html)].
6. World Health Organization: **Overview of the prequalification of diagnostics assessment process**. 2010. [[http://www.who.int/entity/diagnostics\\_laboratory/evaluations/pqdx\\_007\\_pq\\_overview\\_document\\_v3.pdf](http://www.who.int/entity/diagnostics_laboratory/evaluations/pqdx_007_pq_overview_document_v3.pdf)].
7. World Health Organization: **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance; Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 2 (2009)**. 2010. [[http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports\\_brochures/malaria-diagnostic-test-report-round2.html](http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports_brochures/malaria-diagnostic-test-report-round2.html)].
8. Maltha J, Gillet P, Cnops L, Bottieau E, Van Esbroeck M, Bruggeman C, Jacobs J: **Evaluation of the rapid diagnostic test SDFK40 (Pf-pLDH/pan-pLDH) for the diagnosis of malaria in a non-endemic setting**. *Malaria Journal* 2011, **10**: 7.
9. Moody AH, Chiodini PL: **Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection**. *Br J Biomed Sci* 2002, **59**: 228-231.
10. Maltha J, Gillet P, Cnops L, Van Den Ende J, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Malaria rapid diagnostic tests: Plasmodium falciparum infections with high parasite densities may generate false positive Plasmodium vivax pLDH lines**. *Malar J* 2010, **9**: 198.
11. Hermans V, Monzote L, Van den Sande B, Mukadi P, Sopheak T, Gillet P, Jacobs J. **Assessment of the comprehension of diagnostic and hazard symbols among health care workers in four international settings**. Submitted.
12. Parekh BS, Anyanwu J, Patel H, Downer M, Kalou M, Gichimu C, Keipkerich BS, Clement N, Omondi M, Mayer O, Ou CY, Nkengasong JN: **Dried tube specimens: a simple and cost-effective method for preparation of HIV proficiency testing panels and quality control materials for use in resource-limited settings**. *J Virol Methods* 2010, **163**: 295-300.
13. Gillet P, Bosselaers K, Cnops L, Bottieau E, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Evaluation of the SD FK70 malaria Ag Plasmodium vivax rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Malar J* 2009, **8**: 129.
14. Gillet P, van Dijk DP, Bottieau E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Test characteristics of the SD FK80 Plasmodium falciparum/Plasmodium vivax malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Malar J* 2009, **8**: 262.
15. Van der Palen M, Gillet P, Bottieau E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Test characteristics of two rapid antigen detection tests (SD FK50 and SD FK60) for the diagnosis of malaria in returned travellers**. *Malar J* 2009, **8**: 90.
16. van Dijk DP, Gillet P, Vlieghe E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Evaluation of the Palutop+4 malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Malar J* 2009, **8**: 293.
17. van Dijk DP, Gillet P, Vlieghe E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Evaluation of the Immunoquick+4 malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, **29**: 577-583.
18. Kaimbo K, Maertens K, Missotten L: **Study of presbyopia in Zaire**. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 1987, **225 Pt 2**: 149-156.
19. Patel VL, Branch T, Arocha JF: **Errors in interpreting quantities as procedures: the case of pharmaceutical labels**. *Int J Med Inform* 2002, **65**: 193-211.
20. Rennie W, Phetsouvanh R, Lupisan S, Vanisaveth V, Hongvanthong B, Phompida S, Alday P, Fulache M, Lumagui R, Jorgensen P, Bell D, Harvey S: **Minimising human error in malaria**

- rapid diagnosis: clarity of written instructions and health worker performance.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, **101**: 9-18.
21. Gillet P, Mukadi P, Vernelen K, Van Esbroeck M, Muyembe JJ, Bruggeman C, Jacobs J: **Comments to the results of the EQA session 2009/3 on malaria rapid diagnostic tests.** 2011. [[http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external\\_quality/rapports/\\_down/microbiologie/2010/10-3N-Commentaar-malaria-sneltesten.pdf](http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/_down/microbiologie/2010/10-3N-Commentaar-malaria-sneltesten.pdf)].



