

- 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 malariaparasieten in het bloed van een patiënt dient het hoofd van het laboratorium dit te melden aan de lokale GGD.

Kwaliteitsborging inclusief nascholing

- Er dient actief deelgenomen te worden aan externe kwaliteitsborging van bijvoorbeeld de NVP/SPLD.
- 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, bijvoorbeeld door gebruik te maken van daartoe geboden gelegenheden van de NVP/SPLD. De praktische uitwerking hiervan dient voor iedere medewerker te worden vastgelegd in een beschrijving van de kwalificaties voor het personeel.
- Literatuur betreffende laboratoriumdiagnostiek dient aanwezig zijn op het laboratorium, bijvoorbeeld:

Polderman AM & AC Rijpstra (red.), Medische Parasitologie, 2e druk: Bohn, Scheltema & Holkema; Utrecht/Antwerpen; 1993, en gekleurd plaatwerk, bijvoorbeeld: WHO Bench Charts voor Malaria. WHO, Genève, Zwitserland, ISBN 92 4 154232 2, apart verkrijgbaar of in Basic Malaria Microscopy 1, Learners's Guide. WHO, Genève, Zwitserland, 1991, ISBN 92 4 154430 9. Daarnaast dient men ook de beschikking te hebben over een recent handboek over Tropengeneeskunde.

Referentiecentra

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

- Amsterdam: Academisch Medisch Centrum, Afdeling Klinische Microbiologie. Contactpersoon: Dr T. van Gool. Tel. 020-5665719/1020-5665728, sein 65728
- Bilthoven: RIVM-LIS. Contactpersoon: Drs L.M. Kortbeek. Tel. 030-2749111, sein 040 of 030-2742372
- Leiden: Leids Universitair Medisch Centrum, Laboratorium voor Parasitologie. Contactpersoon: Dr A.M. Polderman. Tel. 071-5276845/5276846
- Rotterdam: Erasmus Medisch Centrum Rotterdam, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten. Contactpersoon: Dr J.F. Sluiter. Tel. 010-4633874/4635270 of 010-4639222, zoemer 3874
- Nijmegen: Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Afd. Medische Microbiologie. Contactpersonen: Dr P.J.A. Beckers, Dr R.W. Sauerwein. Tel. 024-3614449/3614356, sein 1005 of 1911.

Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 46-51

Amoebiasis: de consequenties van een taxonomische vergissing

A.M. POLDERMAN en J.J. VERWEIJ

Amoebiasis wordt veroorzaakt door *Entamoeba histolytica*, maar niet alle "karakteristieke" 10-15 µm grote cysten met vier kernen die in ontlasting worden aangetroffen behoren toe aan deze soort. Recent onderzoek leert dat in de gematigde klimaatgebieden ca 90% van deze cysten worden uitgescheiden door de niet invasieve en dus apathogene *Entamoeba dispar*. Met behulp van immunologisch, iso-enzym- en moleculair onderzoek is het thans mogelijk onderscheid te maken tussen infecties met beide eencelligen. Het differentiëren op basis van verschillen in copro-anti-

genen met behulp van monoclonale antistoffen is voornamelijk weinig bevredigend, hoewel een kit voor dit doel ook in Nederland commercieel verkrijgbaar is. Onderscheid op basis van verschillen in iso-enzym patronen is mogelijk, maar alleen na kweek van de parasiet. Deze procedure is omslachtig, langdurig en levert vaak geen bruikbaar resultaat.

Differentiatie met behulp van een PCR op ongefixeerde feces blijkt een betrouwbaar hulpmiddel. Een juiste karakterisering van de gevonden cystensoort kan veel overbodige, therapie met contactamoebiciden voorkomen.

Laboratorium voor Parasitologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Trefwoorden: Amoebiasis; *Entamoeba histolytica*; *Entamoeba dispar*; PCR; copro-antigenen

Correspondentie: Dr A.M. Polderman, Laboratorium voor Parasitologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Postbus 9605, 2300 RC Leiden.

Zoals het was

In alle overzichten van de WHO en in de leerboeken

tropische geneeskunde zijn de bekende gegevens terug te vinden: amoebiasis als klinische entiteit wordt veroorzaakt door de protozo *Entamoeba histolytica*. Naar schatting 500 miljoen mensen zijn ermee geïnfecteerd en het aantal doden ten gevolge van de infectie bedraagt vermoedelijk ongeveer 100.000 per jaar (1). Het is evenzeer reeds lang bekend dat niet alle stammen even pathogeen zijn en dat we ook in Nederland bij een enkel procent van de bevolking cysten van *Entamoeba histolytica* vinden kunnen maar dat deze stammen nooit invasief lijken te worden. Deze stand van zaken had een aantal belangrijke consequenties voor ons klinisch begrip, voor de diagnostiek en voor de behandeling van patiënten en dragers:

- Sommige, maar lang niet alle patiënten bij wie de karakteristieke vierkernige cysten van *E. histolytica* worden gevonden, zouden op een moeilijk voorspelbaar moment een klinische amoebiasis ontwikkelen. Dit kan een amoebendysenterie zijn, een zich vaak fulminant ontwikkelend amoebenabces, een "chronische" amoebiasis, of een niet eenvoudig met zekerheid te diagnosticeren amoebioom.
- Hoewel Nederlandse stammen nooit invasief lijken te worden en exotische stammen wel, was het op basis van anamnestiche gegevens meestal niet mogelijk te bepalen of een patiënt een tropische dan wel een Nederlandse stam herbergt. Er wordt zoveel gereisd dat tropische stammen steeds weer worden gevonden, ook bij mensen die zelf nooit in de tropen waren. Kleine epidemische verspreidingen rondom patiënten of dragers die wel in de tropen waren worden regelmatig gezien rondom reizigers, adoptiekinderen, schoonmakers in de havens, rondom prostituées uit zuidoost Azië, etc..
- Het was daarom een goede gewoonte geworden om er bij patiënten bij wie de vierkernige cysten worden gevonden vanuit te gaan dat er sprake is van (potentieel) invasieve stammen, tenzij het tegendeel aannemelijk kan worden gemaakt. Alleen bij gesloten afdelingen van psychiatrische ziekenhuizen blijken de cysten vaak onuitroeibaar, terwijl er weinig aanleiding is om te vrezen voor tropische, invasieve stammen. Daar zien we dus meestal af van behandeling; overigens wordt in de regel wel besloten tot therapie met amoebicide middelen.
- Omdat het weefselamoebicide metronidazol de lumenale minutastadia onvoldoende effectief doodt en de nodige bijwerkingen te zien geeft, wordt bij "asymptomatische cystenuitscheiders" uitsluitend een lumaal amoebicide gegeven: Furamide of Clioquinol. Deze middelen bereiken in de weefsels verblijvende vegetatieve stadia niet, maar we gaan er vanuit dat deze stadia bij een asymptotische cystenuitscheider niet voorkomen.
- We weten dat de effectiviteit van de lumenale amoebiciden niet heel hoog is (voor Furamide rond 85%; voor Clioquinol zijn geen gegevens beschikbaar), maar omdat we te maken hebben met asymptotische dragers nemen we die gebrekkige werking voor lief.

"Nieuwe inzichten" en het ontstaan daarvan

Al in het begin van de eeuw vormden de moeilijk te verklaren verschillen in invasief vermogen van de amoebenstammen die bij verschillende patiënten werden geïsoleerd, de aanleiding voor meningsverschillen en polemieken.

De Fransman Brumpt was de belangrijkste vertegenwoordiger van de school die volhield dat er in feite sprake is van twee geheel verschillende amoebensoorten, die slechts toevallig niet te onderscheiden cysten produceren (2). Alle gevallen waarin sprake was van een klinische amoebiasis achtte hij veroorzaakt door de *Entamoeba dysenteriae*. Gevallen waar slechts cysten werden gevonden zouden veelal zijn veroorzaakt door de niet invasieve soort *Entamoeba dispar*. Het onderscheid was echter niet eenvoudig te maken, want de invasieve *E. histolytica* kon zich ook volgens Brumpt geruime tijd als commensaal gedragen. Infectie van katten met uit humane feces verkregen cysten leverde het bewijs: kreeg de kat een heftige en vaak fataal verlopende diarree dan was er sprake van *Entamoeba dysenteriae*. Bleef de kat zonder symptomen, dan hadden we te maken met *E. dispar*. Het behoeft geen betoog dat deze techniek niet alleen onpraktisch was, zij leverde evenmin een sluitend bewijs voor het bestaan van twee verschillende soorten.

Dobell daarentegen, en met hem de meeste Angelsaksische en ook overige Europese onderzoekers, waren van mening dat er geen sprake was van verschillende soorten, doch dat een fluidum van lokale stammen en voorts een scala aan omgevingsfactoren, voedings toestanden en hormonale en afweerfactoren gezamenlijk bepalend waren voor de klinische expressie van de infectie met *Entamoeba histolytica* (3). De veronderstelling was dat de meeste stammen op enigerlei moment, ook jaren na infectie, alsnog invasief konden worden. De school van Dobell c.s. heeft gedurende vele jaren het beeld bepaald.

Twee soorten

In de jaren zeventig toonden o.a. Sargeant en medewerkers aan dat het mogelijk was invasieve en niet invasieve stammen van *E. histolytica* te groeperen op grond van het electroforesegedrag van bepaalde enzymen (4,5,6). Met name de isoenzym patronen van hexokinase en fosfoglucomutase werden beschouwd als gouden standaarden voor het onderscheid in pathogene en niet pathogene zymodemen. Een zekere controversie bleef nog enige jaren bestaan, door een aantal publicaties betreffende het overgaan van stammen, meestal in een proces van axenisatie, van een niet invasief naar een invasief zymodeem (7,8).

In de jaren tachtig en negentig werd het steeds duidelijker dat het genetisch verschil tussen de invasieve en niet invasieve zymodemen zeer groot was (9). Dit leidde tot de herbeschrijving van de soort *E. histolytica* in 1993 door Clark & Diamond (10). Uiteindelijk, in 1997, tijdens een WHO/PAHO/UNESCO-bijeenkomst in Mexico, werd overeengekomen dat er voldoende biochemisch, immunologisch en genetisch bewijs voorhanden is om het bestaan van twee soorten te bevestigen (11). Ze zijn benoemd als *Entamoeba histolytica* en *Entamoeba dispar*.

Deze twee soorten worden gekarakteriseerd doordat:

- ze in biochemisch, immunologisch en genetisch opzicht van elkaar verschillen
- hun cysten echter morfologisch niet van elkaar zijn te onderscheiden
- de aanwezigheid van trofozoieten met gefagocyteerde erythrocyten samengaat met de aanwezigheid van *E. histolytica* s.s.
- er bij symptomatische patiënten vaak sprake is van een hoge antistoftiter
- de aanwezigheid van *E. dispar* niet is geassocieerd met klachten; deze soort is niet invasief.

Tijdens de bijeenkomst in Mexico werden de volgende aanbevelingen gegeven:

- Bij een beslissing over behandeling is een soortspecifieke diagnose nodig.
- Wanneer alleen *E. dispar* wordt aangetoond, is behandeling overbodig. Er moet worden gezocht naar andere oorzaken voor de intestinale klachten.
- Het is niet aangewezen asymptomatische personen te behandelen op basis van de aanwezigheid van cysten van *E. histolytica/E. dispar* alleen, tenzij er reden is infectie met de pathogene *E. histolytica* te vermoeden (b.v. hoge antistoftiter, nauw contact met een patiënt met invasieve amoebiasis).
- Wanneer cysten van *E. histolytica/E. dispar* worden gevonden in symptomatische patiënten, mag niet voetstoots worden aangenomen dat *E. histolytica* de veroorzaker van de klachten is. Andere potentiële oorzaken worden te gemakkelijk over het hoofd gezien (12,13,14).

Het onderscheid in het laboratorium

Zolang de laboratoriumdiagnose "*Entamoeba histolytica*" wordt gesteld door het aantonen van de invasieve grote vegetatieve stadia, zijn er weinig mogelijkheden tot verwarring. De grote vegetatieve stadia zijn, in verse ontlasting, karakteristiek beweeglijk. Ze zijn voorts groter dan de vegetatieve amoeben van andere soorten en bovenal: gefagocyteerde erythrocyten zijn althans in sommige amoeben, herkenbaar en pathognomonisch. In veel gebieden met een minder ontwikkelde gezondheidszorg is de transmissie van amoebeninfecties intens en het is een begrijpelijke gewoonte zich in de diagnostiek te richten op detectie van de invasieve grote vegetatieve amoeben. Detectie van de cysten heeft weinig prioriteit voor de individuele patiënt en is met name van belang wanneer men een vermindering van de transmissie ambieert. Het kan onder dit soort omstandigheden echter van een grote realiteitszin getuigen om deze ambitie niet te hebben. In dergelijke situaties in de tropen is er dus geen sprake van een probleem om infecties met *E. histolytica* te onderscheiden van die met *E. dispar*.

De laboratoriumdiagnose "amoebiasis" in Nederland, daarentegen, is in het algemeen gebaseerd op het hebben aangetoond van cysten. In deze situaties doet de vraag of we te maken hebben met *E. histolytica* dan wel met *E. dispar*, zich wèl voor. Hoe vaak komen we de beide soorten tegen? Hoe kunnen we de differentiaaldiagnose stellen? En wat zijn de therapeutische consequenties?

Microscopisch is het dus niet mogelijk om de cysten der beide soorten van elkaar te onderscheiden. De differentiaaldiagnostiek is gebaseerd op biochemische, immunologische en genetische verschillen.

- De invasieve en niet invasieve soort worden onderscheiden met behulp van iso-enzymelectroforese. Het probleem van deze methode is dat ze bewerkelijk is en dat zij alleen kan worden uitgevoerd op in kweek gebrachte amoeben. Aangezien het bij niet meer dan ca 70% van de cystenuitscheiders lukt de amoeben te kweken, mislukt de differentiatie vaak en ontstaat een weinig representatief beeld.
- Immunologische verschillen kunnen zichtbaar worden gemaakt met behulp van gelabelde specifieke monoclonale antistoffen, waarmee coproantigenen in een ELISA-systeem worden aangetoond, zoals dat ook met de EIA's voor *Giardia* geschiedt. Over onze ervaringen met de commercieel verkrijgbare antigeentesten voor dit doel rapporteren wij in het navolgende.
- De verschillen in DNA-structuur, tenslotte, maken het mogelijk soortspecifieke PCR te gebruiken. Primers op verschillende targets worden voor dit doel gebruikt. Ook over onze ervaringen met deze PCR's rapporteren we hieronder.

PCR voor *E. histolytica* en *E. dispar*

Zoals gezegd zijn er in de DNA-structuur van *E. histolytica* en *E. dispar* grote verschillen in diverse genen. Gebruik makend van deze verschillen werden de afgelopen jaren diverse moleculaire technieken ontwikkeld, zoals RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism), RAPD (Random Amplified Polymorfism Detection) en soortspecifieke PCR's (15,16).

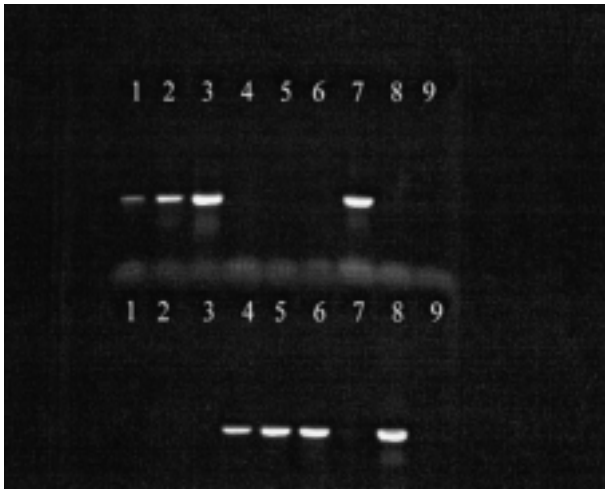
Op het Laboratorium voor Parasitologie in Leiden deden wij ervaring op met soortspecifieke PCR's gebaseerd op drie verschillende targets:

- een 145 bp en een 133 bp repetitive region van episomaal DNA van respectievelijk *E. histolytica* en *E. dispar* (17)
- een 876 bp fragment van het small subunit rDNA (15)
- een 100 bp en een 101 bp fragment van respectievelijk *E. histolytica* en *E. dispar* in het gen coderend voor het 30 kDa antigeen (18)

Wij gebruiken de eerstgenoemde target in een PCR-SHELA (PCR-SHELA: PCR-Soluble Hybridization Enzyme Linked Assay), waarbij het PCR-product d.m.v. hybridisatie met een specifieke probe in een ELISA-systeem wordt aangetoond (16). Dit geeft dus een verhoging van zowel specificiteit als sensitiviteit. In onze ervaring is met deze techniek vooral de gevoeligheid voor het aantonen van *Entamoeba*-DNA in feces beduidend hoger dan met de andere PCR's, waarbij de detectie van het PCR-product op een agarosegel met ethidiumbromide plaatsvindt, zie figuur 1.

Resultaten met PCR-SHELA

In een periode van ongeveer 18 maanden ontvingen wij van verschillende laboratoria in Nederland feces



Figuur 1. Het aantonen van Entamoeba-DNA in faeces op agarose 1,2 % gekleurd met Ethidiumbromide. Boven: *E. histolytica*; onder: *E. dispar*, specifieke PCR op het rDNA (Clark and Diamond). Laan 1-6: DNA geïsoleerd van microscopisch positieve feces. Laan 7: *E. histolytica* positieve controle, laan 8: *E. Dispar* positieve controle, laan 9 negatieve controle.

met een microscopische en/of een klinische verdenking voor een infectie met *E. histolytica*/*E. dispar*. In totaal werden in deze periode 595 fecesmonsters onderzocht. Bij de meeste monsters werden door het inzendende laboratorium bij microscopisch onderzoek *E. histolytica*/*E. dispar*-cysten gevonden. Andere monsters werden ingezonden omdat er sprake was van een "klinische amoebiasis", of omdat er in een vers fecespreparaat vegetatieve amoeben werden gezien, of omdat een patiënt gevolgd werd na een al dan niet succesvolle therapie.

In 387 faecesmonsters vonden ook wij, bij microscopisch onderzoek van een Ridley-concentraat cysten van *E. histolytica*/*E. dispar*. De PCR-SHELA voor resp. *E. dispar* en voor *E. histolytica* laat zien dat er in 89% van deze monsters sprake is van *E. dispar* en in slechts 11% van *E. histolytica* (zie tabel 1). In twee monsters werd in geen van beide PCR's een signaal gevonden. Is hier sprake van een te geringe gevoeligheid van de PCR's? Dit is mogelijk, maar waarschijnlijker is dat de gevonden cysten afkomstig zijn van weer andere amoeben. Ook de cysten van bijvoorbeeld *Entamoeba moshkovskii* zijn niet van die van *E. dispar* en *E. histolytica* te onderscheiden.

Tabel 1 laat tevens zien dat veel monsters werden ingestuurd waarin bij nader onderzoek op ons laboratorium geen cysten konden worden teruggevonden (n=208). Het gaat om enkele monsters van patiënten bij wie grote vegetatieve stadia werden gezien, die niet kunnen worden teruggevonden in het Ridley-sediment. Ook werd een aantal patiënten ingesloten bij wie een klinische verdenking bestond terwijl geen cysten konden worden gevonden. Bij meer dan de helft van deze PCR-negatieve patiënten echter, had op het inzendende laboratorium onzekerheid bestaan over de identiteit van de gevonden cysten. Regelmatig vroeg de inzender zich af of naast grote aantallen *E. hartmanni* wellicht toch ook kleine aantallen *E. histolytica* aanwezig waren. Vaak ook was er sprake van twijfel bij het vinden van (kleine aantallen) an-

Tabel 1. Resultaten van de PCR-SHELA in vergelijking met microscopie

	PCR direct op faeces			totaal
	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i>	beide negatief	
Cysten positief	346	39	2	387
Cysten negatief	21	11	176	208
Totaal	367	50	178	595

Tabel 2A. Resultaten van de Mab-ELISA's (Cell Labs) in vergelijking met de PCR-SHELA

PCR	Mab (<i>E. dispar</i> / <i>E. histolytica</i>)		Totaal
	Pos	Neg	
<i>E. dispar</i>	64 (74%)	23 (26%)	87
<i>E. histolytica</i>	10 (91%)	1 (9%)	11

Tabel 2B. Resultaten van de Mab-ELISA's (Cell Labs) in vergelijking met de PCR-SHELA

PCR	Mab (<i>E. histolytica</i>) ELISA		Totaal
	Pos	Neg	
<i>E. dispar</i>	0 (0%)	87 (100%)	87
<i>E. histolytica</i>	7 (64%)	4 (36%)	11

dere cysten, zoals die van *Iodamoeba butschlii*. Een ieder die microscopisch onderzoek naar cysten verricht, weet dat dergelijke twijfel eigen is aan het uitvoeren van het vak!

Immunologische detectie specifieke copro-antigenen

Sinds enige tijd zijn antigeentesten commercieel verkrijgbaar voor de detectie van antigenen van niet alleen het *E. histolytica*/*E. dispar*-complex, maar ook voor de detectie van *E. histolytica*-specifieke antigenen in fecesmonsters. De soortspecifieke diagnose zou, met behulp van dergelijke monoclonalen, beduidend eenvoudiger plaats kunnen vinden dan via PCR-procedures. De testen zijn echter, hoewel commercieel verkrijgbaar, nog slecht geëvalueerd. Hacque en medewerkers claimen een goede gevoeligheid en specificiteit (21-23). Anderen daarentegen, en ook wijzelf, deden minder goede ervaringen op met deze testkits (24-26). Andere literatuurgegevens zijn ons niet bekend. De tabellen 2a en 2b geven de resultaten verkregen met de Cell Labs kit, de tabellen 3a en 3b die voor de Techlabs-kit. Uit een pool van 98 *E. histolytica*/*E. dispar*-cystenuitscheiders worden door de Cell Labs-kit slechts 7 van de 11 in PCR-onderzoek bevestigde *E. histolytica*-uitscheiders herkend. De Techlabs-kit bleek zeker niet gevoeliger (tabel 3). Wellicht wordt de ongevoeligheid, althans ten dele, verklaard doordat ingevroren fecesmonsters werden onderzocht in plaats van verse. Preliminaire vergelijkend onderzoek aan verse en ingevroren monsters ondersteunt een dergelijke veronderstelling vooralsnog echter niet.

Tabel 3A. Resultaten van de Mab-ELISA's (Techlab) in vergelijking met de PCR-SHELA

PCR	Mab (<i>E. dispar</i> / <i>E. histolytica</i>)		Totaal
	Pos	Neg	
<i>E. dispar</i>	19 (73%)	7 (37%)	26
<i>E. histolytica</i>	20 (100%)	0 (0%)	20

Tabel 3B. Resultaten van de ELISA's (Techlabs) in vergelijking met de PCR-SHELA

PCR	Mab (<i>E. histolytica</i>)		Totaal
	Pos	Neg	
<i>E. dispar</i>	0 (0%)	26 (100%)	26
<i>E. histolytica</i>	6/8 (30/40%)	14/12 (70/60%)	20

Serologie

Serologisch onderzoek wordt algemeen erkend als een betrouwbaar diagnostisch hulpmiddel bij het stellen van de diagnose "weefselamoebiasis" (27). Bij darmamoebiasis daarentegen, wordt in slechts een kleine minderheid van de infecties een verhoogde concentratie specifieke antistoffen gevonden. Nu we eenmaal weten dat in het grootste deel van de personen die de karakteristieke vierkernige cysten uitscheiden, er in feite sprake is van infectie met de niet-invasieve *E. dispar*, is het seronegatief blijven van zoveel cystenuitscheiders niet verwonderlijk.

Het blijkt helaas niet eenvoudig om de gevoeligheid van de klassieke, op ongezuiverde *E. histolytica*-antigenen gebaseerde, serologische testen in het onderscheiden van *E. dispar*- resp. asymptomatische *E. histolytica*-cystenuitscheiders te toetsen. Bij asymptomatische cystenuitscheiders wordt immers normaliter geen serum afgenomen, omdat bekend is dat serologisch onderzoek in deze gevallen weinig bijdraagt. Bovendien blijkt het aantal asymptomatische dragers van de potentieel invasieve *E. histolytica* zeer beperkt. Niettemin, van de zeven asymptomatische *E. histolytica*-cystenuitscheiders (PCR-bevestigd) bij wie wij ook een ELISA verrichtten, waren er twee serologisch negatief, terwijl bij twee anderen een titer van 1:40 (d.i. gelijk aan de door ons gehanteerde grenswaarde) werd gevonden. Bij de 15 klinische amoebiasispatiënten daarentegen die we in dezelfde periode zowel met PCR als serologisch onderzochten (8 maal een intestinaal beeld, 7 maal een leverabces), was de ELISA in alle gevallen positief. Van de 21 *E. dispar* patiënten die we in dezelfde tijd eveneens serologisch onderzochten waren er drie serologisch positief (twee van hen hadden echter vroeger een klinisch bewezen *E. histolytica* infectie doorgemaakt!). Deze nog weinig complete, preliminaire gegevens bevestigen dat hoge titers worden gevonden bij invasieve *E. histolytica*-infecties. Het wordt echter eveneens duidelijk dat bij asymptomatische cystenuitscheiders serologisch onderzoek onvoldoende discriminerend is om de beide *Entamoeba*-soorten te onderscheiden.

Beschouwing en besluit

De PCR-SHELA voor de soortspecifieke identificatie van *Entamoeba histolytica* en *Entamoeba dispar* blijkt een reproduceerbare methode, die leidt tot de identificatie van de amoebensoort. Deze identificatie komt steeds overeen met die welke wordt verkregen met behulp van de erkende classificatie op basis van verschillen in iso-enzymen. De PCR heeft als voordeel dat de determinatie niet afhankelijk is van het al dan niet in kweek kunnen krijgen van de amoebenstam en dat de bepaling doordat zij niet afhangt van kweken, binnen een dag kan worden verricht. De gevoeligheid voor het herkennen van een infectie is niet minder dan die van microscopisch onderzoek. De ervaring leert voorts dat de specificiteit van microscopisch onderzoek naar cysten verre van 100% is en dat zich met name bij menginfecties, regelmatig de vraag voordoet om een vermoede diagnose (bijvoorbeeld: bevat een fecesmonsters naast veel *E. coli* of *E. hartmanni*-cysten ook (kleine aantallen) cysten van *E. histolytica*?) met andere methoden te bevestigen.

De vraag lijkt, kortom, niet zozeer of de ware identiteit van bij microscopisch onderzoek gevonden vierkernige cysten met behulp van PCR kan worden bepaald, maar meer of dit wel nodig is. Kunnen we het ons permitteren om dat niet te doen?

Een eenduidig antwoord hierop kan natuurlijk niet worden gegeven. De volgende observaties zullen een rol spelen bij het formuleren van zo'n antwoord:

- In ca 90% van de diagnoses *E. histolytica*/*E. dispar* hebben we, in Nederland, te maken met infectie met de niet invasieve *E. dispar*. Wanneer we ons beperken tot de gevallen van cystenuitscheiding door asymptomatische dragers ligt de verhouding nog veel schever.
- Behandeling van asymptomatische cystenuitscheiders wordt niet nodig geacht en is, wanneer geen soortdeterminatie plaats vindt, in meer dan 90% van de gevallen in feite overbodig.
- De bijwerkingen van de lumbinale amoebicide-middelen zijn gering en de kosten van specifiek PCR-onderzoek niet verwaarloosbaar. Het is dus zeker reëel te overwegen pragmatisch te zijn en zonder uitvoerige diagnostiek cystenuitscheiders gewoon te behandelen.
- Anderzijds is een niet onaanzienlijk gedeelte van de met lumbinale amoebiciden behandelde patiënten na behandeling niet parasietvrij. Het is niet duidelijk of beide soorten gelijkelijk gevoelig zijn voor Furamide of Clioquinol, of dat het met name de potentieel invasieve *E. histolytica* is die overleeft. Het feit dat bij een gedeelte van de asymptomatische *E. histolytica*-cystenuitscheiders verhoogde antistoftiters worden gevonden doet vermoeden dat in die gevallen toch een zekere weefselinvasie plaats vindt en derhalve juist bij hen parasieten in de weefsels aan de werking van de zuiver lumbinale middelen ontsnappen.

Een eenduidig antwoord ten aanzien van het te voeren beleid kan op dit moment niet worden gegeven. Het is duidelijk dat zowel de weergave als de interpretatie van de uitslag van microscopisch onderzoek:

"cysten van *E. histolytica* gevonden" herziening behoeven. De uitslag behoort thans te zijn: "cysten van *E. histolytica/E. dispar*" gevonden. De plaats van serologisch onderzoek bij "darmamoebiasis" dient te worden heroverwogen, net zoals de therapeutische consequenties bij het vinden van vierkernige amoebencysten. Welke de meest rationele en kosteneffectieve consequenties zijn van het onderkennen van de taxonomische vergissing die een invasieve parasiet en een apathogene commensaal samenbracht onder de noemer van één naam, zal slechts in de loop van de tijd, en na een periode van consequente en volledige determinatie van de soort, duidelijk worden. Het is dan ook om deze reden, meer misschien nog dan om strikt therapeutische redenen, dat het een nuttige zaak lijkt bij het stellen van de diagnose precies te zijn en ons niet te beperken tot de observatie dat de patiënt een protozo herbergt die vermoedelijk geen, maar misschien ook wel in staat is klachten te veroorzaken en die "derhalve" dient te worden behandeld.

