

Diagnose van malaria

N. de JONGE¹, A.M. POLDERMAN², J.P. VERHAVE³

Ten gevolge van zowel een toegenomen resistentie van malariaparasieten tegen veel gebruikte profylactica, als een sterke toename in het reizigersverkeer van en naar de (sub-)tropen, werd in Nederland een sterke stijging in het aantal gevallen van malaria geconstateerd. Aangezien infectie met *P. falciparum* potentieel levensbedreigend is, is een tijdige en adequate diagnostiek van groot belang. De laboratoriumdiagnose "malaria" wordt gesteld op grond van het aantonen van malariaparasieten in het bloed. In bijgaand artikel wordt ingegaan op een aantal aspecten van de laboratoriumdiagnostiek van malaria die zowel voor de laboratoriumspecialist als voor de clinicus van belang zijn.

Trefwoorden: laboratoriumdiagnose; malaria; Plasmodium; dikke druppel

Sinds 1965 is het aantal gevallen van malaria in Nederland aanzienlijk toegenomen. Deze stijging is het gevolg van zowel een toegenomen resistentie van de malaria-parasiet tegen een groot aantal profylactica (1), als een sterke toename in het reizigersverkeer (2). Werden in 1965 in geheel Nederland nog slechts 15 gevallen geregistreerd, thans zijn dit er jaarlijks ongeveer 300, een getal dat vermoedelijk de helft is van het werkelijke aantal. Hiermee is malaria van een betrekkelijke zeldzaamheid geworden tot een ziektebeeld waarmee in de dagelijkse klinische - en huisartsenpraktijk rekening dient te worden gehouden. Ruim de helft van de gevallen in Nederland betreft infecties met *P. falciparum*, de verwekker van malaria tropica. In niet-immune personen is dit een levensbedreigende infectie, waar snel en adequaat op moet worden gereageerd. Het belang van goede diagnostiek hierbij is evident (3).

De afgelopen jaren is in de Nederlandstalige literatuur regelmatig aandacht besteed aan met name klinische aspecten en profylaxe van malaria (3-12). De diagnostiek van deze protozoaire infectie kwam daarbij slechts zijdelings ter sprake. Deze zal in dit artikel nader worden besproken. De nadruk zal hierbij liggen

op de pré- en post-analytische overwegingen bij het onderzoek, zoals het tijdstip van monsternamen, de wijze waarop de preparaten dienen te worden gemaakt en de interpretatie van de uitslag. De laboratoriumtechnische aspecten van de kleuring van preparaten en van de morfologische details op grond waarvan de Plasmodium-soort wordt gedetermineerd worden in dit artikel slechts kort aangestipt. Voor uitgebreide informatie hierover wordt verwezen naar de handboeken (o.a. 16).

Indicaties voor malariadiagnostiek

Bij iedere patiënt die met koorts of verschijnselen van algemene malaise ("griep") uit de (sub-)tropen terugkeert, moet rekening worden gehouden met (falciparum) malaria, ook wanneer profylaxe volgens voorschrift is genomen (2). Het oude adagium: een patiënt die terugkeert uit de tropen en koorts krijgt, heeft malaria tenzij wordt bewezen dat zulks niet het geval blijkt, is nog immer geldig. Overigens kan malaria zich ook zonder koorts presenteren.

Wanneer de ziekte zich tot twee maanden na terugkomst uit de tropen openbaart, moet rekening worden gehouden met infectie door *Plasmodium falciparum*. Bij later optredende infecties is de verwekker doorgaans een van de andere soorten, hoewel van *P. falciparum* het manifest worden van infecties tot 1 jaar na terugkeer uit de tropen is beschreven. Zich in de lever schuil houdende parasieten (hypnozoïeten) van *P. vivax* en/of *P. ovale* kunnen tot 3-4 jaar na terugkeer uit een endemisch gebied een uitgestelde eerste aanval veroorzaken. *P. malariae* is het minst algemeen, maar kan zich levenslang handhaven in het bloed. Belangrijk bij de overweging malaria zijn, zelfs al heeft de patiënt chemoprophylaxe gebruikt en/of maatregelen genomen ter vermindering van mugcontact, de antwoorden op de volgende vragen:

- Waar is de patiënt geweest?
- Hoe lang was dat geleden?
- Heeft de patiënt een korte passage (bijvoorbeeld op een luchthaven) in een malaria-gebied doorgemaakt?

