

## Richtlijnen voor de diagnostiek van malaria voor laboratoria in de gezondheidszorg in Nederland\*

Malaria tropica, veroorzaakt door *Plasmodium falciparum*, is voor niet-immune personen een levensbedreigende infectie. Ook bij koortsaanvallen veroorzaakt door infecties met andere soorten malariaparasieten kan de arts met een ernstig zieke patiënt worden geconfronteerd. Door het voortdurend toenemende reizigersverkeer naar en van de endemische gebieden dient elke arts in Nederland met een mogelijke malaria-infectie rekening te houden. Daarnaast wordt in een groot aantal landen een toename van resistentie van de malariaparasieten voor de gebruikte profylactica en therapeutica geconstateerd. Technische ontwikkelingen bieden nieuwe mogelijkheden op het gebied van de diagnostiek, maar zijn tevens de oorzaak van een toenemende onduidelijkheid bij de inzetbaarheid en betrouwbaarheid van diagnostische testen voor malaria. In de diagnostiek van acute malaria is voor serologisch onderzoek geen plaats, maar wat daarvoor dan wel van belang is dient voor iedereen duidelijk te zijn. De Nederlandse Vereniging voor Parasitologie (NVP) heeft zich vanouds hiervoor ingezet en stimuleert door verschillende activiteiten, waaronder het organiseren van landelijke kwaliteitsborging en nascholing, het verhogen van de kwaliteit van de parasitologische laboratoriumdiagnostiek. Deze richtlijnen geven aanwijzingen hoe, naar de mening van deskundigen, de laboratoriumdiagnostiek van malaria zou moeten zijn ingericht.

### Vereiste kennis en vaardigheden

Voor de laboratoriumdiagnostiek van malaria dienen het vakinhoudelijke laboratoriumhoofd en de bij de beoordeling betrokken uitvoerende analisten adequate theoretische kennis en praktische vaardigheden te bezitten. Deze dienen op het niveau van de stof van de postacademische cursussen parasitologische diagnostiek van de Stichting Parasitologische Laboratorium Diagnostiek (SPLD) te zijn. De SPLD organiseert de cursussen onder auspiciën van de NVP. Achtergrondkennis dient aanwezig te zijn met betrekking tot de geografische verspreiding, de klinische verschijnselen, profylaxe, resistentieproblematiek en

de therapeutica. Veranderingen van inzicht en ontwikkelingen op het gebied van resistentie, chemotherapie en diagnostiek benadrukken dat zowel het niveau van de kennis als de praktische vaardigheden onderhouden dienen te worden.

### Standard Operating Procedure (SOP)

De procedures ten behoeve van de malariadiagnostiek, zoals die voor een correcte afname van het diagnostisch materiaal, de kleuring van de preparaten, de beoordeling, interpretatie en de rapportage daarvan, dienen te zijn vastgelegd in een op het laboratorium aanwezige Standard Operating Procedure en daaraan jaarlijks te worden getoetst. De in de SOP aangegeven kennis en vaardigheden dienen te worden onderhouden. Zie daarvoor de paragraaf over "Kwaliteitsborging inclusief nascholing".

Een SOP zal aanwijzingen dienen te bevatten over de volgende aspecten van de procedure:

- Volledigheid van de aanvraag. Een aanvraag voor onderzoek op malaria moet zijn voorzien van de volgende informatie over de patiënt:
  - a. de klachten en klinische verschijnselen
  - b. het land en de regio van het verblijf in de endemische gebieden voor malaria in de (sub-)tropen
  - c. de periode van het verblijf aldaar
  - d. een volledig overzicht van de gebruikte geneesmiddelen en de gevolgde profylaxe
  - e. eventueel ander (onderliggend) lijdenBij onvolledigheid van gegevens worden deze direct aangevuld om de laboratoriumdiagnostiek te kunnen vereenvoudigen en eventueel beter gericht uit te kunnen voeren.

- Afname van bloed voor onderzoek op malaria en het maken van de bloedpreparaten wordt uitgevoerd door personeel dat op de hoogte is van het doel en van de uitvoering van het onderzoek op malaria. Er dient niet te worden gewacht op een koortspiek bij de patiënt.

