

Technieken microscopische sneldiagnostiek voor de dermatologisch praktijk.

Aanvulling op: Lavrijsen A.P.M., Raaij-Helmer E.M.H. van der, Bergman W., Brouwer A., Douw van der Krab P.F. Microscopie van directe preparaten voor de dermatologische praktijk, 2004.

A.P.M. Lavrijsen en E.M.H. van der Raaij-Helmer

Leids Universitair Medisch Centrum

Versie januari 2010

Index

1. KOH-preparaat
2. Giemsa-kleuring, Tzanck-test
3. Snelle Tzanck-test, Hemacolor®
4. Methyleenblauw-kleuring
5. Gram-kleuring
6. Fysiologisch-zout preparaat
7. Plakbandpreparaat
8. Donkerveld-preparaat
9. Handleiding lichtmicroscopie
10. Verwijzingen

1. KOH-preparaat

Indicatie:

1. Verdenking dermatomycose: dermatofyt - candida species - malassezia species
2. Verdenking mijten: scabies (schurftmijt)- Demodex
3. Verdenking corynespecies: erythrasma - trichomycosis

Materiaal verzamelen en afleveren:

Huidschilfers:

- Omdat de schimmel in het centrum van een dermatomycose vaak al is verdwenen, moet het te onderzoeken materiaal bij voorkeur worden afgenomen ter plaatse van de overgang van de klinisch aangedane naar de klinisch gezonde huid.
- Bij het afnemen worden schilfers in de richting van de gezonde huid losgetrokken zodat deze overgang aangedane – gezonde huid kan worden beoordeeld.
- Het materiaal kan worden afgenomen met een scalpel en pincet of objectglaasje.
- Vooral kleine schilfertjes en blaardakmateriaal (bijvoorbeeld bij een infectie met Trichophyton mentagrophytes) zijn bijzonder geschikt.
- Indien lokaal zalven of crèmes zijn gebruikt kan de huid vooraf aan het afnemen van schilfers worden schoongemaakt met alcohol.

Haren:

- Bij verdenking van een tinea capitis - trichomycose is het belangrijk om naast huidschilfers ook aangetaste haren van het aangedane huidgebied met een pincet uit te trekken voor zowel het directe preparaat als voor schimmelkweek.
- Afgeknipte haren zijn onbruikbaar omdat de schimmel zich meestal in de basis van de haar en/of in de haarwortel bevindt. Vaak laten aangedane haren zich makkelijk uittrekken.

Nagels:

- Bij een onychomycose geldt eveneens dat het te onderzoeken materiaal afgenomen wordt ter plaatse van de overgang van het klinisch aangedane naar het klinisch gezonde deel van de nagel.
- Bij voorkeur knipt men op het overgangsgebied de nagel en probeert daarbij zowel een gedeelte van de bovenkant als de onderkant van de nagel te verzamelen.
- Wanneer de totale nagel is aangedaan kan men materiaal verkrijgen door het afschrapen van de oppervlakkige nagel of de subunguale hyperkeratose.

Binnen het ziekenhuis tussen twee objectglaasjes met plakband vastgezet in een nierbekken.
Buiten het ziekenhuis in onbreekbaar verzendmateriaal verpakken bv. envelop.

Benodigheden:**Apparatuur, glaswerk en andere materialen:**

- Brander
- Filterpapier
- Microscoop
- Objectief 10x en 40x
- Objectglaasjes
- Dekglaasjes, 24x32 mm of 24x60 mm
- Maatcilinder
- Schaar
- Nageltang
- Pincet
- Scalpelmessje

Reagentia, media en andere hulpstoffen

- 40% Kaliumhydroxide (KOH 40%) oplossing verkrijgbaar bij Merck (nr. 4.80311.1000).
- Malinol
- Vulpeninkt (Parker)
- Demi-water

Oplossingen:

- 20% KOH oplossing: 50 ml KOH 40% verdunnen met 50 ml demiwater.
- 20% KOH oplossing + Parker vulpeninkt mengen: 4 ml 20% KOH oplossing + 1 ml vulpeninkt (Parker).

Uitvoering

- Materiaal (huidschilfers of nagel stukjes of haren) worden gelegd op een objectglaasje.
- Breng een druppeltje 20% KOH-oplossing naast het materiaal en hierop een dekglaasje. De 20% KOH-oplossing is gekozen omdat een lagere concentratie niet voldoende het materiaal verweekt en een hogere concentratie eerder kristalliseert waardoor het preparaat eerder uitdroogt.

