

STANDARD OPERATING PROCEDURE

voor het maken van grotere hoeveelheden malariapreparaten.

(opgesteld in opdracht van HYDAS WORLD HEALTH (www.HydasWorldHealth.org) en met toestemming aangepast voor SKML rondzending Nederland)

1. VOORWOORD:

Voor het stellen van een betrouwbare diagnose is het van essentieel belang dat de bloedpreparaten voor onderzoek op malaria op de juiste wijze worden gemaakt.

Wanneer de preparaten worden gebruikt voor kwaliteitscontrole of voor onderwijsdoeleinden is het noodzakelijk dat alle bloedpreparaten van dezelfde patiënt onderling vergelijkbaar zijn.

Deze Standard Operating Procedure (SOP) geeft een methode om het maken van grotere hoeveelheden malariapreparaten (dikke druppel- en uitstrijkpreparaten) te standaardiseren.

2. METHODE EN TECHNIEK

Venapunctie: voor het maken van grotere hoeveelheden malariapreparaten is EDTA bloed het meest geschikt. (EDTA = Di-potassium ethylene-diamine-tetra-acetic acid (anticoagulant)).

3. VOORBEREIDING VAN DE PATIËNT:

1. Vraag de patiënt toestemming voor het afnemen van bloed voor het maken van de bloedpreparaten voor onderwijsdoeleinden.
2. Leg uit hoe de venapunctie wordt uitgevoerd.

4. AFNEMEN VAN BLOED

4.1. Benodigdheden:

Zowel de persoon die het bloed afneemt als degene die de preparaten maakt dient plastic handschoenen te dragen!

1. 70% alcohol pads
2. Verbandgaasjes (afm. 5 x 5 cm).
(Wattenbolletjes zijn minder geschikt omdat deze artefacten op de preparaten kunnen veroorzaken).
3. Vacutainer® of injectiespuit met naald (maat 21 of 23) en EDTA-buisjes (bv: BD Vacutainer® K3EDTA met paarse dop, minimaal voor 2,5 ml bloedafname)
4. Afvalbakje
5. Safetybox
6. Nieuwe schone microscoopglasjes (bij voorkeur schoon gemaakte glasjes: zie bijlage 1)
7. Plateau voor microscopische preparaten
8. Potlood

4.2. Afname van bloed door middel van venapunctie:

Werkwijze:

1. Volg de standaardprocedure voor het afnemen van veneus bloed.
2. Noteer de patiëntgegevens op het EDTA-buisje
3. Maak de plek waar de vena wordt aangeprikt schoon met een alcohol pad en laat de alcohol verdampen
4. Neem ten minste 2,5 ml bloed af in de EDTA buis
meng goed door de buis een aantal keren 180 ° te draaien
5. Vul een een cryotube met minimaal 0,5 ml EDTA bloed voor PCR (zie punt 6).

5. HET MAKEN VAN EDTA-BLOEDPREPARATEN:

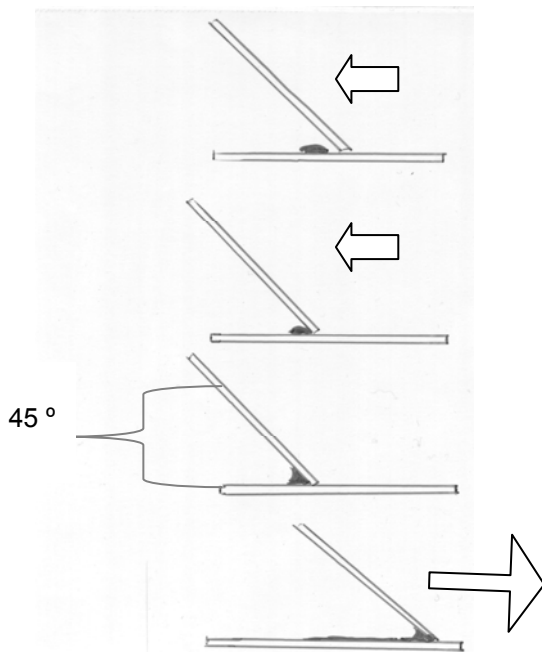
5.1. Opmerkingen:

1. **Bloedpreparaten moeten binnen één uur na afname worden gemaakt *).**
2. **Het bloed bewaren bij kamertemperatuur (niet in de koelkast)**
3. **Voor toepassing in de kwaliteitscontrole SKML dienen minimaal 120 preparaten te worden gemaakt.**
4. **Gebruik, voor het maken van gestandaardiseerde EDTA-bloedpreparaten , het sjabloon op bijlage 2a (of 2b)**