Bij voorkeur wordt capillair bloed afgenomen met een "vingerprik". Hiervan worden tenminste twee dikke druppels (dikte ongeveer 10 witte bloedcellen per microscopisch gezichtsveld bij gebruik van een 100x objectief) en twee uitstrijkpreparaten lege artis gemaakt.

Een andere mogelijkheid biedt het gebruik van EDTA-, heparine- of citraatbloed verkregen door venapunctie. Mits onmiddellijk verwerkt geeft dit materiaal bevredigende resultaten. Er dienen dus direct dikke-druppel- en uitstrijkpreparaten te worden gemaakt. Bloedpreparaten worden *lege artis* volgens Giemsa gekleurd.

\* Deze richtlijnen zijn opgesteld door de Nederlandse Vereniging voor Parasitologie in nauw overleg met de Vereniging voor Hematologische Laboratoriumdiagnostiek (mede namens de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en de Nederlandse Vereniging voor Hematologie) en de Vereniging voor Artsen Laboratoriumdiagnostiek. De commissie kwaliteitsbevordering van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie heeft deze richtlijnen positief beoordeeld.

- Opsporing van malariaparasieten vindt plaats in de volgens Giemsa gekleurde dikke-druppelpreparaten. Deze preparaten geven de grootste trefkans op het vinden van de parasieten. Wanneer geen parasieten worden aangetroffen in tenminste 200 microscopische velden (100x objectief), wordt bij een voortdurende verdenking op malaria het onderzoek na 8-12 uur herhaald. In de gevallen waarbij geen parasieten worden aangetroffen wordt telkens als uitslag "geen parasieten gezien" of "geen parasieten gevonden" afgegeven. Indien geen andere diagnose dan malaria wordt gesteld en/of malaria nog steeds niet kan worden uitgesloten wordt het onderzoek nog éénmaal per dag gedurende de twee volgende etmalen herhaald. Wanneer het onderzoek in totaal gedurende drie etmalen is uitgevoerd zonder dat parasieten zijn gezien, wordt de diagnose malaria zeer onwaarschijnlijk geacht.

Bij een *P. falciparum* infectie wordt het effect van de therapie gecontroleerd tot het moment waarop in de preparaten geen asexuele vormen van de parasiet meer worden aangetroffen. In verband met een mogelijke resistentie van de parasiet voor de gebruikte therapeutica verdient het aanbeveling het definitieve effect daarvan te controleren na 2, 3 en 4 weken.

- Determinatie op soort van de Plasmodiën vindt plaats aan de hand van de morfologie van de ontwikkelingsstadia van de parasieten en van de erythrocyten in de methanolgefixeerde en volgens Giemsa gekleurde uitstrijkpreparaten. Hierbij worden de preparaten met een 100x objectief bekeken.
- Bepaling van de parasitemie. Bij een infectie met *P. falciparum* wordt naast de determinatie van de soort ook de hoeveelheid parasieten in het bloed bepaald. In aanwezigheid van grote aantallen parasieten in het dikke-druppelpreparaat wordt de parasitemie direct in het uitstrijkpreparaat bepaald als een percentage van de erythrocyten dat geïnfecteerd is. Men doet dit aan de hand van 5000 erythrocyten. Bij lage dichtheden (<0,1%) wordt in het dikke-druppelpreparaat het aantal parasieten geteld per 200 witte bloedcellen (en eventueel omgerekend naar het aantal per µl of het percentage geïnfecteerde rode bloedcellen). Wanneer <10 parasieten worden waargenomen zet men de telling door tot 500 witte bloedcellen zijn gezien. Bij de rapportage wordt de uitslag bij lage parasitemiën gegeven in de vorm van < 0,1 % of kan het nuttig zijn het aantal uit te drukken per 100 witte bloedcellen. Bijzonderheden, zoals het voorkomen van ontwikkelde of rijpe trofozoieten, schizonten en gametocyten, worden vermeld bij de uitslag. Wanneer geen parasieten worden aangetroffen en de verdenking op malaria blijft bestaan, wordt na 8-12 uur de procedure herhaald (zie onder Opsporing).