Bijzondere aandacht verdient het verschijnsel luchthavenmalaria, waarbij een infectie in niet-endemische gebieden tot stand kan komen doordat een geïnfecteerde Anopheles-muskiet, afkomstig uit een endemisch gebied, met een vliegtuig is meegevoerd en nog in staat blijkt een mens te besmetten. Het verschijnsel is betrekkelijk zeldzaam, maar is van belang bij patiënten met onbegrepen hoge koorts die in de nabijheid van internationale vliegvelden wonen of werken (Schiphol, Zaventem, Rotterdam Airport, Maastricht-Aachen Airport, maar ook de militaire vliegvelden zoals Valkenburg) (13-15).

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Leyenburg, Postbus 40551, 2504 LN Den Haag¹; Laboratorium voor Parasitologie, Rijksuniversiteit Leiden, Postbus 9605, 2300 RC Leiden²; Laboratorium voor Medische Parasitologie, Katholieke Universiteit Nijmegen, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen³

Correspondentie: Dr. ir. N. de Jonge, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Leyenburg, Postbus 40.551, 2504 LN Den Haag.

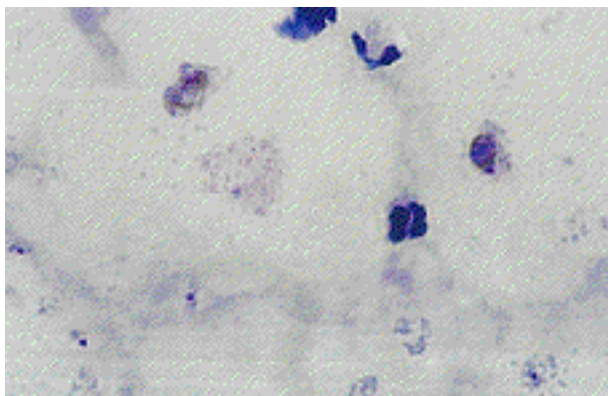
Hoe vindt de laboratoriumdiagnose plaats?

De diagnostiek van malaria is allereerst gebaseerd op de microscopische identificatie van trofozoïeten, schizonten en gametocyten in het perifere bloed. Hiertoe wordt vrijwel altijd gebruik gemaakt van dikke-druppelpreparaten en uitstrijkpreparaten, die met Giemsa worden gekleurd en microscopisch beoordeeld (16). Het dikke druppelpreparaat dient voor een ca. 20-voudige concentratie van de parasieten, wat de trefkans verhoogt. De uitstrijk wordt gebruikt ter verificatie van de soort Plasmodium, vanwege de fraaie morfologie die de parasieten in deze preparaten goed herkenbaar maakt.

De preparaten worden gemaakt van bloed, afgenomen door middel van een eenvoudige vingerprik. Nadat de eerste druppel met een watje is weggeveegd, wordt de volgende bloeddruppel voorzichtig op een objectglas gebracht, zonder dat de (altijd enigszins vette) vinger het glas raakt. De druppel wordt direct voorzichtig uitgesmeerd met bijvoorbeeld de hoek van een tweede objectglas. Het preparaat heeft de juiste dikte wanneer een fijngedrukte krantetekst nog leesbaar is door het preparaat heen. Door het preparaat voor kleuring niet te fixeren worden de erythrocyten gelyseerd (16). Nadat in het dikke-druppelpreparaat parasieten zijn gevonden, kan de determinatie van de Plasmodium-species aan de hand van het uitstrijkpreparaat worden bevestigd. Bij voorkeur worden per patiënt vier dikke-druppelpreparaten en vier uitstrijkpreparaten vervaardigd. Deze preparaten worden niet alle gekleurd, zodat eventuele herbeoordeling door een referentielaboratorium mogelijk is.

Het afnemen van EDTA-bloed, dat men vervolgens over een schuin geplaatst objectglas laat uitlopen, wordt ontraden, aangezien het ontstolde bloed slecht aan het objectglas hecht. Bovendien is door de enigszins lage pH ten gevolge van de toevoeging van het EDTA de karakteristieke Schüffnerse stippeling (zie figuur 1), die wordt gebruikt bij de determinatie van een aantal Plasmodia, niet te zien, tenzij men veel langer kleurt (1-1,5 uur).