5.2. Werkwijze:

1. Voor onderwijs- en/of kwaliteitsborgings-doeleinden worden de dikke druppel- en het uitstrijkje bij voorkeur op één glaasje gemaakt, maar ook aparte glaasjes voor dikke druppel en uitstrijk zijn geschikt.
2. Houd de glaasjes uitsluitend vast aan de rand of aan het beschrijfbare gedeelte
3. Leg de microscoopglaasjes op het sjabloon (zie bijlage 2) met het beschrijfbare gedeelte naar je toe (zodat je tijdens het schrijven het niet beschrijfbare gedeelte niet hoeft aan te raken).
4. Noteer met **potlood** een kruisje (ter herkenning van de bovenkant) op het beschrijfbare gedeelte van het objectglaasje.
5. Meng het bloed goed door de buis een aantal keren 180 ° te draaien.
6. Neem met behulp van de microtiter-pipet 6 µl EDTA-bloed op uit het buisje en breng dit op het objectglaasje in het midden van aangegeven grote rondje van het sjabloon.
7. Neem vervolgens 3 µl EDTA-bloed op en pipetteer dit op in het horizontale lijntje (zie sjabloon bijlage 2a). Wanneer je een apart glaasje gebruikt voor de uitstrijk kun je 6 µl gebruiken (zie sjabloon bijlage 2b)
6. Maak eerst **het uitstrijkpreparaat** (de uitstrijk moet zo snel mogelijk na het opbrengen van het druppeltje bloed worden gemaakt om opdrogen te voorkomen):
Strijk de druppel uit met behulp van een ander objectglaasje (zie onderstaande tekening).
 - ▶ Plaats de smalle rand van een schoon (geslepen) glaasje in een hoek van 45° vlak vóór de druppel bloed.
Houd daarbij het horizontale glaasje op z'n plaats met de wijsvinger van je andere hand.
 - ▶ Trek het glaasje vervolgens naar achteren totdat 2/3 van de rand zich heeft gevuld met bloed.
 - ▶ Schuif het vervolgens met een snelle vloeiende beweging naar voren.

*) Indien het niet mogelijk is het maken van de preparaten binnen één uur na afname te realiseren, neem dan contact op met Pieter Beckers of Theo Arens: telefoonnr: zie punt 6)



Opmerking:

Een goede uitstrijk heeft een dik gedeelte aan het begin en een dun - in een vlam uitlopend- uiteinde. Dit uiteinde mag niet te dicht bij het einde van het objectglaasje liggen. Een goede uitstrijk bevat gedeelten waarbij de rode bloedcellen - één laag dik - naast elkaar liggen.

7. Maak vervolgens **het dikke druppelpreparaat:**

Gebruik hiervoor de hoek van een ander glaasje - of een houten of plastic stokje wanneer je alleen glaasjes gebruikt met afgeslepen hoeken.

Maak - beginnend in het centrum van de druppel – maximaal 5 cirkelvormige bewegingen naar buiten tot je aan de buitenrand bent van het op de sjabloon aangegeven rondje. Maak vervolgens dezelfde bewegingen maar nu terug naar het centrum van de dikke druppel totdat het bloed gelijkmatig over het vlak is verdeeld. Til nu het uitstrijkglaasje voorzichtig op zonder luchtballen achter te laten. (Blijven er toch luchtballen over: prik deze dan door).



8. Laat de preparaten aan de lucht drogen in **horizontale positie**. Zorg ervoor dat er geen stof of insecten op of bij de glaasjes kunnen komen.

5.3 Opmerkingen bij gebruik van EDTA bloed :

Van de mogelijke anticoagulantia is EDTA het meest geschikt voor het maken van bloedpreparaten voor malariaonderzoek.

Om veranderingen in WBC en malariaparasieten te voorkomen moeten de preparaten **binnen 60 minuten na het afnemen van het bloed** worden gemaakt.

Na 4 uur is het EDTA-bloed niet langer geschikt voor het maken van malariapreparaten.

De morfologie van malariaparasieten wordt sterker beïnvloed wanneer het bloed in de koelkast wordt bewaard dan het geval is bij kamertemperatuur.

Met behulp van EDTA gemaakte bloedpreparaten moeten extra goed worden gedroogd. Het beste is de preparaten één nacht op kamertemperatuur aan de lucht te laten drogen. Je kunt het drogen bespoedigen door de glaasjes in de laminar flow kast te leggen. Gebruik voor het maken van bloedpreparaten voor onderwijsdoeleinden géén kunstmatige manieren van drogen (föhn of warmhoudplaatje).

Bloed van anemische patiënten hecht slecht aan de glaasjes. Laat deze glaasjes extra lang drogen en zorg ervoor dat de glaasjes **perfect horizontaal** liggen.