#### Aanvullende detectiemethoden

Vooralsnog wordt de basis van de diagnostiek gevormd door het vinden en determineren van de para-

sieten in de dikke-druppel- en uitstrijkpreparaten. Alternatieve methoden zijn bijvoorbeeld antigeentest-systemen of methoden waarbij een kerneiwitkleuring wordt uitgevoerd, bijvoorbeeld met acridine-oranje. Bij de laatste methode fluoresceren kernen onder UV-licht. Hiervan wordt gebruik gemaakt in de "Quantitative Buffy-Coat" (QBC)-test. Deze gestandaardiseerde test kan zeer effectief malaria parasieten aantonen. De determinatie van de soort is met de QBC-test echter niet of slechts in zeer beperkte mate mogelijk. Wanneer met deze techniek 2 banen (van onderkant buffy-coat tot einde tube met een vergroting van 600x, zoektijd circa 5 min.) zijn onderzocht en geen parasieten zijn gevonden, is een malaria-infectie vrijwel uit te sluiten. Op deze wijze toegepast heeft de QBC een sensitiviteit van ongeveer 1 parasiet/µl bloed.

Antigeentestsystemen tonen eiwitten aan van *P. falciparum* of één van de andere soorten malariaparasieten in bloed. De specificiteit en sensitiviteit van antigeentesten voor de verschillende soorten malaria-parasieten zijn hoog, maar vals positieve en vals negatieve uitslagen komen voor. Ook kunnen de testen na een adequaat behandelde malaria gedurende lange tijd positief blijven. Deze methoden zijn voortdurend aan evaluatie onderhevig. Antigeentesten dienen vooralsnog niet als enige test voor de malariadiagnostiek gebruikt te worden. Maar deze testen kunnen wel naast de Giemsa preparaten in bepaalde situaties een nuttige aanvulling vormen op de gebruikelijke technieken:

- Als de determinatie van de soort niet goed mogelijk is, bijvoorbeeld bij een lage parasitemie of bij het vermoeden van een menginfectie.
- Als na presumptieve (auto-)medicatie de diagnose achteraf gesteld moet worden.

Bij het gebruik van dergelijke antigeentestsystemen dient een positieve uitslag gezien te worden als een aanwijzing voor een malaria infectie, de definitieve diagnose berust op het microscopisch aantonen van de betreffende malariaparasiet.

#### Dienstverlening

- De diagnostische dienstverlening is 24 uur per etmaal beschikbaar. Daarbij is inbegrepen het maken en beoordelen van dikke-druppel- en uitstrijkpreparaten door uitvoerend personeel met adequate kennis en vaardigheden. Het diagnostisch onderzoek wordt cito uitgevoerd, de uitslag moet binnen enkele uren bekend zijn. Over de uitslag van het onderzoek wordt de aanvrager onmiddellijk geïnformeerd.
- Het laboratoriumhoofd, c.q. een "achterwacht", met ruime kennis van malaria en ervaring in de malariadiagnostiek moet te raadplegen zijn voor overleg met de aanvragende arts, ook tijdens nachtelijke uren.
- Als geen parasieten gevonden zijn of de determinatie van de soort niet goed mogelijk is, behoort in overleg met de aanvragende arts het laboratoriumonderzoek herhaald te worden met vers afgenomen materiaal na 8-12 uur.

- Wanneer geen 24-uurs service geboden kan worden, moet een deskundig laboratorium zijn geïdentificeerd, waarnaar preparaten (minimaal een set ongekleurd) met spoed kunnen worden opgestuurd en beoordeeld; eventueel kunnen patiënten zelf daarheen worden verwezen. De met dit laboratorium gemaakte afspraken ten aanzien van de diagnostiek en de rapportage worden vastgelegd in de SOP.
- Malaria is in het kader van de "Infectieziektenwet" een aangifteplichtige ziekte. Bij het vaststellen van de aanwezigheid van malariaparasieten in het bloed van een patiënt dient het hoofd van het laboratorium dit te melden aan de lokale GGD.