- Het preparaat wordt direct met de 10 maal objectief beoordeeld, vervolgens het preparaat verwarmen, aandrukken en daarna nogmaals met de 40 maal objectief beoordelen.
- Vooral bij nagels zal de inweektijd langer zijn vanwege het harde materiaal. Daarom wordt elk KOH-preparaat welke in eerste instantie negatief beoordeeld is na 2 à 3 uur nogmaals onderzocht.
- Het KOH-preparaat wordt bewaard in een petrischaal met triangel. Deze wordt op het formulier van de patiënt geplaatst, terzijntijd wordt het preparaat van een etiket voorzien. De positieve preparaten worden zo gedurende de hele week bewaard voor de aios en co-assistenten.
- De preparaten beslist niet vochtig maken of in de koelkast bewaren. Om KOH-preparaten voor langer tijd te kunnen bewaren gebruiken wij een 20% KOH-oplossing en kunnen de randen met malinol afgedekt worden.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Huidschilfers, Nagels, Haren	Mycelium (schimmeldraden) of sporen	Anthropofiele dermatofyt Zoöfiele dermatofyt Non-dermatofyt
Huidschilfers, Nagels, Haren	Malassezia species (ovale en orbiculare gistcellen) Malassezia species met pseudomycelium Norcardia minutissima Mijten of eieren	Malassezia folliculitis Pityriasis versicolor Erythrasma Scabies Demodex
Huidschilfers, Nagels, Haren	Candida (gistcellen + pseudomycelium)	Candidiasis*
Haren	Verdikking haren door Corynebacterium tenuis Luizen en neten	Trichomycosis axillaris Hoofdluis Schaamluis

Opmerking: in het KOH preparaat:

- Malassezia species hebben een halo in KOH zonder parkerinkt.
- Candida is scherpbegrensd en peervormig.

*Indien een preparaat negatief is moet er voor Candida altijd materiaal voor kweek afgenomen worden.

Veiligheid:

Glaasjes in de biologische afvalcontainer deponeren.

2. Giemsa-kleuring, Tzanck-test

De Tzanck-test is een zeer oude methode om met behulp van epitheelcellen van de bodem van een blaasje, een herpes infectie aan te tonen. (Arnault Tzanck, een Russische dermatoloog 1886-1954). De reden dat deze test te doen is de haast die geboden is om bij patiënten met een verminderde weerstand of bij patiënten met de verdenking eczema herpeticum de diagnose herpesinfectie snel te kunnen bevestigen. Met deze techniek kan echter geen onderscheid gemaakt worden tussen een infectie met een herpes zoster virus (varicella virus) en een herpes simplex virus. Bovendien mag een blaasje niet ouder zijn dan 2 à 3 dagen. Indien de Tzanck-test negatief is kan er nog sprake zijn van een oude herpes infectie. Om dit uit te sluiten is aanvullende diagnostiek nodig doormiddel van een kweek of PCR.

Indicatie:

- Herpes infectie bij patiënt met verminderde afweer
- Eczema herpeticum
- Cutane leishmaniasis (aanvullend aan histologisch onderzoek)
- Differentiaal diagnose van pustuleuze erupties bij de neonataal. (differentiatie bacteriële, virale en mycotische infecties en niet infectieuze dermatosen zoals erythema toxicum neonatorum eosinophilicum, transiente neonatale pustuleuze melanose en infantiele acropustulose).

Biologisch materiaal verzamelen en afleveren:

Pustel:

- Met steriele naald of scalpel mesje (nr. 15) pustel openen en het pus zo dun mogelijk op een objectglaasje uitstrijken.

Blaasje verdenking herpes infectie:

- Materiaal afkomstig van een vers blaasje - liefst niet ouder dan 36 à 48 uur.
- Blaasje openen
- Schrap met een mesje materiaal van de blaarbodem en strijk dit uit op een objectglaasje en laat dit bij de lucht drogen. (blaarvocht kan eventueel voor aanvullend onderzoek worden gebruikt).

Ulcus: verdenking leishmaniasis:

- Deppreparaat van een huidbiopt of uitstrijk van de ulcusrand.

