



Malaria-Diagnostik : Dicker Blutausstrich (Dicker Tropfen)

aus: H.-P. Seelig, Präanalytik 2008, p 290 - 294

► **Dicker Blutausstrich (Dicker Tropfen)**

Der dicke Tropfen wird zum Schnellnachweis der Malariainfektion und anderer durch Parasiten verursachter Erkrankungen verwendet. Die Malaria ist eine mit schweren Fieberschüben einhergehende Erkrankung, die durch Malariaparasiten (*Plasmodium* spp.) ausgelöst wird, die sich in den Erythrozyten nachweisen lassen. Trotz der Entwicklung von serologischen und molekulargenetischen Methoden wird für die Diagnose der Malaria immer noch der eindeutige mikroskopische Nachweis der Parasiten im Blutausstrich gefordert (Abbildung 10.5). Mit diesem Verfahren lassen sich die vier Erregerspezies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* erkennen und differenzieren.

Der Dicke Tropfen besteht aus einer dicken Schicht enthämoglobinierten (hämolytierten) Blutes. Nur die Leukozyten und eventuell vorhandene Malariaparasiten lassen sich darin mikroskopisch erkennen. Im dicken Tropfen sind die Blutbestandteile und die Parasiten konzentrierter (etwa 30fach) als in dem gleichen Gesichtsfeld eines dünnen Ausstrichs. Dies ermöglicht einen effizienteren Nachweis der Parasiten (höhere Sensitivität; etwa 20-fach sensitiver als ein dünner Blutausstrich). Die Hämolyse und der langsame Trockenprozess bei der Herstellung eines dicken Tropfens beeinträchtigen allerdings die Morphologie der Plasmodien so stark, dass die Differenzierung der Spezies nicht mehr eindeutig erfolgen kann. Der dicke Tropfen dient dem Nachweis einer Infektion und der Abschätzung der Parasitenkonzentration. Da er eine eindeutige Beurteilung der Parasitenmorphologie in der Regel nicht erlaubt, wird zur Differenzierung der Spezies dann ein dünner Blutausstrich verwendet. In den dünnen Blutausstrichen, die zur Verhinderung der Hämolyse mit Methanol fixiert werden, bleiben die Erythrozyten intakt und eventuell vorhandene Plasmodien werden weniger geschädigt, sodass sich ihre Spezieszugehörigkeit noch bestimmen lässt.

- Wichtige Voraussetzungen für die Verwendung des dicken Tropfens in der Malariadiagnostik sind:
 - ▶ Qualitativ hochwertige Färbung
 - ▶ Runde Ausformung mit einem Durchmesser von 10 - 15 mm
 - ▶ Schichtdicke von etwa 10 Lagen von Erythrozyten
 - ▶ 10 - 12 Leukozyten pro Gesichtsfeld (Ölimmersionsobjektiv 100x)
 - ▶ Ein in der Malariamikroskopie erfahrener Untersucher
- **Herstellung:** Dicke Tropfen werden aus frischem Kapillarblut oder aus antikoaguliertem Venenblut hergestellt. Wie auch die dünnen Blutausstriche sollten die dicken Tropfen so schnell wie möglich nach der Blutentnahme hergestellt werden (siehe oben). Jede Verzögerung der Ausführung kann die Morphologie der Parasiten und die Färbung beeinträchtigen.
 - ▶ Mindestens 5 Ausstriche sollten pro Patient angefertigt werden. Die Präparate sind mit Patientennamen und Uhrzeit der Blutentnahme zu beschriften.
 - ▶ Ein kleiner Tropfen gut durchmisches EDTA-Blut (20 μ L) oder ein Tropfen Kapillarblut wird in das Zentrum eines gereinigten (fettfrei, staubfrei) Objektträgers aufgetragen und mit einem Glasstab oder der Ecke eines anderen Objektträgers zirkulär verrieben, sodass ein Kreis mit einer Fläche von 1,5 - 2,0 cm² erhalten wird.
 - ▶ Die richtige Dicke des Tropfens ist erreicht, wenn eine untergelegte Druckschrift nur noch schwerlich durch den Ausstrich zu erkennen ist.
 - ▶ Die Objektträger werden waagrecht zum Trocknen gelegt. Die Trocknungszeit beträgt mindestens 90 Minuten, bei Raumtemperatur kann sie mehrere Stunden betragen. Eine Beschleunigung des Trockenprozesses kann mit einem Föhn (Kaltluft) erreicht werden.