Voor de kleuring van de preparaten dient niet de voor het hematologisch onderzoek dienende May-Grünwald-Giemsa oplossing te worden gebruikt. Er dient te worden gewerkt met speciaal bereide Giemsa, met een pH (7,1-7,2) die afwijkt van wat voor de hematologische kleuringen gebruikelijk is (16).



Recentelijk zijn nieuwe technieken beschreven voor het vaststellen van infectie met Plasmodium, zoals de "quantitative buffy coat analysis" (QBC), ParaSight F en ICT-Malaria P.f., DNA *in situ* hybridisatie (DISH) en de polymerase kettingreactie (PCR) (17-19). Hierop wordt elders in dit nummer ingegaan.

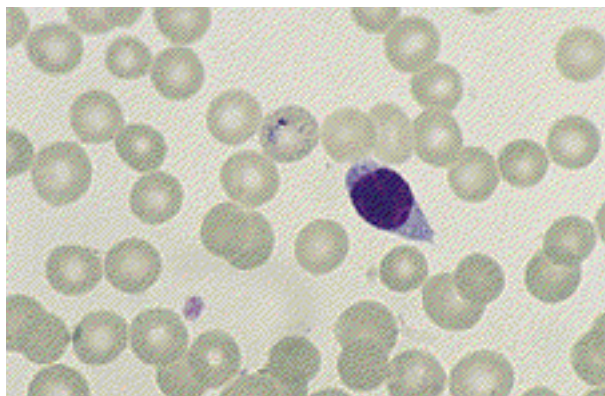
Wanneer bloed afnemen?

De veronderstelling dat bloedpreparaten het beste tijdens een koortspiek kunnen worden gemaakt is gevaarlijk en niet juist: er zijn immers vrijwel altijd parasieten in het bloed aanwezig. Het koortsverloop bij falciparum malaria kan bijzonder grillig zijn. Wachten op een koortspiek betekent vaak een gevaarlijk uitstel van handelen.

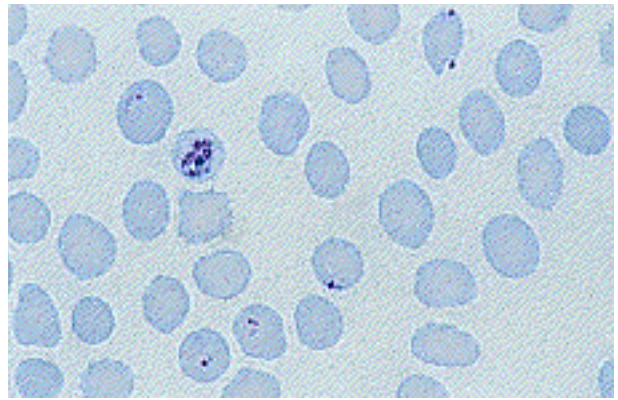
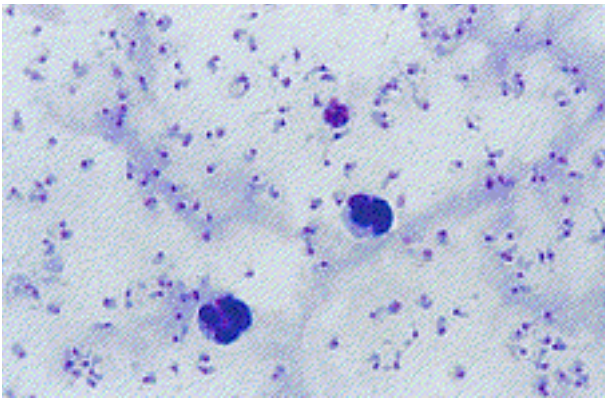
In een cyclus van 48 of 72 uur treedt koorts op na het uitbreken van de schizont en het binnendringen van de zeer jonge stadia in rode bloedcellen. Het bezwaar van prikken tijdens of vlak na de koortspiek is dat het soms moeilijk is de zeer jonge trofozoïeten van de verschillende Plasmodium-soorten goed van elkaar te onderscheiden. Bij oudere stadia is dat veel eenvoudiger.