## **Hoofdstuk VII**

### **Samenvatting, algemene discussie en toekomst perspectieven**

**Samenvatting, algemene discussie en toekomst perspectieven.**

Deze thesis heeft als doel enkele hiaten te dichten in de algemene kennis over test karakteristieken, de uitvoering door de gebruiker en de kwaliteit van de verpakking en de ingesloten gebruiksaanwijzing van malaria sneltesten (rapid diagnostic tests: RDTs).

In **Hoofdstuk II** werden de test karakteristieken geëvalueerd van 2 verschillende single-step RDTs gericht tegen *P. vivax*: SD FK70 malaria Ag Pv (enkel *P. vivax* detectie) en SD FK80 Pf/ Pv (*P. falciparum* en *P. vivax* detectie). Hoewel de gevoeligheid van beide RDTs voor de detectie van *P. vivax* op gelijke voet staat met de gevoeligheid van de beste RDTs, zijn er toch enkele zaken die onze aandacht vragen. Enerzijds is deze gevoeligheid nog steeds niet hoog genoeg om de diagnose van *P. vivax* op een betrouwbare manier uit te sluiten. Anderzijds stelden we vast dat – net als voor andere RDTs – de gevoeligheid ook sterk verminderd bij parasitemiën lager dan 5,000/µl en in het bijzonder lager dan 500/µl. Bovendien was de gevoeligheid voor de diagnose van *P. falciparum* (voor SD FK80) lager dan deze die werd verkregen met andere Pf - RDT, inclusief malaria RDTs die gebruik maken van identieke antilichamen geproduceerd door dezelfde fabrikant. Ten slotte vormt de kruisreactiviteit van *P. falciparum* met de *P. vivax* test lijn een belangrijke beperking voor de toepasbaarheid van deze RDTs, vooral de twee-band SD FK70. Weliswaar bleek het duidelijke en eenduidige onderscheid tussen *P. vivax* en *P. ovale* stalen zeer nuttig in een referentie setting. Momenteel wordt de SD FK70 gebruikt door het Central Laboratorium voor Klinische Biologie (CLKB, ITM) als back-up voor microscopische diagnose van beide species in afwachting van het resultaat van de species specifieke PCR.

**Hoofdstuk III** handelt over het voorkomen en de intensiteit van het prozone effect (vals negatief test resultaat bij hoge parasitemie) in een referentie setting en in een endemische setting. Er werd aangetoond dat HRP-2 RDTs in tegenstelling tot Pf-pLDH RDTs, getroffen kunnen worden door het prozone effect, weliswaar in verschillende mate en afhankelijk van lot tot lot. Prozone bleek zeldzaam te zijn in termen van intensiteit en frequentie: negatieve en “faint” test lijntjes waren goed voor een minderheid van de prozone-positieve stalen (18.2% van 124 prozone positieve stalen) en het meest getroffen merk onder de geteste RDTs vertoonde prozone met negatieve of “faint” test lijntjes in 1.2% van alle *Plasmodium* positieve stalen. Evenwel worden “faint” en zelfs “weak” test lijntjes vaak als negatief beschouwt door gebruikers zowel in endemische als non-endemische gebieden. Ook het inzetten van deze tests op het terrein – waar lokale labo’s niet zijn uitgerust voor het verdunnen van stalen – is van belang [1-3]. Bovendien hangt de proportie van stalen met een verhoogde parasitemie ook af van lokale factoren zoals malaria

endemiciteit en achtergrond immuniteit van de populatie. Deze huidige bevindingen moeten in het achterhoofd worden gehouden bij het maken van keuzes tussen het gebruik van ofwel Pf-pLDH ofwel HRP-2 gebaseerde RDTs.

**Hoofdstuk IV** beschrijft vals-positieve resultaten bij het uitvoeren van malaria RDTs met een andere buffer dan de buffer voorzien in de kit. Ongeveer driekwart van de malaria RDTs die werden geëvalueerd, vertoonden een vals-positief resultaat voor ten minste één staal en één gesubstitueerde buffer. Hoewel er geen gegevens bekend zijn over het gebruik van buffer vervanging, observeerden we zelf verschillende van deze buffer vervangingen op het terrein. Ook alumni collega's wezen ons op dit probleem. Het resultaat van deze studie zou kunnen bijdragen tot verdere aanpassingen in het ontwerp van malaria RDT kits, zoals het toevoegen van meer dan één buffer flacon aan de malaria RDT kits en het vermelden van een waarschuwing in de gebruiksaanwijzing omtrent het belang van het gebruik van de voorziene buffer.