Literatuur

- Walsh JA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* in: Amoebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica* (JI Ravdin ed.) Wiley, New York 1988.
- Brumpt E. Etude sommaire de l' "*Entamoeba dispar*" n.sp., amibe a kystes quadrinuclees, parasite de l'homme. Bull Acad Med (Paris) 1925; 94: 942-952.
- Dobell C. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General Introduction. II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in culture. Parasitology 1928; 20: 357-412.
- Sargeant PG, Williams JE. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1978; 72(5): 519-521.
- Farri TA, Sargeant PG, Warhurst DC, Williams JE, Bhojani. Electrophoretic studies of the hexokinase of *Entamoeba histolytica* groups I to IV. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1980; 74(5): 672-673.
- Sargeant PG, Jackson TFHG Simjee A. Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates especially those from liver abscess. The Lancet 1982; i: 1386-1388
- Ortner S, Plaimauer B, Binder M, Scheiner O, Wiedermann G, Duchêne M. Molecular analysis of two hexokinase isoenzymes from *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1995; 73: 189-198.
- Ortner S, Kroschewski H, Binder M, Clark CG, Scheiner O, Wiedermann G, Duchêne M. Molecular cloning and biochemical characterization of hexokinases and phosphoglucomutases from *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Arch Med Res 1997; 28: 81-82.
- Clark CG, Diamond LS. Ribosomaal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. Mol Biochem Parasitol 1991; 49: 297-302.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol 1993; 40: 340-344.
- WHO/PAHO/UNESCO. Report of a consultation of experts on Amebiasis. Mexico City, Mexico. 28-29 January, 1997.
- Martinez-Palomo A, Espinosa-Cantellano M. Amoebiasis: New Understanding and New Goals. Parasitology Today 1997; 14(1) 1-3.
- Gonzalez-Ruiz A, Wright SG. Disparate amoebae. The Lancet 1998; 351: 1672-1673.
- Jackson TFHG. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. Int J Parasitol 1998; 28: 181-186.
- Clark CG, Diamond LS. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other Intestinal protozoa by riboprinting. Arch Med Res 1992; 23(2) 15-16
- Mackenstedt U, Johnson AM. Genetic differentiation of pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* by random amplified polymorphic DNA - polymerase chain reaction. Parasitol Res 1995; 81: 217-221.
- AcunoSoto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate L, Millan-Velasco F, Schoolnick G, Wirth D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 1993; 48(1) 58-70.
- Tachibana H, Kobayashi S, Takekoshi M, Ihara S. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. J Infect Dis 1991; 164: 825-826.
- Aguirre A, Warhurst DC, Guhl F, Frame IA. PCR-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 187-188
- Clark CG, Diamond LS. The laredo strain and other "*Entamoeba histolytica* like" amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. Mol Biochem Parasitol 1991; 46: 11-18.
- Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. J Clin Microbiol 1995; 33: 2558-2561.
- Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Lyerly DM, Petri WA. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. J Infect Dis 1997; 175: 734-736.
- Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri WA. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1998; 36: 449-452.
- Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. J Clin Microbiol 1997; 35: 3405-2407.
- Mistretta M, Gastellani G, Gatti S, Gobbo M, Novati S, Scaglia M, Bisoffi Z. Evaluation of two immuno-enzymatic tests for the detection of *Entamoeba histolytica/dispar* antigens in the faeces. Liverpool, 2nd European congress on tropical medicine, 1998.
- Verweij JJ, Aguirre A, Polderman AM. Evaluation of copro-antigen ELISA's for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Liverpool, 2nd European congress on tropical medicine, 1998.
- Polderman AM, Rijpstra AC. Medische Parasitologie, Handleiding bij de laboratoriumdiagnostiek. Houten/Zaandam: Bohn Stafleu Van Loghum, 1993.

Summary

Amebiasis: consequences of a taxonomical mistake. Polderman AM and Verweij JJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 46-51. Amebiasis is caused by *Entamoeba histolytica*, but not all "characteristic" cysts of 10-15 µm with four nuclei are *E. histolytica* cysts. It now appears that at least 90% of cysts found in cyst excretors in temperate regions, are in fact cysts of the noninvasive commensal *Entamoeba dispar*. Immunological, enzymatic and molecular tools now enable us to differentiate both species in cyst excreting patients. In our hands, however, immunological tools based on the detection of copro-antigens with monoclonal antibodies is not sufficiently sensitive. Zymodeme characterization is complicated and time consuming and not practicable in a routine diagnostic laboratory. Moreover, it is based on cultures which often fail to grow. Characterization of the cysts with PCR on unpreserved stool samples appears sensitive and reliable. Many errors in microscopy are detected and superfluous treatment with contact amoebicidal drugs (however mild such treatment courses may be) are avoided. *Key-words: amebiasis; Entamoeba histolytica; Entamoeba dispar; PCR; copro-antigens*