Bij *P. falciparum* bestaat het risico een infectie te missen wanneer in het laatste deel van de (gesynchroniseerde) cyclus, vlak voor het uiteenvallen van de schizonten een bloedmonster wordt genomen. De schizogonie vindt immers niet in het perifere bloed plaats, maar in de organen. In dit geval kan een dipstick test toch een aanwijzing geven voor *P. falciparum*. Bij een negatief uitvallend malaria-onderzoek en voortdurende verdenking, moet bij een patiënt afkomstig uit streken die endemisch zijn voor *P. falciparum* het onderzoek daarom na 8-12 uur worden herhaald. Aangezien de schizogone cyclus bij *P. falciparum* meestal niet synchroon verloopt (geen uitgesproken koortspieken), kunnen in de praktijk meestal wel trofozoïeten in het perifere bloed worden aangehouden.

Bij malaria tertiana als importziekte wordt bij slechts 30% van de patiënten een regelmatig koortspatroon gevonden (20). Vóór het intermitterend patroon zich heeft ingesteld, zijn koortspatiënten vaak al zeer ziek, maar parasieten kunnen schaars zijn. Een goed getraind microscopist moet hier worden ingeschakeld.



Figuur 1. Schüffnerse stippeling bij *Plasmodium vivax*. Links: Dikke druppel (x1000); Rechts: Uitstrijk (x1000); Foto's: Laboratorium Havenziekenhuis.



Figuur 2. Schizont van *Plasmodium falciparum*. Links: in de dikke druppel (x1000); Rechts: in de uitstrijk (x1000); Foto: Laboratorium Havenziekenhuis.

Beoordeling en interpretatie

De diagnose malaria wordt gesteld naar aanleiding van het vinden van Plasmodia in het dikke-druppelpreparaat. Bij onderzoek van een dikke druppelpreparaat mag de uitslag "geen parasieten gezien" slechts worden afgegeven als tenminste 200 velden zorgvuldig zijn onderzocht. Bij blijvende verdenking op malaria moet het onderzoek na 8-12 uur worden herhaald en daarna eens per etmaal. Pas wanneer aldus na 3-5x herhaling van het onderzoek nog steeds geen parasieten zijn gevonden, kan de diagnose malaria redelijkerwijs worden uitgesloten.

Bij positieve bevindingen is het gezien de therapeutische consequenties, van belang de soort Plasmodium te determineren. Als dat niet duidelijk wordt uit de dikke druppel wordt het bloeduitstrijkpreparaat verder onderzocht. Menginfecties kunnen voorkomen: infecties waarbij de patiënt bijvoorbeeld zowel met *P. falciparum*, als met *P. vivax* of *P. malariae* is geïnfecteerd.

Het vinden van rijpere trofozoïeten en schizonten van *P. falciparum* duidt op een overlading van de capillairen in de organen en is derhalve een alarmerende bevinding (figuur 2). Gametocyten van *P. falciparum* verschijnen in de circulatie na ongeveer 2 weken van asexuele parasitemie en kunnen een teken zijn van een gunstig verloop van de infectie. Gametocyten worden door de therapie niet gedood en kunnen dus ook na behandeling nog in het perifere bloed worden aangetroffen.

In zeldzame situaties is een bepaling van de soort Plasmodium niet mogelijk of volgt deze pas later (na 12-24 uur), eventueel na beoordeling door een referentielaboratorium. Hier kan een dipsticktest uitkomst geven.

Vaststellen parasitemie

De ernst van een infectie kan zowel op grond van het klinisch beloop als op grond van de parasietendichtheid (parasitemie) worden ingeschat. Van een ernstige *P. falciparum*-infectie wordt gesproken indien de parasitemie >2% is, of bij iedere parasitemie in combinatie met aanwezigheid van schizonten, neurologische verschijnselen of andere tekenen van orgaanfalen. Verslechtering van de klinische conditie kan zeer snel intreden!