In **Hoofdstuk V** worden de resultaten gerapporteerd van een externe kwaliteitscontrole rond het gebruik van malaria RDTs in een non-endemische setting. Deze tonen een uitstekende analytische prestatie aan van de malaria RDTs, maar wijzen ook op kleine doch consistente fouten in de interpretatie van de test resultaten, deels veroorzaakt door foute omschrijvingen in de gebruiksaanwijzing. De antwoorden op de vragenlijst bevestigden de lage blootstelling van het labo personeel aan *Plasmodium* positieve stalen, maar als belangrijkste punt bracht dit een vertrouwen aan het licht in de RDTs als eerste en enige diagnostisch middel voor de diagnose van malaria buiten de openingsuren van het labo. Gezien de mogelijke diagnostische fouten en de technische beperkingen van malaria RDTs, moet deze praktijk absoluut vermeden worden.

In **Hoofdstuk VI** werden malaria RDTs geëvalueerd voor hun adequate en correcte verpakking, ontwerp en etikettering van dozen en componenten alsook voor de leesbaarheid en accuraatheid van de aangeboden informatie. Talrijke tekortkomingen werden opgemerkt, zelfs voor CE-gelabelde, ISO 13485 gecertificeerde producten en producten opgenomen in de Wereldgezondheidsorganisatie (WGO)/FIND aankooplijst. De meest relevante tekortkomingen waren de dubbelzinnige labels van de resultaten schaal en het onvoldoende labellen van de buffer flacons. De gebruiksaanwijzing was moeilijk leesbaar en de typografie was niet gebruiksvriendelijk. Essentiële onderwerpen als bio veiligheidsmaatregelen waren heel vaak niet vermeld en er werd onvolledige en incorrecte informatie vastgesteld bij de afbeeldingen en de interpretatie van de test lijn resultaten. De meeste van deze fouten kunnen echter heel gemakkelijk worden opgelost en duidelijke instructies van professionals en regelgevende instanties kunnen de kwaliteit van RDT verpakkingen en gebruiksaanwijzingen verbeteren

tegen een lage additionele kostprijs. Leidinggevende instanties zoals de (WGO) of de Europese Gemeenschap zouden deze verbeteringen kunnen aanmoedigen en versterken, bijvoorbeeld als deel van de pre kwalificatie eisen of door het toevoegen aan de zogenoemde “Annex II producten” voor dewelke de EU richtlijn over in vitro diagnostica (IVD) lot testing voorschrijft vooraleer het product op de markt wordt gebracht [4-7].

Deze huidige studies tonen duidelijk aan dat malaria RDTs een essentieel onderdeel van malaria diagnose vertegenwoordigen, zowel in endemische als non-endemische gebieden. De relevante conclusies uit bovenstaande hoofdstukken bepalen de analytische, pre- en post-analytische karakteristieken van malaria RDTs. Als onderdeel van de analytische karakteristieken toonden we de diagnostische karakteristieken aan van twee single-step RDTs voor de detectie van *P. vivax* en bestudeerden we technische factoren gelinkt aan het ontwerp van RDTs zoals het prozone effect en vals-positieve resultaten na buffer vervanging. Beide factoren zijn ook deels gerelateerd aan het ontwerp van de immuno-chromatografische strips, waarbij geen wasstap wordt uitgevoerd om blokkerende antigenen of specifieke interacties te verwijderen. Pre-analytische en post-analytische karakteristieken werden duidelijk door de externe kwaliteitscontrole van malaria RDTs. Deze bracht fouten aan het licht met betrekking tot (i) indicaties en diagnostische strategie (pre-analyse) en (ii) interpretatie van de resultaten en rapportering (post-analyse). Aangezien fouten met betrekking tot de interpretatie en de rapportering van de resultaten verband hielden met de foutieve instructies van de producent, verkenden we de RDT verpakking en gebruiksaanwijzing verder. Dit onderzoek wees op een aantal tekortkomingen die eenvoudig en tegen een aanvaardbare prijs verholpen kunnen worden door enkele simpele maatregelen en procedures te nemen. Deze kunnen op hun beurt worden aangemoedigd door werkdocumenten uitgegeven door professionele organisaties.