Benodigdheden

Apparatuur, glaswerk en andere materialen

- Flowkast
- Brander
- Spuitfles
- Kleurbakje
- Filterpapier
- Microscoop
- Lenzen 10x en 100x

Reagentia, media en hulpstoffen

- May Grunwald oplossing (Merck, cat.nr.1.01424.0500) (oplossing 1)
- Giemsa oplossing (Merck, 109204.0100)
- Kalium/natrium fosfaat buffer

- Kraanwater
- Immersie-Olie

Oplossingen

- Buffer voor Giemsa kleuring
 - Weeg 0,492 gram KH_2PO_4 af
 - Weeg 1,14 gram Na_2HPO_4 af
 - Oplossen in 1 l water
 - Stel op pH 7,2
- 50% May Grunwald oplossing in buffer (oplossing 2)
 - 25 ml May Grunwald stock-oplossing
 - 25 ml buffer
- 4% Giemsa oplossing (oplossing 3):
 - 1 ml Giemsa
 - 24 ml Buffer

Handelwijze:

- Uitstrijk aan de lucht laten drogen.
- Voer een Giemsa kleuring uit.
- Kleur het materiaal 3 minuten met May Grunwald Losung (oplossing 1), gebruik hierbij een filter.
- Afspoelen met leidingwater uit spuitfles.
- Kleur het materiaal nu 2 minuten met gelijke delen May Grunwald + buffer (oplossing 2), hiervoor kan dezelfde filter worden gebruikt.
- Spoel af met leidingwater
- Kleur het materiaal nu 10 minuten met een mengsel van 4% Giemsa oplossing (oplossing 3), dit mag zonder filter.
- Spoel af met leidingwater.
- Drogen voorzichtig boven vlam of met föhn of aan de lucht.
- Beslist niet drogen met filtreerpapier
- Indien het materiaal droog is, dit bekijken onder het microscoop. Eest het materiaal opzoeken met de 10x objectief en beoordelen met de 100x objectief met immersie-olie.
- De kleuring duurt in totaal ongeveer 30 minuten.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Blaarbodem	<ul style="list-style-type: none"> ○ grote kern van epitheelcel welke verkleurd van blauw naar rood (kern 1/5 gezichtsbeeld) (100x obj.) ○ rode uiteengevallen kern met veel vacuolen. 	'ballooncel' -> herpes* verdacht voor herpes infectie
Papuleuze laesie of ulcera	amastigoten (ééncellig organisme zonder zweepdraad) intracellulair in macrofagen (biopt) promastigoten (ééncellig organisme met zweepdraad) extracellulair.	cutanea leishmaniasis
Pustuleuze eruptie (neonatus)	bacteriën	bacteriële aandoening
	Pityrosporum (gisten)	pityrosporon folliculitis
	Candida (gisten)	candidasis
	schimmeldraden	trichophytie
	eosinofiele granulocyten	erythema toxicum neonatorum eosinofiele pustuleuze folliculitis incontinentia pigmenti
	neutrofiële granulocyten	transiente neonatale pustuleuze melanose infantiele acropustulose

*Herpesinfectie:

Een Herpes virus kan men onder de normale microscoop niet zien. Het heeft echter de eigenaardigheid om zich in de kernen van epitheelcellen te nestelen en deze te doen opzwellen. De kernen van de epitheelcellen worden door de Giemsa kleuring blauw gekleurd, echter zodra het Herpes virus zich in de kern nestelt, verandert de kleur van blauw/paars naar rood/roze.

De epitheelcellen met monstrueus gezwollen celkernen (van paars tot roze gekleurd) met vaak verscheidene kernkwabben en een heldere preinucleaire hof worden balloon cells genoemd. Verder heeft het virus de eigenschap om kernen aan te zetten tot delen, waardoor multinucleaire cellen ontstaan. Met de 10x objectief zoeken naar reuzen cellen met een grote ronde kern (balloon cells) of naar multinucleaire cellen. Verifiëren of verder zoeken met de 100x objectief. Een mooie balloon cell is een epitheelcel (vage blauwe rand) met midden in een grote rode ronde kern die bijna zo groot is als 1/5 deel van het gezichtsveld. Wanneer een blaasje al wat ouder is dan 24 à 36 uur ziet men in de kernen vacuolen. Bij een nog ouder blaasje is de blauwe rand verdwenen en gaat de kern 'uiteenvallen'. Men kan deze soms verdacht noemen.

Men moet wel oppassen deze niet te verwarren met monocyten en leukocyten.

Veiligheid:

Kleuringen in flowkast uitvoeren.

Indien de kleurstofbak vol is, deze leeg maken in de speciaal daarvoor bestemde afvalcontainer.

Glaasjes in de biologische afvalcontainer deponeren.

3. Snelle Tzanck-test (Hemacolor®)

De oorspronkelijke kleurtechniek van Tzanck is vanwege de duur (± 30 minuten) minder geschikt voor spreekkamerdiagnostiek. De kleuring met behulp van Hemacolor® is veel sneller.

Indicatie

1. Herpes infectie bij patiënt met verminderde afweer
2. Eczema herpeticum.

Materiaal verzamelen:

Blaasje herpes infectie:

- Materiaal afkomstig van een vers blaasje.
- Blaasje openen, liefst niet ouder dan 36 à 48 uur.
- Schrap met een mesje materiaal van de blaarbodem en strijk dit uit op een objectglaasje en laat dit bij de lucht drogen. (blaarvocht voor kweek gebruiken).

Benodigdheden:

Apparatuur, glaswerk en andere materialen

- Spuitfles
- Kleurbak type coplin PP met schroefdop, 4 stuks (Boom nr. 9.161.386)
- Filterpapier
- Brander of föhn
- Microscoop
- Lenzen 10x en 100x

Reagentia, media en hulpstoffen:

- Hemacolor kleurings set (Merck nr 1.11674)
- Gedestilleerd water 1 liter
- Olie

Handelwijze:

1. Uitstrijk aan de lucht laten drogen.
2. Het glaasje ongeveer 1 seconde in de vloeistof per doping in de volgende volgorde.
3. Bakje 1 met fixeervloeistof (methanol): 5 maal indopen
4. Bakje 2 met Hemacolor 2 (rode kleurreagens): 3 maal indopen
5. Bakje 1 met Hemacolor 3 (blauwe kleurreagens): 3 maal indopen
6. Bakje 1 met bufferoplossing pH 7,2: 5 maal indopen.
7. Eerst overtollige vloeistof aan de zijkant van het glaasje op filterpapier weg laten lopen.
8. Drogen voorzichtig boven vlam of met föhn of aan de lucht
9. Beslist niet drogen met filterpapier
10. Indien het materiaal droog is, dit bekijken onder het microscoop.
11. Eerst het materiaal opzoeken met de 10x objectief.
12. Beoordelen met de 100x objectief en olie.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Blaarbodem	grote kern van epitheelcel welke verkleurd van blauw naar rood (kern 1/5 gezichtsbeeld. (100x obj.) rode uiteengevallen kern met veel vacuolen.	“Ballooncel” -> herpes* verdacht voor herpes infectie

4. Methyleenblauw-kleuring

'Zacht' materiaal (uitstrijkjes pustels, slijmvliezen, flour etc.) worden in de meeste gevallen gekleurd met methyleenblauw en met de 100x objectief beoordeeld op leukocyten, bacteriën (staafjes, gebogen staafjes, kokken in groepen/keten, diplokokken intracellulair etc.) en gisten (pityrosporum species en candida species). Het zachte materiaal kan ook beoordeeld worden met KOH, maar een methyleenblauw-kleuring geeft een mooier beeld.

Indicatie:

- Folliculitis acne vulgaris
 pityrosporum folliculitis
 bacteriële folliculitis
- Plaque mond / tong candidiasis
 bacteriële infectie
- Urethritis bij man gonorrhoe
 niet-specifieke urethritis (o.a. Chlamydia)
- Pustel / blaar bacteriële infectie
 steriele pus
- Fluor candidiasis
 bacteriële vaginosis
 Döderlein

Biologisch materiaal verzamelen en afleveren:

- Urethritis / fluor: dit wordt met een steriele öse afgenomen en op een objectglasje uitgestreken.
- Blaar / pustel: deze met een steriele naald of scalpelmessje (nr. 15) openen en de pus uitstrijken op een objectglasje.
- Uitstrijk mond en tong.

Benodigdheden:

Apparatuur, glaswerk en andere materialen

- Flowkast
- Brander
- Spuitfles
- Kleurbakje met deksel
- Filterpapier
- Microscoop
- Lenzen 10x en 100x

Reagentia, media en hulpstoffen

- Löffler's methyleenblauw oplossing (Merck, 1.01287.0500)
- Kraanwater
- Olie

Uitvoering:

- Het dunne uitgestreken materiaal wordt aan de lucht gedroogd.

- Het glaasje wordt gefixeerd boven een vlammetje (het objectglaasje met materiaal 3x door het vlammetje halen).
- In de flowkast wordt de deksel van de kleurbak verwijderd en het glaasje op het rekje plaats.
- Voorzichtig methyleenblauw op het materiaal laten druppelen (alleen het materiaal moet bedekt zijn, liefst niet het hele glaasje) 20 à 30 seconden kleuren en afspoelen met leidingwater uit de spuitfles. Tussen twee filtreerpapierjes wordt het preparaat droog gemaakt.
- Het preparaat wordt onder de microscoop bekeken, eerst met de 10x objectief om het materiaal op te zoeken en scherp te stellen.
- Vervolgens wordt er een druppeltje olie op het materiaal gedaan en daarna met de 100x objectief beoordeeld.
- NB. Bij gebruik van flesjes met kleurstoffen het etiket altijd omhoog houden i.v.m. kleurstofdruppels die langs het flesje lopen, waardoor je kleurstof aan je handen kan krijgen.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Folliculair gebonden pustel	gebogen staafjes (coryneforme bacteriën)	acne vulgaris
	pityrosporum (gistcellen)	pityrosporum folliculitis
	bacteriën	bacteriële folliculitis* ¹
Plaque mond/tong	Candida	candidiasis
	bacteriën	
Urethra man (Cervix vrouw)	diplokokken intracellulair in groepjes in de leukocyten	positief gonorrhoe ¹
	grote groepen diplokokken extracellulair	verdacht voor gonorrhoe ¹
	leukocyten zonder bacteriën (tenminste 10 leukocyten / gezichtsveld in drie niet aangrenzende gezichtsvelden)	niet-specifieke urethritis
	leukocyten zonder bacteriën (ten minste 5 tot 10 leukocyten / gezichtsveld in drie niet aangrenzende gezichtsvelden)	verdacht voor niet-specifieke urethritis
	leukocyten zonder bacteriën (minder dan 5 leukocyten / gezichtsveld in drie niet aangrenzende gezichtsvelden)	geen niet-specifieke urethritis
Blaarvocht	leukocyten	steriel ¹
	leukocyten met bacteriën	bacteriële infectie* ¹
Fluor	Candida (gisten of pseudohyfen) (kleine gistcellen zonder pseudohyfen)	candidiasis (Candida albicans) ¹ (Candida glabrata) ¹
	bacteriën epitheelcellen met vage celmembraan en vol met fijne bacteriële staafjes (clue-cellen)	bacteriële vaginosis Gardnerella vaginalis
	teveel gram positieve staafjes (Döderlein)	overmatig wasgedrag

*Bacteriële aandoening:	coccen in groepjes waarschijnlijk	→ Stafylococcen aureus
	coccen in ketens	→ Streptococcen
	overige bacteriën	→ geen uitspraak

¹ Ondersteunen met behulp van kweek

Veiligheid:

- Kleuringen in flowkast uitvoeren.
- Indien de kleurstofbak vol is, deze leeg maken in de speciaal daarvoor bestemde afvalcontainer.
- Glasjes in de biologische afvalcontainer deponeren.

5. Gram-kleuring

Inleiding:

Alle coccen zijn gram positief behalve de *Neisseria (n) gonorrhoeae* en de *Neisseria meningococci*. Deze zijn gram negatief. Voor diagnostiek van *N.gonorrhoeae* infectie kan daarom volstaan worden met een methyleenblauw preparaat. (Voor beoordeling van een kolonisatie met staafjes kan alleen een onderscheid gemaakt worden tussen gram positief (blauw) en gram negatief (rood) middels gram kleuring.)

Indicatie:

- Gonorrhoe ter ondersteuning van de methyleenblauw diagnose als het om gram negatief diplococci (*N.gonorrhoeae*) gaat, vooral bij veel mengflora bacteriën.
- Ulcus molle (gram negatieve staafjes)
- Döderlein (gram positieve staafjes) bij overmatig wassen

Biologische materiaal verzamelen en afleveren:

- Urethritis / fluor: dit wordt met een steriele öse afgenomen en zo dun mogelijk op een objectglaasje uitgestreken.
- Blaas / pustel : deze met een steriele naald of scalpelmessje (nr. 15) openen en de pus zo dun mogelijk uitstrijken op een objectglaasje.

Belangrijk: bij verdenking van een Ulcus molle altijd één kant uitstrijken.

Materiaal op objectglaasje in een nierbekken af te leveren in het laboratorium polikliniek huidziekten.