- ▶ **Niet gefixeerde en niet gekleurde bloedpreparaten zijn infectieus:** Neem de voorzorgsmaatregelen ten aanzien van microbiologische en serologische risico's in acht.
- ▶ Kleur de preparaten bij voorkeur de volgende dag (Giemsakleuring), in ieder geval binnen 3 dagen (zie SOP: Kleuren van bloedpreparaten voor malariaonderzoek).
- ▶ De uitstrijkje fixeren in 100% water vrije methanol. De uitstrijkjes moeten daarvoor volledig droog zijn. Fixeer kort! Maximaal 45 seconden en zorg dat de dikke druppel niet in contact komt met de methanol.
- ▶ Methanol is *toxisch* en *licht ontvlambaar* (temperaturen >12°C). Plaats de oplossing niet in de zon en voorkom dat deze op een andere manier wordt verhit. Vermijdt inademing en contact met de huid (R11-R23/24/25 –R39/23/24/25). (S2-7-16-24).
- ▶ Voor toepassing in de kwaliteitscontrole (SKML) dient per direct contact te worden opgenomen met Nijmegen (zie hieronder) voor overleg over kleuring en verzending.

6. PCR:

Bloedpreparaten, die gebruikt worden voor kwaliteitscontrole worden geconfirmeerd door middel van PCR. Vul minimaal 0,5 ml EDTA-bloed uit in een cryotube en stuur dit, samen met gemaakte preparaten zo snel mogelijk naar:

Dr. P.J.A. Beckers

Medische Microbiologie, Parasitologie

MMB 574 UMC Radboud

Postbus 9101 6500 HB Nijmegen

Tel: 024-3614663 of (T. Arens) 024-3614449

- ▶ **Wanneer het materiaal niet direct wordt opgestuurd kan het PCR materiaal worden bewaard bij - 20°C of - 80°C .**

7. BIJBEHORENDE INFORMATIE

SOP Kleuren van bloedpreparaten voor malariaonderzoek (binnenkort beschikbaar)

Literatuurverwijzing: (binnenkort beschikbaar)

8. BIJLAGEN:

Bijlage 1: Schoonmaken van de microscoopglasjes

Bijlage 2a: Matrix voor het maken van gestandaardiseerde bloedpreparaten op één glaasje.

Bijlage 2b: Matrix voor het maken van gestandaardiseerde bloedpreparaten op twee verschillende glaasjes.

Bijlagen:

Bijlage 1:

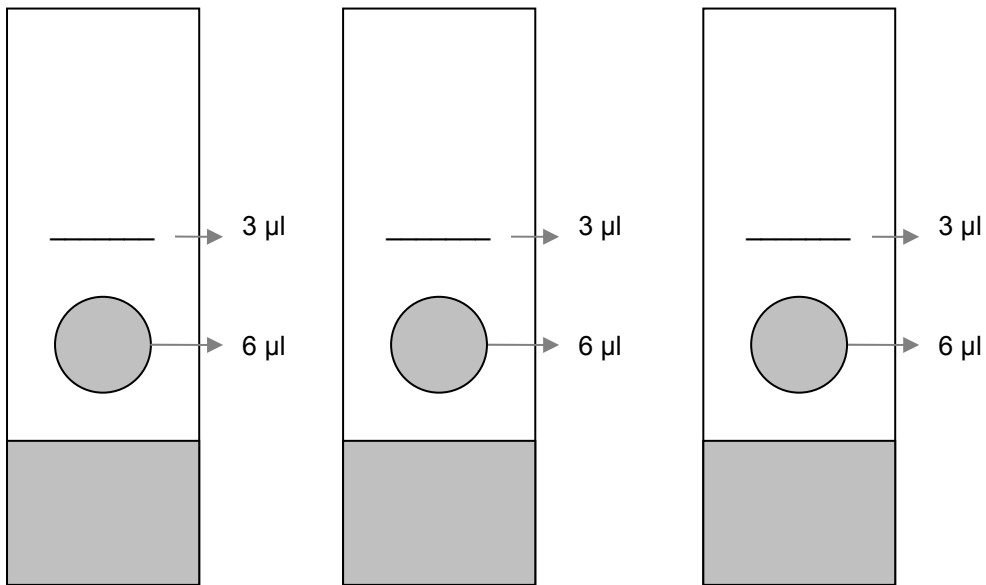
Schoonmaken van microscoopglasjes:

1. Open een nieuw doosje microscoopglasjes
2. Plaats de glasjes in een bakje water waaraan afwasmiddel is toegevoegd en laat ze hierin minimaal 2 uur weken.
3. Spoel de glasjes goed af met kraanwater
4. Droog elk glasjes af met behulp van een gaasje of met een pluisvrij doekje
5. Leg de glasjes op een warme plaat (50 – 60 °C) totdat ze volledig droog zijn.
Dit is belangrijk voor optimale hechting van de dikke druppel.
6. Bewaar de glasjes - samen met een zakje Silica gel - in een plastic preparatendoos

Opmerking:

Houd de glasjes uitsluitend vast aan de randen of aan het beschrijfbaar gedeelte.

Bijlage 2a:
Sjabloon voor het maken van gestandaardiseerde bloedpreparaten op één glaasje:



Bijlage 2b:
Sjabloon voor het maken van gestandaardiseerde bloedpreparaten op twee verschillende
glasjes:

