

De winst van het parasitologisch onderzoek van gefixeerde ontlasting

Th. G. MANK

In dit artikel wordt de microscopische beoordeling van SAF-gefixeerde feces (IJzerhaematoxyline-Kinyoun gekleurd preparaat en het sediment na Formaline-ether concentratie) beschreven. Geconcludeerd wordt dat de opsporing van protozoaire species hierdoor verbetert, vooral door het zichtbaar worden van de vegetatieve stadia.

Trefwoorden: diagnostiek; darmparasieten; SAF-fixatief; gefixeerde feces

De in Nederland gebruikelijke procedure van parasitologisch fecesonderzoek gaat uit van verse, onbehandelde feces. De diagnostiek berust op de microscopische beoordeling van een met eosine- en joodjoodkali gekleurd preparaat van ongeconcentreerde feces en het sediment verkregen na de formaline-ether concentratie volgens Ridley en Hawgood (1). De opbrengst van het onderzoek naar cysten en/of vegetatieve stadia bij een protozoaire darm-infectie is met de beschreven manier van aanpak veelal teleurstellend. De vegetatieve stadia van protozoa worden over het algemeen gemist, evenals cysten van slecht concentrerende stammen van *Entamoeba histolytica/dispar* en *Giardia lamblia*. De oöcysten en sporen van *Cryptosporidium spp* en van de Microsporidia worden niet gezien wanneer geen specifiek onderzoek wordt gedaan. Ook *Blastocystis hominis*, over de pathogeniciteit waarvan overigens de nodige controverse bestaat, wordt met de beschreven procedure van onderzoek uitgaande van verse feces veelal niet gevonden.

In de Verenigde Staten wordt, anders dan in Europa, bij het parasitologisch laboratoriumonderzoek uitgegaan van gefixeerd fecesmateriaal (2-5). De detectie en identificatie van de cysten en vegetatieve stadia van darmprotozoa is er gebaseerd op de microscopische beoordeling van permanent gekleurde feces-uitstrijken van al dan niet geconcentreerd gefixeerd fecesmateriaal (veelal de Trichroomkleuring uitgaande van met PolyVinylAlcohol (PVA) gefixeerd materiaal). Met name de opbrengst aan vegetatieve stadia zou aanzienlijk verbeteren wanneer voor het laboratoriumonderzoek wordt uitgegaan van ge-

fixeerde in plaats van niet gefixeerde feces. Studies waarbij de invloed van het al dan niet fixeren van feces (Europese versus Amerikaanse procedure) op de opbrengst van het onderzoek op darmprotozoa wordt geobjectiveerd zijn niet eerder verricht. Derhalve besloten wij een prospectieve studie op te zetten waarbij de opbrengst aan darmprotozoa gebruikmakend van het conventionele parasitologische onderzoek werd vergeleken met die waarbij uitgegaan werd van direct na lozing gefixeerde feces.

MATERIALEN en METHODEN

Opzet van de studie

Bij het onderzoek werd gebruik gemaakt van het Sodium Acetate Acetic Acid Formalin (SAF) als fixeermiddel voor de feces, dit in combinatie met de IJzerhaematoxyline-Kinyoun kleuring (IHK-kleuring) (6-9).

Patiënten verzamelden een faecesmonster waarbij gebruik werd gemaakt van een speciaal voor dit doel ontworpen diarreepakket. De feces werd, direct na lozing, overgebracht in twee receptacula. Eén leeg, het ander gevuld met SAF-fixatief. De patiënten werden geïnstrueerd het met SAF-gefixeerde feces gevuld receptaculum na sluiting krachtig te schudden. De datum en het tijdstip van het verzamelen en fixeren van de feces werden door de patiënt genoteerd. Patiënten leverden, zo snel als mogelijk, de beide gevulde receptacula in op één van de prikposten van het Artsenlaboratorium. De datum en het tijdstip van inleveren werd door één van de medewerk(st)ers van het laboratorium genoteerd.

Patiënten

In totaal werden de feces van 247 patiënten onderzocht. 170 patiënten bezochten hun huisarts met diarreeklachten die langer aanhielden dan een week. De overige 77 waren asielzoekers, tijdelijk gehuisvest in het OC-Haarlem.

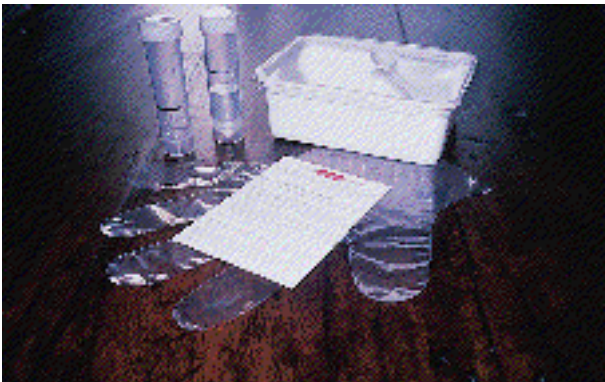
Parasitologisch onderzoek

Het standaardprotocol omvatte de volgende onderzoeken:

verse, niet gefixeerde feces. Microscopische beoordeling van een met eosine en joodjoodkali (JKJ) gekleurd preparaat van ongeconcentreerde faeces en van het sediment verkregen na de formaline-ether concentratie volgens Ridley (10). Van het verkregen sediment werd een dun, met JKJ gekleurd, en een iets dikker ongekleurd preparaat microscopisch beoordeeld.

Laboratorium voor Parasitologie, Stichting Artsenlaboratorium Haarlem/ Stichting Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Kennemerland

Correspondentie: Dr. Th.G. Mank, Wilhelminastraat 43A, 2011 VK Haarlem



Figuur 1. Zgn. diarreepakket, gebruikt voor het verzamelen van gefixeerde ontlasting.

SAF-gefixeerde feces. Microscopische beoordeling van een met JKJ en IHK (IJzerhaematoxyline-Kinyoun) gekleurd preparaat van ongeconcentreerde feces en van het sediment verkregen na de formaline-ether concentratie (zie procedure beschreven bij verse feces).

In de IHK- kleuring is een 'zuurvaste' stap opgenomen, wat als voordeel heeft dat zuurvaste organismen zoals *Cryptosporidium spp* herkenbaar blijven. Een ander voordeel van de (permanente) IHK-kleuring is dat de preparaten na kleuring ingebed en bewaard kunnen worden.

Microscopische beoordeling van de fecesuitstrijken

De 'natte' preparaten werden eerst oriënterend gescreend met een 10x10 vergroting waarbij het gehele dekglas (20x20 mm) werd beoordeeld. Vervolgens werden tenminste 100 gezichtsvelden (± 3 min) met een 10x40 vergroting beoordeeld.

De IHK-gekleurde preparaten werden gescreend met een 10x50 vergroting, 150-200 gezichtsvelden (± 5 min) werden beoordeeld. Morfologische details werden bekeken met een vergroting van x1000.

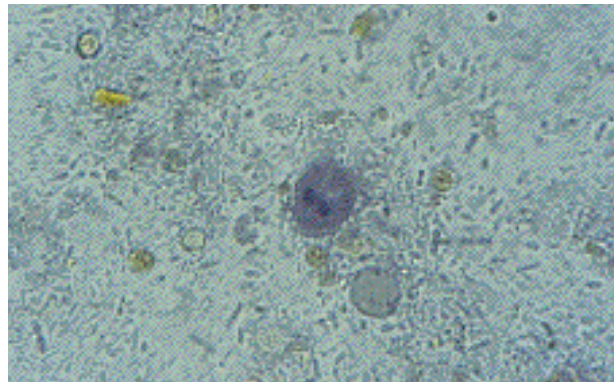
Alle preparaten werden door 2 analisten beoordeeld, waarbij werd getracht zoveel als mogelijk 'observer blind' te werken. Dit wil zeggen dat de microscopisten bij de beoordeling niet op de hoogte waren van de diagnose, de consistentie van de faeces, het oordeel van de collega of de onderlinge samenhang van de preparaten. Bij voorkomende discrepanties werden de preparaten aan een derde beoordelaar, die niet op de hoogte was van eerdere bevindingen, voorgelegd.

Bij de verdere analyse werden *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium spp*, *Cyclospora cayatanensis* en *Dientamoeba fragilis* als potentieel pathogeen geclassificeerd.

Blastocystis hominis werd, evenals *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli*, *Iodamoeba bütschlii*, *Chilomastix mesnili*, *Endolimax nana* en *Trichomonas hominis* tot de apathogene darmprotozoa gerekend.

Statistische analyse

Vergelijkingen werden gemaakt met de McNemar test voor gepaarde waarnemingen (SPSS software (SPSS-SPC 4.0 USA)).



Figuur 2. Trofozoiet van *Dientamoeba fragilis*.

RESULTATEN

Het mediane tijdsinterval tussen het verzamelen/fixeren van het fecesmonster en inleveren bij het laboratorium bedroeg 6 uren (25-75% kwartielinterval: 4-17 uur). De niet-gefixeerde fecesmonsters werden binnen 1 uur na inleveren microscopisch beoordeeld. Tabel 1 laat de bevindingen zien van het onderzoek van de verse en SAF-gefixeerde fecesmonsters. Daar fecesmonsters veelal meer dan één parasitair species bevatten, representeren de gegeven aantallen geen patiënten.

Voor wat betreft het directe preparaat is de opbrengst aan parasieten bij de met JKJ- en Eosine gekleurde preparaten van de verse feces en de met JKJ-gekleurde preparaten van de SAF-gefixeerde feces vergelijkbaar. Weliswaar wordt *Blastocystis hominis* aanzienlijk meer gevonden in het SAF-gefixeerde materiaal, maar aangezien niet duidelijk is of dit micro-organisme pathogeen is, behoeft dit niet zonder meer een voordeel te zijn.

De opbrengst van onderzoek van de met IHK-gekleurde uitstrijk van SAF-gefixeerd materiaal blijkt duidelijk groter dan welke andere door ons onderzochte techniek, dit vooral dankzij het feit dat in het gefixeerde fecesmateriaal vegetatieve stadia (trofozoieten) van protozoa kunnen worden aangetoond, die in niet-gefixeerde feces verdwenen c.q. niet meer herkenbaar zijn. Bij twee van de 11 met *Entamoeba histolytica/dispar* geïnfecteerde patiënten werden alleen de vegetatieve stadia gevonden (IHK-preparaat, tabel 2). Van de 38 patiënten met giardiasis berustte de diagnostiek bij 2 patiënten op het aantonen van het vegetatieve stadium in het IHK-preparaat. *Dientamoeba fragilis*, waarvan uitsluitend een vegetatieve vorm bekend is, werd uitsluitend in de gefixeerde feces aangetoond (24x). Uitgaande van SAF-gefixeerde feces, werden er bij 149 van de 247 onderzochte fecesmonsters (patiënten) een of meerdere protozoaire species gevonden (tabel 3). Wanneer verse feces bij het parasitologisch onderzoek werd gebruikt (microscopische beoordeling van met eosine en JKJ gekleurde directe preparaten en het sediment na de formaline-ether concentratie) werden er bij 89 van de 247 van de onderzochte fecesmonsters protozoa gevonden. Bij 30 van de 70 patiënten geïnfecteerd met potentieel pathogene darmprotozoa zou de wellicht

klinisch relevante infectie gemist worden indien uitsluitend onderzoek van verse feces verricht zou zijn (tabel 3).