Benodigdheden:

Apparatuur, glaswerk en andere materialen

- Brander
- Spuitfles
- Kleuringsbakje met deksel
- Filterpapier
- Microscoop
- Lenzen 10x en 100x
- Flowkast

Reagentia, media, hulpstoffen

- Methylviolet of carbol-gentiaanviolet oplossing (Fluka, 21830) (oplossing 1)
- Lugol oplossing (apotheek) (oplossing 2)
- Fuchsine N 0,2% stamoplossing (verkrijgbaar apotheek) (oplossing 3).
- 96% ethanol (96% Alcohol)
- 70% ethanol (70% Alcohol)
- Water

Uitvoering:

- Het uitstrijkje op een objectglaasje laten drogen bij de lucht.
- Fixeren boven een vlam.
- Kleuren met methylviolet of carbol-gentiaanviolet (oplossing 1) 30 seconden in de flowkast
- Afspoelen met leidingwater.
- Fixeer de kleuring 30 seconden met lugol (oplossing 2).

- Nu ongeveer 1 minuut ontkleuren met 96% etanol (oranje spuitfles) onder heen en weer bewegen van het glaasje, of indien nodig zolang ontkleuren tot er geen blauwe vloeistof meer afkomt.
- Afspoelen met leidingwater.
- Gedurende 20 à 30 seconden kleuren met fuchsine-oplossing.
- Afspoelen met leidingwater en voorzichtig drogen met filtreerpapier.
- Het preparaat wordt onder de microscoop bekeken, eerst met de 10x objectief om het materiaal op te zoeken en scherp te stellen.
- Vervolgens wordt er een druppeltje olie op het materiaal gedaan en daarna met de 100x objectief beoordeeld.

NB.

1. De kleurstoffen moeten door een trechtertje gegoten worden waarin een filtreerpapierdje aanwezig is.
2. Bij gebruik van flesjes met kleurstoffen het etiket altijd omhoog houden i.v.m. kleurstofdruppels die langs het flesje lopen, waardoor je kleurstof aan je handen kan krijgen.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Urethra man	gram negatieve diplococci intracellulair in groepjes in leucocyten	positief gonorrhoe*
Cervix vrouw	gram negatieve diplococci intracellulair in groepjes in leucocyten	positief gonorrhoe*
Fluor vrouw	teveel gram positieve staafjes (Döderlein)	overmatige wasgedrag
Ulcus genitalia extern / periaanaal	Haemophilus ducreyi (gram negatieve staafjes in visschoolformatie of railroadtracks)	ulcus molle

*Een positieve uitslag van gonorrhoe moet ondersteund worden met een kweek.

Veiligheid:

- Kleuringen in flowkast uitvoeren.
- Indien de kleurstofbak vol is, deze ledigen in de speciaal daarvoor bestemde afvalcontainer
- Glasjes in de biologische afvalcontainer deponeren.

6. Fysiologisch-zout preparaat

Indicatie:

- Fluor: verdenking *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* en *Candidiasis vaginalis*
- Niet op therapie reagerende urethritis bij een man: verdenking trichomoniasis.

Biologisch materiaal verzamelen en afleveren:

Urethritis / fluor: dit wordt met een steriele öse afgenomen en op een objectglaasje uitgestreken en direct een druppel fysiologisch zout en afdekken met dekglasje.

Benodigheden:

Filterpapier
Microscoop
Objectieven 10x en 40x

Handelwijze:

Meteen onder de microscoop bekijken met 100x en 400x vergroting.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Vagina / urethra	bewegende eencellig protozoa met flagellen	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Vagina	epitheelcellen vol met bacteriën en vaag celmembraan (clue cellen)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (bacteriële vaginosis) *
	<i>Candida</i> (gisten of pseudohyfen)	candidiasis (<i>Candida</i> species)

*Bij verdenking *Gardnerella vaginalis* kan eventueel een aminetest uit gevoerd worden

Veiligheid:

Glaasjes in de biologische afvalcontainer deponeren.

7. Plakband-preparaat

Inleiding:

Met name kinderen kunnen veel hinder ondervinden van een infectie. *Enterobius vermicularis* infecties worden vaak geclusterd gevonden in gezinnen, kleuterscholen en crèches. Na behandeling zal een kind daarom vaak snel een herinfectie oplopen als niet zijn directe omgeving wordt mee behandeld.

Indicatie:

- Pruritus ani
- Peri-anale jeuk e.c.i..
- Wormpjes (*Enterobius vermicularis* of aarsmaden) gezien rond de anus, op perineum of op de ontlasting.