#### **Kwaliteitsborging inclusief nascholing**

- Er dient actief deelgenomen te worden aan externe kwaliteitsborging van bijvoorbeeld de NVP/SPLD.
- Een systeem van interne kwaliteitszorg dient operationeel te zijn. Een aangelegde referentiecollectie behoort aanwezig en toegankelijk te zijn en, ook buiten de klinische urgentie om, regelmatig geraadpleegd te worden (actieve interne kwaliteitszorg).
- Bij- en nascholing van het betrokken laboratoriumpersoneel dient plaats te vinden, bijvoorbeeld door gebruik te maken van daartoe geboden gelegenheden van de NVP/SPLD. De praktische uitwerking hiervan dient voor iedere medewerker te worden vastgelegd in een beschrijving van de kwalificaties voor het personeel.
- Literatuur betreffende laboratoriumdiagnostiek dient aanwezig zijn op het laboratorium, bijvoorbeeld:

Polderman AM & AC Rijpstra (red.), Medische Parasitologie, 2e druk: Bohn, Scheltema & Holkema; Utrecht/Antwerpen; 1993, en gekleurd plaatwerk, bijvoorbeeld: WHO Bench Charts voor Malaria. WHO, Genève, Zwitserland, ISBN 92 4 154232 2, apart verkrijgbaar of in Basic Malaria Microscopy 1, Learners's Guide. WHO, Genève, Zwitserland, 1991, ISBN 92 4 154430 9. Daarnaast dient men ook de beschikking te hebben over een recent handboek over Tropengeneeskunde.

#### **Referentiecentra**

De NVP/SPLD heeft de volgende algemene referentielaboratoria aangewezen, waar speciale diagnostische expertise aanwezig is:

- Amsterdam: Academisch Medisch Centrum, Afdeling Klinische Microbiologie. Contactpersoon: Dr T. van Gool. Tel. 020-5665719/020-5665728, sein 65728
- Bilthoven: RIVM-LIS. Contactpersoon: Drs L.M. Kortbeek. Tel. 030-2749111, sein 040 of 030-2742372
- Leiden: Leids Universitair Medisch Centrum, Laboratorium voor Parasitologie. Contactpersoon: Dr A.M. Polderman. Tel. 071-5276845/5276846
- Rotterdam: Erasmus Medisch Centrum Rotterdam, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten. Contactpersoon: Dr J.F. Sluiter. Tel. 010-4633874/4635270 of 010-4639222, zoemer 3874
- Nijmegen: Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Afd. Medische Microbiologie. Contactpersonen: Dr P.J.A. Beckers, Dr R.W. Sauerwein. Tel. 024-3614449/3614356, sein 1005 of 1911.

Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 46-51

## **Amoebiasis: de consequenties van een taxonomische vergissing**

A.M. POLDERMAN en J.J. VERWEIJ

Amoebiasis wordt veroorzaakt door *Entamoeba histolytica*, maar niet alle "karakteristieke" 10-15 µm grote cysten met vier kernen die in ontlasting worden aangetroffen behoren toe aan deze soort. Recent onderzoek leert dat in de gematigde klimaatgebieden ca 90% van deze cysten worden uitgescheiden door de niet invasieve en dus apathogene *Entamoeba dispar*. Met behulp van immunologisch, iso-enzym- en moleculair onderzoek is het thans mogelijk onderscheid te maken tussen infecties met beide eencelligen. Het differentiëren op basis van verschillen in copro-anti-

genen met behulp van monoclonale antistoffen is voornamelijk weinig bevredigend, hoewel een kit voor dit doel ook in Nederland commercieel verkrijgbaar is. Onderscheid op basis van verschillen in iso-enzym patronen is mogelijk, maar alleen na kweek van de parasiet. Deze procedure is omslachtig, langdurig en levert vaak geen bruikbaar resultaat.

Differentiatie met behulp van een PCR op ongefieerde feces blijkt een betrouwbaar hulpmiddel. Een juiste karakterisering van de gevonden cystensoort kan veel overbodige, therapie met contactamoebiciden voorkomen.

Laboratorium voor Parasitologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Trefwoorden: Amoebiasis; *Entamoeba histolytica*; *Entamoeba dispar*; PCR; copro-antigenen

Correspondentie: Dr A.M. Polderman, Laboratorium voor Parasitologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Postbus 9605, 2300 RC Leiden.

#### **Zoals het was**

In alle overzichten van de WHO en in de leerboeken