

## **RICHTLIJN VOOR DE DIAGNOSTIEK VAN MALARIA VOOR LABORATORIA IN DE GEZONDHEIDSZORG IN NEDERLAND**

*Deze richtlijn is opgesteld door de sectie Parasitologie van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoria in overleg met de Nederlandse Vereniging voor Parasitologie, de Vereniging voor Hematologisch Laboratoriumonderzoek (namens de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en de Nederlandse Vereniging voor Hematologie) en de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie. Versie: 9 november 2009*

### **TEN GELEIDE**

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. Vanwege het reizigersverkeer naar en van de endemische gebieden dient elke arts in Nederland met een mogelijke malaria infectie rekening te houden. Daarnaast bestaat in een groot aantal landen een toename van resistentie van de malaria parasieten voor de gebruikte geneesmiddelen. 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 de landelijke kwaliteitsborging en nascholing. Deze richtlijn geeft aanwijzingen hoe de laboratoriumdiagnostiek van malaria moet worden 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 onder auspiciën van de NVP te zijn. 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, chemotherapeutica en diagnostiek maken het noodzakelijk 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, inclusief die voor een correcte afname van het diagnostisch materiaal, het transport, 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) lijden.

Bij onvolledigheid van gegevens worden deze aangevuld om de interpretatie van de laboratoriumdiagnostiek te kunnen vereenvoudigen.

- **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" of een stolbuis verkregen door venapunctie. Hiervan worden meteen ter plekke tenminste twee dikke druppels (dikte ongeveer 10 witte bloedcellen per microscopisch gezichtsveld bij gebruik van een 100x objectief) en twee uitstrijkpreparaten *lege artis* gemaakt. Voorschriften zijn te vinden op de website van de NVP <http://www.parasitologie.nl>

Een andere mogelijkheid biedt het gebruik van EDTA-bloed verkregen door venapunctie. Transport naar het laboratorium dient op kamertemperatuur (niet gekoeld) te gebeuren. Mits onmiddellijk verwerkt, geeft dit materiaal bevredigende resultaten. Er dienen binnen een uur na afname dikke druppel en uitstrijkpreparaten te worden gemaakt. Heparine- en citraatbloed zijn niet geschikt voor het maken van bloedpreparaten.

- **Opsporing** van malariaparasieten vindt plaats in de volgens Giemsa gekleurde dikke druppel preparaten. 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 bij voorkeur 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. Voor de afgifte van een definitieve uitslag verdient het de voorkeur een tweede persoon de preparaten te laten beoordelen. Indien geen andere diagnose

dan malaria wordt gesteld en/of malaria nog steeds niet kan worden uitgesloten wordt één maal per dag gedurende de twee volgende etmalen bloed onderzocht. 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 moet het onderzoek herhaald worden als binnen enkele weken de koorts recidiveert.

- **Determinatie** op soort van de *Plasmodium* kan plaats vinden aan de hand van de morfologie van de ontwikkelingsstadia van de parasieten en van de geïnfecteerde erythrocyten in de methanol-gefixeerde en volgens Giemsa gekleurde uitstrijkpreparaten. Hierbij worden de preparaten met een 100x objectief bekeken. Onderscheid tussen *P. falciparum* en de overige *Plasmodium* soorten is van belang voor de behandeling.

- **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 druppel preparaat wordt de parasitemie direct in het uitstrijkpreparaat bepaald als een percentage van de erythrocyten dat geïnfecteerd is. Men doet dit aan de hand van 10.000 erythrocyten. Bij lage dichtheden (<0,1 %) wordt in het dikke druppel preparaat 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 oudere of rijpe trofozoieten, schizonten, gametocyten of malariapigment in witte bloedcellen, worden vermeld bij de uitslag. Gametocyten en schizonten worden niet meegeteld bij de bepaling van de parasitemie.