Ook voor het meten van het effect van behandeling is het vaststellen van de parasitemie belangrijk. Voor een indicatie van lagere parasietendichtheden is het gebruikelijk de aantallen parasieten in een dikke-druppelpreparaat te schatten per 200 leukocyten. In een uitstrijkpreparaat kan het percentage geïnfecteerde erythrocyten worden bepaald bij hogere dichtheden. Als aantallen witte en rode bloedcellen per volume bekend zijn, of worden verondersteld normaal te zijn (bijv. leukocyten $8 \times 10^9/l$ en erythrocyten $4 \times 10^{12/l}$), kunnen de in de dikke druppel gevonden waarden en die van het uitstrijkpreparaat in elkaar worden omgerekend. Ten gevolge van het gebruik van profylaxe wordt dikwijls een onverwacht lage parasitemie gevonden.

Aangifte door laboratoriumhoofd

Malaria is een ziekte die in de Wet van 11 juni 1998, houdende regels ter afwending van gevaren van Infectieziekten (Infectieziektenwet), wordt genoemd in groep C. Het hoofd van het laboratorium dient aangifte te doen na het vaststellen van de diagnose.

Laboratoriumonderzoek na behandeling

Van niet-immune personen met falciparum malaria dient, gezien het zeer frequent voorkomen van therapieresistentie, dagelijks bloedonderzoek te worden verricht, totdat geen trofozoïeten (of schizonten) meer worden gevonden. Gametocyten, die niet door de behandeling worden gedood, blijven gedurende 1-3 weken in de circulatie aantoonbaar.

Voor het vervolgen van de behandeling van falciparum malaria kan het volgende schema worden gehanteerd:

- dagelijks onderzoek gedurende de eerste week na de start van de behandeling (dag 0), gevolgd door
- wekelijks onderzoek tot een maand na behandeling (21).

Indien de parasitemie niet binnen 3 dagen beneden 25% van de waarde gevonden bij admittie zakt en/of niet is verdwenen binnen 7 dagen, moet resistentie worden overwogen en de behandeling worden aangepast (22). De behandeling van infecties met *P. vivax*, *P. ovale* of *P. malariae* behoeft veel minder intensief te worden vervolgd: een eenmalige controle na een week lijkt voldoende (23).

Concluderend kan worden gezegd dat snelle diagnose van malaria afhangt van een reeks informatieniveaus.

1. De patiënt moet de arts helpen malaria te betrekken in zijn differentiële diagnose, door melding te maken van zijn verblijf in de tropen en zijn gebruik van chemoprophylaxis.
2. De arts moet de onmiddellijke conclusie trekken dat malariaparasieten moeten worden aangetoond en hij moet een laboratorium inschakelen.
3. Het laboratorium moet competent zijn om binnen enkele uren de uitslag van het onderzoek (telefonisch) door te geven of op korte termijn een bevestigend onderzoek laten uitvoeren door meer ervaren personeel. Hiervoor verwijzen wij naar de door beroepsverenigingen opgestelde Richtlijnen voor diagnostiek van malaria voor laboratoria in de gezondheidszorg in Nederland, die elders in dit nummer van het NTKC zijn gepubliceerd.
4. Therapie moet vervolgens snel worden bepaald door de arts, of hij moet informatie inwinnen over behandeling (en opname) bij een clinicus met ervaring in tropische ziekten.
5. Het verloop van klinische verschijnselen en parasitemie moeten worden vervolgd.

Ernstige malaria en fatale afloop kunnen worden geminimaliseerd als deze vijf punten in acht worden genomen. Nascholing voor huisartsen, asielcentra-artsen en internisten en voor laboratoriumhoofden en -personeel kunnen de bewustheid bevorderen voor malaria. Op laboratoriumniveau kan deelname aan de nationale kwaliteitsborging parasitologische laboratoriumdiagnostiek (SPLD/SKMM) op den duur kwaliteitsverbeterend zijn.