In de huidige studie identificeerden we ook enkele bijkomende onderzoeksvragen. Hoofdstuk II en III gaan over de studie van testkarakteristieken van Pf-pLDH gebaseerde RDTs. De SD FK40 (Standard Diagnostics Inc., Hagal-Dong, Korea) welke een Pf-pLDH/pan-pLDH gebaseerde RDT is, werd reeds geëvalueerd in een labo setting [8]. Evaluaties van CareStart Pf-pLDH/pan-pLDH (Access Bio Inc, Monmouth Junction, NJ, USA) en SD FK90 (Standard Diagnostics Inc., Hagal-Dong, Korea), een gecombineerde HRP-2 en Pf-pLDH malaria RDT, zijn lopende. Deze laatste RDT zou – mits excellente test karakteristieken voor een redelijke prijs – een goede kandidaat kunnen zijn voor het terrein: het is geweten dat HRP-2 gedurende enkele weken na de behandeling van een *P. falciparum* infectie kan persisteren in het bloed [9]. De gecombineerde detectie van HRP-2 en Pf-pLDH door een RDT zoals SD FK90 zou niet enkel het prozone effect kunnen omzeilen, maar geeft ook de mogelijkheid een onderscheid te maken tussen een huidige en een

recente of behandelde *P. falciparum* infectie. Daarenboven, in Hoofdstuk II observeerden we occasionele kruisreacties van *P. falciparum* met *P. vivax*-specifieke Pv-pLDH, reden waarom we besloten dit fenomeen verder te onderzoeken: we onderwierpen een panel van *P. vivax* RDTs aan een set van *P. falciparum* stalen met hoge parasitemie. Vals positieve Pv-pLDH lijntjes werden geobserveerd in 6/9 RDTs met frequenties gaande van 8.2% tot 29.1% voor 85 stalen [10].

Het probleem van de leesbaarheid van de gebruiksaanwijzing van RDTs beschreven in Hoofdstuk VI deed vragen rijzen over de interpretatie en de kennis van diagnostische symbolen ontwikkeld door ISO 15223-1:2007 en EN 980:2008, die werden geïntroduceerd om het probleem van talenkennis van de mogelijke gebruikers te omzeilen. Samen met onze partners in het Zuiden voerden we een enquête uit bij professionele gezondheidswerkers in de Democratische Republiek of the Congo, Cuba, Cambodja en België met het oog op de evaluatie van hun actuele en contextuele kennis van diagnostische (gevaaren) symbolen. Voor alle deelnemers samen was de bewezen kennis van de symbolen zeer klein. Enkel drie van de 20 symbolen werden voor 67% correct gescoord (ISO 3864 criteria). Hoewel de twee gevaaren symbolen wel herkend werden als gevaar bij de meeste deelnemers, haalde deze toch een te lage score (< 50%). De slechte kennis van de symbolen bewijst zeer duidelijk de nood aan specifieke trainingen omtrent het correct gebruik van RDTs en *in-vitro* diagnostica in het algemeen. Fabrikanten zouden in de gebruiksaanwijzing een verklarende lijst moeten insluiten om de betekenis van de symbolen te verduidelijken [11].

**Toekomstig onderzoek** zal gericht worden op het gebruik van RDTs in malaria endemische ontwikkelingslanden. In zo'n omgeving vragen externe kwaliteitscontroles zoals deze beschreven in Hoofdstuk V alternatieve test specimens die bestand zijn tegen de tropische temperaturen en vochtigheid. Recent werden "dried tube specimens" (DTS) ontwikkeld als een simpel en stabiel transportmiddel voor sera voor de detectie van HIV-antilichamen [12]. Een gelijkaardig systeem zal worden ontwikkeld voor bloedstalen geïnfecteerd met *Plasmodium* species; Dit systeem zal worden gevalideerd samen met onze partners in Lima, Peru.