## AANVULLENDE DETECTIEMETHODEN

Vooralsnog wordt de basis van de diagnostiek gevormd door het vinden en determineren van de parasieten in de dikke druppel en uitstrijkpreparaten. Alternatieve methoden zijn bijvoorbeeld antigeentestsystemen 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.

Antigeentestsystemen tonen eiwitten aan van *P. falciparum* of één van de andere soorten malariaparasieten in bloed. De specificiteit en sensitiviteit van antigeentesten zijn hoog, vooral voor *P. falciparum* en *P. vivax*, maar vals positieve en vals negatieve uitslagen komen voor. Ook kunnen sommige testen na een adequaat behandelde malaria gedurende lange tijd positief blijven. Deze methoden zijn voortdurend aan evaluatie onderhevig. De gevoeligheid van optimale microscopie is hoger dan die van de huidige antigeentesten. Antigeentesten dienen vooralsnog niet als enige test voor de malariadiagnostiek gebruikt te worden. 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 het vermoeden van een menginfectie met *P.falciparum*.

\* als na presumptieve (auto-) medicatie de diagnose achteraf gesteld moet worden.

\* als buiten reguliere werktijden de citodiagnostiek verricht moet worden terwijl de microscopisch geschoolde analisten niet in huis zijn; tegelijk met de antigeentest worden ook preparaten gemaakt en gekleurd en de volgende ochtend beoordeeld. Bij positief resultaat van de sneltest wordt alsnog direct microscopisch gedetermineerd en eventueel gekwantificeerd. Bij negatief resultaat en ernstige verdenking zal ook meteen microscopie verricht moeten worden. Men dient zich te realiseren dat niet alle testen even gevoelig zijn voor de verschillende *Plasmodium* species.

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. Up to date informatie over het gebruik van antigeentesten is te vinden op de site van de WHO <http://www.who.int/malaria/rdt.html>.

Moleculaire diagnostiek (PCR) kan in referentielaboratoria worden ingezet voor de soortdeterminatie achteraf, bijvoorbeeld in geval van lage parasitemie of verdenking op menginfecties.

## **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 laboratorium onderzoek 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 malaria parasieten in het bloed van een patiënt dient zowel het hoofd van het laboratorium als de behandelend arts dit te melden aan de lokale GGD.

## **KWALITEITSBORGING INCLUSIEF NASCHOLING**

- Er dient actief deelgenomen te worden aan externe kwaliteitsborging van bijvoorbeeld de SKML.
- 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. De praktische uitwerking hiervan dient voor iedere medewerker te worden vastgelegd in een beschrijving van de kwalificaties voor het personeel.
- Literatuur betreffende laboratorium-diagnostiek dient aanwezig zijn op het laboratorium, bijvoorbeeld:
  - \* Polderman AM (red.), Medische Parasitologie, vierde druk, Syntax Media Arnhem, 2005 en gekleurd plaatwerk, bijvoorbeeld:
  - \* WHO Bench Charts voor Malaria. WHO, Genève, Zwitserland, ISBN 978 924 1545240, apart verkrijgbaar of in
  - \* Basic Malaria Microscopy I, Learners's Guide. WHO, Genève, Zwitserland, 1999, ISBN 978 924 1544306.

## **REFERENTIE CENTRA**

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

Amsterdam	Academisch Medisch Centrum, Afd. Klinische Microbiologie Contactpersoon: Dr T. van Gool Tel. 020-5665719/020-5665728
Haarlem	Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Kennemerland, Afd Parasitologie Contactpersoon: Dr T.G. Mank Tel. 023-5307800
Leiden	Leids Universitair Medisch Centrum, Lab. voor Parasitologie; Contactpersoon: Dr L. van Lieshout Tel. 071-5265071
Rotterdam	Erasmus Medisch Centrum en Havenziekenhuis, Afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten; Contactpersoon: Dr J. van Hellemond 06 22279138
Nijmegen	Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Afd. Medische Microbiologie; Contactpersonen: Dr P.J.A. Beckers, Prof.Dr R.W. Sauerwein Tel. 024-3614663/3614356