Literatuur

1. Wernsdorfer WH. The development and spread of dry resistant malaria. *Parasitology Today* 1991; 7: 297-303.
2. Couvreur GJN. Algemene gegevens over het reizen. In: Huisman J (red.). *Reizigersgeneeskunde: "emporiatrie"*. Alphen a/d/ Rijn: Samson Stafleu, 1988. p. 16-21.
3. Stuiver PC, Chang PC, Ligthelm RJ, Goud ThJLM. Malaria in het Havenziekenhuis; overzicht van de periode 1970-1981. *Ned Tijdschr Geneesk* 1983; 127: 1244-1247,1512.
4. Wetsteyn JCFM, Geus A de. Malaria tropica veroorzaakt door chloroquine-resistente *Plasmodium falciparum*, ook in Nederland een probleem van toenemend belang. *Ned Tijdschr Geneesk* 1983; 127: 1238-1243.
5. Kager PA. Wie verre reizen maakt...; enkele importziekten. *Ned Tijdschr Geneesk* 1989a; 133: 1771-1773.
6. Kager PA. Malaria tropica; late behandeling van reizigers met "griep". *Ned Tijdschr Geneesk* 1989b; 133: 1782-1784.
7. Kager PA. Malaria kan nu toch niet meer? *Ned Tijdschr geneesk* 1989c; 133: 1829-1831.
8. Stuiver PC, Van der Kaay HJ. Antimalariamiddelen. *Ned Tijdschr Geneesk* 1988; 132: 332-335.

9. Van der Kaay HJ, Kullberg BJ, Overbosch D, Bilkert-Mooiman MAJ, Postema CA, Stuiver PC. Malaria tropica: wordt de profylaxe steeds eenvoudiger? *Ned Tijdschr Geneesk* 1990; 134: 1445-1450.
10. Elshot SRE, Keuning JJ, Diepersloot RJA, De Geus A. Een zeer ernstige infectie door *Plasmodium falciparum* ondanks malaria-profylaxe. *Ned Tijdschr Geneesk* 1989; 133: 1769-1771.
11. Driessen SO, Wetsteyn JCFM. Importmalaria: epidemiologische, klinische en therapeutische gegevens van 74 patiënten gedurende 1 jaar in het Academisch Medisch Centrum, Amsterdam. *Ned Tijdschr Geneesk* 1994; 138: 712-716.
12. Verhave JP. Malaria: infectierisico voor tropenreizigers en import in Nederland. *Pharmaceutisch Weekblad* 1995; 130(17): 454-458.
13. Delamarre-Van de Waal HA, De Waal FC. Een tweede patiënt met malaria tropica op natuurlijke wijze verkregen in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 1981; 125: 375-377.
14. Delamarre BJM, Van der Kaay HJ. Malaria tropica op natuurlijke wijze verkregen in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1979; 123: 1981-1982.
15. Isaacson M. Airport malaria: a review. *Bull World Health Organ* 1989; 67: 737-743.
16. Polderman AM, Rijpstra. *Medische parasitologie - handleiding bij de laboratoriumdiagnostiek*. Houten/Zaventem: Bohn Stafleu Van Loghum, 1993.
17. Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL. Detection of haemato-parasites using quantitative buffy coat analysis tubes. *Parasitol Today* 1989; 5: 132-134.
18. Franzen L, Westing G, Shabo R, Aslund L, Perlmann H, Person T, Wigzell H, Petersson U. Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from *P. falciparum*. A novel approach to malaria diagnosis. *Lancet* 1984; i: 525-528.
19. McLaughlin GL, Ruth JL, Jablonski E, Steketee R, Campbell GH. Use of the enzyme-linked synthetic DNA in diagnosis of falciparum malaria. *Lancet* 1987; i: 714-716.
20. Klingelberger CE. It's not a viral syndrome, it's malaria. *Ann Emergency Medicine* 1989; 18: 207-210.
21. Rieckmann KH. Monitoring the response of malaria infections to treatment. *Bull WHO* 1990; 68: 759-760.
22. Gilles HM. *Management of severe and complicated malaria*. Geneva: WHO, 1991.
23. Dolmans WMV, Persoonlijke mededeling.

Summary

Diagnosis of malaria. Jonge N de, Polderman AM, Verhave JP. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 34-37.

Due to an increase in both the spread of chloroquine resistance of the malaria parasite world wide, and increased travel to and from (sub-)tropical countries, there has been a significant increase in the number of malaria cases in The Netherlands. Because infection with *P. falciparum* is potentially life-threatening, a prompt and appropriate diagnosis is of vital importance. The laboratory diagnosis of malaria is based on the finding of malaria parasites in blood smears. In this paper, aspects of importance for both the laboratory specialist and the clinician are discussed.

Key-words: laboratory diagnosis; malaria; Plasmodium; thick smear