Waarnemingen uit Hoofdstuk II en ook in andere RDT evaluaties uitgevoerd door CLKB geven aan dat bijna één op drie positieve test lijnen een zwakke tot zeer zwakke intensiteit vertonen ("weak" en "faint") [8,13-17]. Het probleem van de interpretatie van deze tests als negatief zou dus groter kunnen zijn dan oorspronkelijk verwacht. In Afrikaanse landen wordt presbyopia (of verziendheid) vaak niet herkend. Bij deze bevolking zou de prevalentie zelfs hoger zijn dan in de Europese en zou deze aandoening op jongere leeftijd [18,19] voorkomen. Een mogelijke rol van verziendheid als een oorzaak van het foutief aflezen van RDT resultaten werd al vooropgesteld [20], maar de mate waarin is tot nu toe nog niet



gekend. Daarom zetten wij momenteel een studie op met onze partners in Kinshasa om de prevalentie van presbyopia bij RDT gebruikers na te gaan.

Waarnemingen gedaan in Hoofdstuk VI over de tekortkomingen in verpakkingen, labels en gebruiksaanwijzingen van malaria RDTs vragen een verdere opvolging en moeten worden uitgebreid naar andere IVDs. Dit werk zal worden gerealiseerd door het QUAMED netwerk. Dit netwerk – georganiseerd door ITM – brengt operationele en academische organisaties van Noord en Zuid samen met als objectief bij te dragen aan een universele toegang tot kwaliteitsvolle medicatie en diagnostica.

De resultaten van de studies uitgevoerd voor deze thesis als ook andere publicaties gerelateerd aan het gebruik van RDTs op het terrein zijn samengebracht in twee samenvattende tabellen. Ze werden gecompileerd en gepubliceerd als onderdeel van het didactisch verslag geadresseerd aan de deelnemers van de externe kwaliteitscontrole beschreven in Hoofdstuk V [21]. Tabel 1 bevat de additionele waarde van het gebruik van malaria RDTs in de diagnose van malaria in een non-endemische setting, met zijn sterktes, zwaktes en bijzonderheden van de verschillende antigenen en *Plasmodia*. Tabel 2 bevat de “Do’s” en de “Don’ts” die moeten worden in acht gehouden bij het dagelijks gebruik van malaria RDTs in het labo.

We kunnen besluiten dat malaria RDTs zeker een voordeel bieden wat betreft malaria diagnose. Een gezonde kennis van zijn karakteristieken en beperkingen door de gebruiker zal ook de diagnostische waarde van de RDTs doen toenemen.

## Hoofdstuk VII: Samenvatting, algemene discussie, toekomstperspectieven

**Tabel 1. Wat dragen malaria RDTs bij tot de diagnose in een non-endemische setting?**

Vereisten malaria diagnose	Bijdrage van MRDTs	Opmerkingen
	Aanzienlijke bijdrage bij malaria diagnose	Uitstekende gevoeligheid, zeker voor <i>P. falciparum</i> > 100 parasieten/ $\mu$ l  Vals negatieve resultaten voor <i>P. falciparum</i> bij lage parasitaire densiteit (<100/ $\mu$ l), af en toe ook hoger
Tijdige bevestiging of uitsluiting van malaria diagnose met een dadelijke verwijzing in geval van enige twijfel	Sluiten malaria niet uit, microscopie nog steeds noodzakelijk	Sommige HRP-2 mutaties worden niet opgepikt.  Prozone effect is zeer zeldzaam, maar het gebeurt in malaria RDTs gebaseerd op HRP-2  Matige bijdrage voor diagnose van <i>P. vivax</i> , slechts kleine bijdrage voor diagnose van <i>P. ovale</i> en <i>P. malariae</i>
Onderscheid <i>P. falciparum</i> (mogelijks levensbedreigend) en non- <i>falciparum</i> species	Aanzienlijke bijdrage bij het identificeren van <i>P. falciparum</i>	Menginfecties zijn zeldzaam maar kunnen niet worden uitgesloten als <i>P. falciparum</i> - en Pan-species antigen lijntjes zichtbaar zijn
Bepalen van parasitaire densiteit, in het bijzonder herkennen van kritische waarde (>2% rode bloedcellen geïnfecteerd)	Geen	Intensiteit van de testlijntjes zijn een aanwijzing voor parasitaire densiteit maar veel overlapping  Een enkele HRP-2 lijn kan wijzen op infectie met lage parasitemie
Herkennen van <i>P. falciparum</i> stadia en pigment	Geen	