Biologisch materiaal verzamelen en afleveren:

- Met behulp van stukjes transparante plakband (cellotape) materiaal van perianale regio verzamelen. Er moet geen gerasterd 'Scotch tape' doch geheel helder, doorzichtig plakband (cellotape) gebruikt worden. De arts drukt een stuk doorzichtig plakband met de plakzijde op verschillende plaatsen tegen de perianale huid. Vervolgens wordt het plakband op een objectglas geplakt.
- Parasitologische faeces onderzoek op oxyuren is onbetrouwbaar.

Benodigheden:

Apparatuur, glaswerk en andere materialen:

Microscoop
Objectief 10x en 40x

Uitvoering

- Het materiaal beoordelen op oxyuren met behulp van het microscoop.
- Met 100x vergroting screenen en met de 400x vergroting veriferen.
- Opmerking: Bij negatieve uitslag kan een herhaling van het onderzoek gewenst zijn.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Anus	Oxyuren (eieren van <i>Enterobius vermicularis</i> (aarsmaden)	<i>Enterobius vermicularis</i> (aarsmaden)

8. Donkerveld-preparaat

Verdenking lues

- ulcus genitaal of perianaal (oraal niet specifiek, wegen mond spirocheten. _commensaal)
- exantheem
- condylomata lata

Biologisch materiaal verzamelen en afleveren

Afname prikkelserum van ulcus:

- Ulcus goed schoonmaken met een in fysiologisch zout doordrenkt gaasje enkele malen hard over de bodem te wrijven. Daarna met öse de bodem uitkrabben en dit op een objectglaasje met een druppel fysiologisch zout uit te strijken, waarna een dekglasje over de druppel wordt gebracht.
- Op deze manier worden er drie onafhankelijke glaasjes gemaakt en deze worden direct bekeken.
- Indien het preparaat negatief is maar klinisch er een sterke verdenking is, dan kan er op 2 daaropvolgende dagen een nieuw preparaat gemaakt worden.
- NB. Aan te raden is, vooraf aan het maken van een donkerveld preparaat (prikkelserum + fysiologisch zout), mits er aanwijzingen zijn, eerst een preparaat te maken voor onderzoek op *Haemophilus ducreyi* (ulcus molle). Bij het maken van dit preparaat wordt het materiaal één kant op uitgestreken en gramkleuring toegepast.

Benodigdheden

Apparatuur, glaswerk en andere materialen:

- Microscoop
- Donkerveld condensor DCD 0,92-0,8
- Objectief 10x en 40x
- Handschoenen
- Tissue

Oplossingen:

- 70% Ethanol

Uitvoering

Instellen microscoop voor donkerveld:

- Voor het aanbrengen van de donkerveld condensor, de objectief hoogte afstellen met een "gewoon" preparaat en het objectief 10 x .
- Condensor naar beneden draaien, het kleine schroefje rechts, losdraaien en condensor eruit schuiven (trekken). De droge donkerveld condensor (in de lade van de microscooptafel) erin schuiven en weer vastdraaien met het kleine schroefje rechts (achter de grote schroef).
- Het te onderzoeken preparaat op de kruistafel leggen en de condensor omhoog draaien tot er beeld verschijnt.
- 40x objectief instellen en met microschoef beeld scherp stellen.
- Veel licht geven en met de condensorschroef het juiste contrast afstelling instellen.

Bekijken preparaat:

- De preparaten (3 à 4) afzoeken gedurende ± 25 minuten naar spirochetes met 8 a 12 fijne windingen die een kurkentrekkerachtige beweging maken.
- Bij een vers ulcus zie je ze ook nog een knikkende beweging maken (deling).
- Instellen microscoop voor lichtmicroscopie:

Herstellen oorspronkelijke instelling van lichtmicroscoop

- de "gewone" condensor terug plaatsen.
- Een preparaat op de kruistafel leggen en de condensor geheel omhoog draaien.
- Het diafragma van de lamphouder dichtdraaien tot een kleine lichtcirkel aanwezig is. De rand van de cirkel moet scherp zijn, dit is te krijgen door de condensor hoger of lager te draaien.
- Het diafragma van de lamphouder weer geheel opendraaien en de lichtmicroscoop is weer goed afgesteld.

Interpretatie:

Preparaat van:	Microscopisch beeld:	Kan passen bij:
Ulcus, exantheem, condylomata lata	Treponema pallidum, spirochetes met 8 a 12 fijne windingen die een kurkentrekkerachtige beweging maken en knikkende beweging.	Lues*

*Ondersteunen met serologie (Bij spoed overleggen met bacterioloog)

Veiligheid

Glaasjes in de biologische afvalcontainer deponeren. Tevens microscoop en tafel schoonmaken met 70% ethanol.