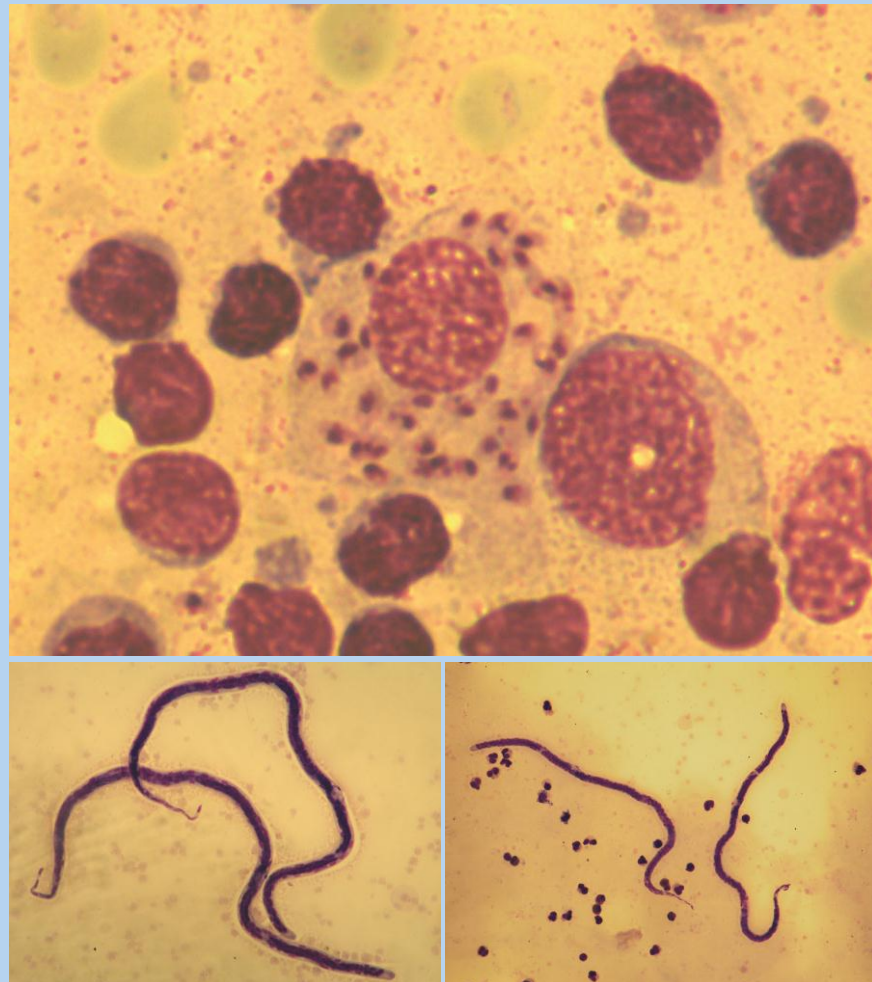
Malaria-Diagnostik : Dicker Blutausstrich (Dicker Tropfen)