## Hoofdstuk VII: Samenvatting, algemene discussie, toekomstperspectieven

**Tabel 2a DO's en DON'Ts bij het gebruik van malaria RDTs (endemische en non-endemische setting).**

DO	Opmerkingen
Controleer de controlelijn – wanneer niet zichtbaar, herhaal de test.	Afwezigheid van de controlelijn wijst op een invalide test, resultaat kan niet worden geïnterpreteerd.
Herhaal een negatieve RDT in geval van hoog vermoeden van malaria.	Herhaal elke 8-12 uur voor 4 opeenvolgende keren gedurende 36 uur om malaria uit te sluiten.
Beschouw elke lijn, hoe zwak ook, als een positief resultaat.	Elke zichtbare lijn is een positieve lijn.
	Te weinig bloed geeft kans op een vals-negatief resultaat.
Respecteer het bloed- en buffervolume	Te veel bloed geeft meer achtergrond, moeilijker te interpreteren. Te veel bloed verhoogt de kans op prozone-effect.
DON'T	Opmerkingen
Bewaar geen RDTs in de vriezer.	Te lage temperaturen beschadigen het colloïdale goud.
Lees geen RDTs af voor of na het verlopen van de aanbevolen tijd.	Te vroeg aflezen, verhoogt kans op vals-negatieve resultaten. Te laat verhoogt kans op vals-positieve resultaten.
Gebruik geen RDTs voor het opvolgen van de behandeling.	RDTs gebaseerd op HRP-2 ( <i>P. falciparum</i> ) kunnen tot enkele weken na de behandeling positief blijven. Gametocyten brengen pLDH en aldolase to expressie.

**Tabel 2b DO's en DON'Ts bij het gebruik van malaria RDTs (addendum voor non-endemische setting).**

DO	Opmerkingen
Combineer een RDT ALTIJD met microscopie!	
Gebruik een transfer-pipet.	De collectoren en pipetjes voorzien bij de RDTs zijn klein en moeilijk te hanteren.
Bij twijfel en bij een positief staal: zend naar referentie labo voor bevestiging.	Voor België: Aanvraagformulieren en instructies: <a href="https://www.iph.fgov.be/epidemie/epinl/plabnl/N_Plasmodium.pdf">https://www.iph.fgov.be/epidemie/epinl/plabnl/N_Plasmodium.pdf</a> <a href="https://www.iph.fgov.be/epidemie/epifr/plabfr/F_Plasmodium.pdf">https://www.iph.fgov.be/epidemie/epifr/plabfr/F_Plasmodium.pdf</a>