7. Handleiding lichtmicroscopie



Onderdelen microscoop

- Oculairen (1): onderdeel van het lenzensysteem waardoor je kijkt. Het vergroot meestal 10 x en heeft een instelbare dioptriering.
- Objectief (2): onderdeel van het lenzensysteem, waardoor het preparaat verder wordt vergroot. Er zijn meerdere objectieven: zoals 4x, 10x, 20x, 40x, 60x en 100x (dit is het olie objectief).
- Revolver (2): houder voor de verschillende objectieven.
- Condensor (4): concentreert het licht van de lichtbron.
- Condensordiafragma: regelt het contrast (de resolutie) van de microscoop.
- Kruistafel (3): Dit is de preparaathouder. Met de knop(7) kan het preparaat van links naar recht en van voren naar achteren verschoven en doorzocht worden.

Instellen lichtmicroscoop vooraf aan gebruik (kan verschillen per microscoop)

Zet de microscoop aan (11). Met de knop (12) aan de zijkant kan de licht intensiteit geregeld worden. Schuif met de oculairen (1) zover uit elkaar dat je met beide ogen één beeld ziet. Met de dioptrie ring kan je de brilsterkte instellen. Normaal staat deze op nul. (Bij sommige microscopen is dit het getal welke tussen de oculairen wordt weergegeven.)

Leg een willekeurig preparaat op de kruistafel (3) en draai het 10x objectief voor. Stel het preparaat scherp met de macrometerschroef (9) en de micrometerschroef (8).

Hierna het preparaat weghalen.

Het lichtvelddiafragma (6) wordt dicht gedraaid.

Stel met de condensorknop (10) de condensor hoogte zo in dat er een scherpbegrensde heldere (12-hoekige) ring wordt gezien. Vervolgens wordt het lichtvelddiafragma (6) weer geheel open gedraaid. Het te onderzoeken preparaat wordt nu op de kruistafel (3) gelegd.

Beoordeling preparaten

KOH-preparaten

Het condensordiafragma (5) wordt dichtgedraaid om contrast te verkrijgen. Het materiaal wordt opgezocht met het 4x objectief. Met de macrometerschroef (9) wordt het materiaal scherp gesteld. De fijne-instelling gebeurt met de micrometerschroef (8). Daarna wordt het te beoordelen materiaal eerst met het 10x objectief bekeken. Met het 40x objectief wordt het materiaal nog eens nauwkeurig beoordeeld. Bij het 40x objectief kan het condensordiafragma (5) iets opengedraaid worden.

Gekleurde preparaten

Bij gekleurde preparaten zoals methyleenblauw, giemsa en gram wordt het condensordiafragma (5) opengedraaid. Eventueel de lichtsterkte met de daarvoor bestemde knop (12) iets dempen. Het materiaal wordt opgezocht met het 4x objectief. Met de macrometerschroef (9) wordt het materiaal scherp gesteld. De fijne-instelling gebeurt met de micrometerschroef (8). Daarna wordt er op het materiaal een druppel olie aangebracht. Waarna het olieobjectief (100x) voor gedraaid wordt en de lichtintensiteit wordt met de daarvoor bestemde knop (12) maximaal gezet.

Verwijzingen:

1. Dekker S.K., Hogewoning A.A., Haan M. de, Staats C.C.G. Atlas dermatomycosen, Diagnostiek en behandeling, 1998.
2. Lavrijsen A.P.M., Raaij-Helmer E.M.H. van der, Bergman W., Brouwer A., Douw van der Krab P.F. Microscopie van directe preparaten voor de dermatologische praktijk, 2004.
3. Hart T., Shears P. Color atlas of medical microbiology, 2004.
4. Voorst Vader P.C. van, Meijden W.I. van der, Cairo I., Thio H.B., Burger C.W., Bleker O.P., Merkus J.M.W.M., Mourits M.J.E., van Doornum G.J.J., Ossewaarde J.M. Curatie van seksueel overdraagbare aandoeningen, SOA, diagnostiek en therapie richtlijnen, 1998
5. Folkers E., Oranje A.P., Een snelle diagnostische test (Tzanck-test) ter uitsluiting van herpesvirusinfecties bij blaasjes, blaren en pustels. Ned Tijdschr Gesneesk 1985: 129: nr 6 241-243
6. Diagnostiek en behandeling van seksueel overdraagbare aandoeningen (SOA). Richtlijn NVDV vs 2008-2009