- ▶ Ungenügend getrocknete Ausstriche (sowie auch zu dicke Ausstriche) können sich bei der Färbung leichter wieder von der Unterlage abheben. Das Risiko hierfür ist größer bei Ausstrichen, die mit antikoaguliertem Blut durchgeführt wurden. Im letzteren Fall müssen die Ausstriche ohnehin während des Färbeprozesses sehr vorsichtig behandelt werden. Ausstriche sollten nicht in heißer Umgebung gelagert werden, um eine Hitzefixierung zu vermeiden, sie sollten auch vor Staub und Insekten geschützt werden.
- ▶ Der dicke Tropfen darf nicht mit Methanol fixiert werden. Selbst eine Exposition gegenüber Methanoldämpfen kann die Hämolyse verhindern und damit die Färbung unbrauchbar machen.
- ▶ Ordnungsgemäß hergestellte dicke Tropfen können trocken verschickt werden. Mindestens 5 Ausstriche pro Patient in einer festen Versandtasche für Glasobjektträger einsenden.
- ▶ Zur Färbung des dicken Tropfens wird der Objektträger mit der Schichtseite nach unten schräg in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Petrischale gelegt, wobei das Ende des Objektträgers auf einer Unterlage, z. B. dem Rand der Petrischale aufliegt. Die Hämolyse beginnt innerhalb 10 Minuten. Sie wird solange fortgesetzt, bis der Ausstrich durchsichtig erscheint (bis zu 40 Minuten). Anschließend Färben nach Giemsa (einer Mischung von Eosin und Methylenblau).
- ▶ **Mikroskopische Begutachtung:** Training und Erfahrung sind für die Begutachtung solcher Präparate erforderlich. Dicke Tropfen müssen mindestens 20 Minuten untersucht werden, bevor sie als negativ für Malaria Parasiten befundet werden können. Die Parasiten sind vielfach nicht leicht erkennbar und ein schnelles visuelles Durchmustern der Präparate ist für diagnostische Zwecke nicht ausreichend. Da die Beurteilung eines dünnen Blutausstriches für die Malaria-Diagnostik mindestens 10-mal so lange dauert wie die eines dicken Tropfens, wird in der Praxis der dicke Tropfen zuerst untersucht. Mit einem 40x Objektiv wird ein gut gefärbter Bereich des Ausstrichs ausgewählt. Ein Tropfen Immersionsöl wird appliziert und der Bereich anschließend mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv beurteilt. Nachdem festgestellt wurde, dass der Bereich für die Untersuchung akzeptabel ist, werden mindestens 200 Gesichtsfelder untersucht (100x Ölimmersionsobjektiv), wobei auf Trophozoiten, Schizonten und Gametozyten geachtet wird, sowie auf Größe, Form, Anzahl der Kerne und auf die Anzahl der Leukozyten. Die Untersuchung erfordert Konzentration, Ausdauer und Erfahrung. Danach müssen in dem dünnen Blutausstrich mindestens 1000 Gesichtsfelder untersucht werden. Größe, Deformationen und Pigmentbeladung der Erythrozyten werden registriert. Mehrfachinfektionen von Erythrozyten, Trophozoiten außerhalb der Erythrozyten und prozentualer Anteil der befallenen Erythrozyten werden bestimmt. Es sollte auch auf den möglichen Befall mit anderen Parasiten, die im Blut nachgewiesen werden können, geachtet werden. Von besonderer diagnostischer Bedeutung sind:
 - ▶ *Babesia microti*
 - ▶ *Trypanosoma brucei gambiense*
 - ▶ *Trypanosoma brucei rhodiense*
 - ▶ *Trypanosoma cruzi*
 - ▶ *Mikrofilaria* spp.: *Wucheria bancrofti*, *Bugia malayi*, *Bugia timori*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Mansonella perstans*, *Microfilariae* werden in peripheren Kapillaren konzentriert. Dicke und dünne Ausstriche von Kapillarblut, das durch Punktion der Fingerbeere erhalten wurde, wird als Material empfohlen. Antikoaguliertes EDTA-Blut aus Venenpunktionen (1 mL) sollte durch Zentrifugieren (Knott's Technik) oder Filtration konzentriert werden (Abbildung 10.7)



Malaria-Diagnostik : Dicker Blutausstrich (Dicker Tropfen)

Abbildung 10.7



Leishmanien und Mikrofilarien

- A:** Phagozytierte Leishmanien in einem Makrophagen des Knochenmarks bei HIV-positivem Patienten. (Knochenmarksausstrich, Pappenheimfärbung, 1.000x). Die Leishmaniose, eine weltweit bei Mensch und Tier vorkommende Infektionserkrankung wird durch obligat intrazelluläre Parasiten hervorgerufen (Tropen, östliches Afrika, Mittelmeerraum und Asien). Übertragung durch Sand- oder Schmetterlingsmücken.
- B, C:** Mikrofilarien (Loa-Loa, Wanderfilarie, Augenwurm) bei einem Patienten aus Kamerun (Blutausstrich, Pappenheimfärbung, 1.000x). Die Loa-Loa-Infektion tritt nur im tropischen Regenwald in Westafrika auf. Der fadenförmige Wurm wird durch Mückenstiche auf den Menschen übertragen, bildet Mikrofilarien, die unter die Haut und Hornhaut wandern und Hautschwellungen (Kamerunbeule) verursachen. Die Würmer werden 30 - 70 mm lang (Männchen < Weibchen), die Mikrofilarien etwa 300 μm . Die adulten Würmer leben und wandern im subkutanen Fettgewebe (Lebenserwartung der Würmer > 20 Jahre). Die weiblichen Filarien geben die Mikrofilarien ab, die über die Lymphgefäße in das Blut gelangen.