### References

1. Batwala V, Magnussen P, Nuwaha F: **Are rapid diagnostic tests more accurate in diagnosis of plasmodium falciparum malaria compared to microscopy at rural health centres?** *Malar J* 2010, **9**: 349.
2. World Health Organization: **Guidelines for the treatment of malaria, second edition**, 2010. [[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf)].
3. World Health Organization: **World malaria report 2010**. 2010. [[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf)].
4. European Commission: **European standards in vitro diagnostic medical devices**. 1998. [[http://ec.europa.eu/enterprise/policies/european-standards/documents/harmonised-standards-legislation/list-references/iv-diagnostic-medical-devices/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/policies/european-standards/documents/harmonised-standards-legislation/list-references/iv-diagnostic-medical-devices/index_en.htm)].
5. World Health Organization: **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance; Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 1 (2008)**. 2009. [[http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports\\_brochures/malaria-diagnostics-report-2009.html](http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports_brochures/malaria-diagnostics-report-2009.html)].
6. World Health Organization: **Overview of the prequalification of diagnostics assessment process**. 2010. [[http://www.who.int/entity/diagnostics\\_laboratory/evaluations/pqdx\\_007\\_pq\\_overview\\_document\\_v3.pdf](http://www.who.int/entity/diagnostics_laboratory/evaluations/pqdx_007_pq_overview_document_v3.pdf)].
7. World Health Organization: **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance; Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 2 (2009)**. 2010. [[http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports\\_brochures/malaria-diagnostic-test-report-round2.html](http://www.finddiagnostics.org/resource-centre/reports_brochures/malaria-diagnostic-test-report-round2.html)].
8. Maltha J, Gillet P, Cnops L, Bottieau E, Van Esbroeck M, Bruggeman C, Jacobs J: **Evaluation of the rapid diagnostic test SDFK40 (Pf-pLDH/pan-pLDH) for the diagnosis of malaria in a non-endemic setting**. *Malaria Journal* 2011, **10**: 7.
9. Moody AH, Chiodini PL: **Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection**. *Br J Biomed Sci* 2002, **59**: 228-231.
10. Maltha J, Gillet P, Cnops L, Van Den Ende J, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Malaria rapid diagnostic tests: Plasmodium falciparum infections with high parasite densities may generate false positive Plasmodium vivax pLDH lines**. *Malar J* 2010, **9**: 198.
11. Hermans V, Monzote L, Van den Sande B, Mukadi P, Sopheak T, Jacobs J. **Assessment of the comprehension of diagnostic and hazard symbols among health care workers in four international settings**. Submitted.
12. Parekh BS, Anyanwu J, Patel H, Downer M, Kalou M, Gichimu C, Keipkerich BS, Clement N, Omondi M, Mayer O, Ou CY, Nkengasong JN: **Dried tube specimens: a simple and cost-effective method for preparation of HIV proficiency testing panels and quality control materials for use in resource-limited settings**. *J Virol Methods* 2010, **163**: 295-300.
13. Gillet P, Bosselaers K, Cnops L, Bottieau E, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Evaluation of the SD FK70 malaria Ag Plasmodium vivax rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Malar J* 2009, **8**: 129.
14. Gillet P, van Dijk DP, Bottieau E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Test characteristics of the SD FK80 Plasmodium falciparum/Plasmodium vivax malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Malar J* 2009, **8**: 262.
15. Van der Palen M, Gillet P, Bottieau E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Test characteristics of two rapid antigen detection tests (SD FK50 and SD FK60) for the diagnosis of malaria in returned travellers**. *Malar J* 2009, **8**: 90.
16. van Dijk DP, Gillet P, Vlieghe E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Evaluation of the Palutop+4 malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Malar J* 2009, **8**: 293.
17. van Dijk DP, Gillet P, Vlieghe E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacobs J: **Evaluation of the Immunoquick+4 malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, **29**: 577-583.
18. Kaimbo K, Maertens K, Missotten L: **Study of presbyopia in Zaire**. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 1987, **225 Pt 2**: 149-156.
19. Patel VL, Branch T, Arocha JF: **Errors in interpreting quantities as procedures: the case of pharmaceutical labels**. *Int J Med Inform* 2002, **65**: 193-211.
20. Rennie W, Phetsouvanh R, Lupisan S, Vanisaveth V, Hongvanthong B, Phompida S, Alday P, Fulache M, Lumagui R, Jorgensen P, Bell D, Harvey S: **Minimising human error in malaria**

- rapid diagnosis: clarity of written instructions and health worker performance.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, **101**: 9-18.
21. Gillet P, Mukadi P, Vernelen K, Van Esbroeck M, Muyembe JJ, Bruggeman C, Jacobs J: **Comments to the results of the EQA session 2009/3 on malaria rapid diagnostic tests.** 2011. [[http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external\\_quality/rapports/\\_down/microbiologie/2010/10-3N-Commentaar-malaria-sneltesten.pdf](http://www.wiv-isp.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/_down/microbiologie/2010/10-3N-Commentaar-malaria-sneltesten.pdf)].