- **Quantifizierung von Malaria Parasiten:** Ein weiterer Schritt in der Malariadiagnostik betrifft die Bestimmung des Ausmaßes der Infektion. Dies kann entweder am dicken Tropfen durch Bestimmung der Absolutzahl der Parasiten erfolgen oder an dünnen Blutausstrichen durch die Bestimmung ihres Prozentanteils.



Malaria-Diagnostik : Dicker Blutaussstrich (Dicker Tropfen)

- **Bestimmung der Absolutzahl (dicker Tropfen):** In einem systematischen Felderscreening werden 200 Leukozyten gezählt. Gleichzeitig werden auch die Malariaparasiten in den Erythrozyten in denselben Gesichtsfeldern gezählt. Nachdem 200 Leukozyten ausgezählt wurden und 10 oder mehr Parasiten identifiziert werden konnten, wird die Zahl der Parasiten angegeben. Wenn weniger als 9 Parasiten gezählt wurden, muss die Zählung bis auf 500 Leukozyten ausgedehnt werden. Die Anzahl der Parasiten/mL errechnet sich nach:

$$\text{Parasiten}_{\text{[mL]}} = \frac{\text{Parasiten}_{\text{gezählt}}}{\text{Leukozyten}_{\text{gezählt}}} \cdot \text{Leukozyten}_{\text{mL}}$$

Alle Parasitenspezies und Parasitenformen werden zusammengerechnet (sowohl sexuelle Formen, Gametozyten wie auch asexuelle Formen, Trophozoite, Merozoiten).

- **Prozent-Methode (dünnere Blutaussstrich):** Es wird der Prozentsatz der mit Malariaparasiten infizierten Erythrozyten bestimmt. Die Methode schätzt den Prozentsatz der roten Blutzellen ab, der mit Malariaparasiten infiziert ist. Sie basiert auf der Anzahl der roten Blutzellen, in denen Parasiten in einem dünnen Blutaussstrich gefunden werden. In dem dünnen Blutaussstrich wird ein Gebiet ausgewählt, in dem rote Blutzellen enger zusammenliegen, sich aber nicht berühren. Mit einer systematischen Musterung von mehreren Reihen unter Verwendung des Kreuztisches werden 300 - 500 Erythrozyten gezählt und die Anzahl der Erythrozyten mit Parasiten ausgezählt.

$$\text{Parasitäre Erythrozyten}_{\text{[%]}} = \frac{\text{Parasiten}_{\text{gezählt}}}{\text{Erythrozyten}_{\text{gezählt}}} \times 100$$

Werden nur gelegentlich Parasiten bei der Durchmusterung des Blutaussstriches gefunden, aber keine bei der Zählung von 300 - 500 roten Blutkörperchen identifiziert, wird ein Prozentwert von weniger als 1% parasitenhaltiger Erythrozyten angegeben. Eine Schätzung von weniger als 1% parasitenbefallener roter Blutzellen muss nicht wiederholt werden, da nur Werte von 2 - 3% und darüber sind von klinischer Bedeutung sind.

- **Weitere Techniken:** Neue leicht durchzuführende serologische Techniken für Malariadiagnose erwarten eine Approbation durch die FDA. Mit diesem ELISA können dann *P. falciparum* innerhalb von 10 Minuten nachgewiesen werden. Klinische Studien zeigen, dass diese Methoden Infektionen mit *P. falciparum* bei Parasiten-Blutkonzentrationen von mehr als 40 Parasiten pro Mikroliter (> 40 Parasiten/mL) erkennen können.

C. A. Seelig, H.-P. Seelig