Beschouwing

Bij deze studie werden verse en gefixeerde fecesmonsters van 247 patiënten, gebruik makend van geblindeerde procedures, microscopisch onderzocht. In de gefixeerde feces werd in 70 van de 247 onderzochte monsters één of meer (potentieel) pathogene protozoaire species gevonden, terwijl bij het onderzoek van ongefixeerde, verse, feces er slechts 40 positief werden bevonden. De meeropbrengst wordt gevormd door vegetatieve stadia van *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia lamblia*, en de 'obligaat

vegetatieve' *Dientamoeba fragilis*. Vegetatieve stadia werden in de ongefixeerde feces niet gevonden. De mediane tijdsspanne tussen feceslozing en inlevering bij het laboratorium bedroeg 6 uur. Andere (niet gepubliceerde) studies laten zien dat, zonder fixatie, *Dientamoeba fragilis* binnen één uur na lozing desintegreert en microscopisch onherkenbaar wordt. De vegetatieve stadia van *Entamoeba histolytica/dispar* en *Giardia lamblia* lijken meer resistent tegen lysis. Ze zijn soms tot 24 uur na de lozing in de feces te herkennen. Kennelijk is toch de meerderheid van de trofozoieten binnen enkele uren na lozing onherkenbaar geworden. Het is ons althans niet gelukt binnen de aangegeven tijd trofozoieten van darmparasieten op te sporen.

Tabel 1. Recovery van intestinale parasieten in (gepaarde) verse en met SAF gefixeerde fecesmonsters bij de verschillende onderzoekstechnieken (N=247 verse en 247 gefixeerde fecesmonsters)

Parasitair species	Vers fecesmonster			SAF-gefixeerde feces			Totaal aantal gevonden onafhankelijk van gebruikte techniek
	JKJ	Eosine	Ridley	JKJ	IJzerhaematoxyline-Kinyoun kleuring	Ridley	
<i>Blastocystis hominis</i>	15	15	5	24	77	31	81
<i>Cryptosporidium spp</i>	–	–	–	–	3	–	3
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	–	–	–	–	1	–	1
<i>Dientamoeba fragilis</i>	–	–	–	–	24	–	24
<i>Endolimax nana</i>	23	23	32	25	50	31	60
<i>Entamoeba coli</i>	11	12	16	14	12	16	19
<i>Entamoeba hartmanni</i>	7	8	8	5	11	8	14
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	7	7	8	7	10	8	11
<i>Giardia lamblia</i>	30	30	32	31	37	36	38
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	2	2	5	3	11	6	12
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	–	2	–	–	4	4
<i>Hymenolepis nana</i>	–	–	1	–	–	1	1
Mijnworm eieren	–	–	1	–	–	–	1
<i>Trichuris trichiura</i>	2	2	14	3	–	14	14
Totaal	98	99	124	112	236	155	283

Tabel 2. Bevindingen van de diverse ontwikkelingsstadia van darmprotozoa onafhankelijk van de gebruikte techniek (N=247 gepaarde fecesmonsters, vers en SAF-gefixeerd).

Parasitair species	alleen cysten gevonden	alleen trofozoieten gevonden	cysten en trofozoieten gevonden	totaal gevonden "gepaarde" faeces monsters*
<i>Dientamoeba fragilis</i>	–	24	–	24
<i>Endolimax nana</i>	12	15	33	60
<i>Entamoeba coli</i>	10	1	8	19
<i>Entamoeba hartmanni</i>	7	1	6	14
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4	2	5	11
<i>Giardia lamblia</i>	19	2	17	38
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	4	1	7	12
Totaal	56	46	76	178

*: onafhankelijk van het ontwikkelingsstadium van het species

Tabel 3. Vergelijking van de twee procedures van parasitologisch fecesonderzoek betreffende het gevonden aantal patiënten waarbij darmprotozoa gevonden werden. Tussen haakjes de bevindingen wanneer uitsluitend (potentieel) pathogene protozoa worden geteld (N=247 patiënten).

SAF-gefixeerd*	Verse faeces**		
	Positief	Negatief	
Positief	88 (40)	61 (30)	149 (70)
Negatief	1 (0)	97 (177)	98 (177)
	89 (40)	158 (207)	247 (247)

*: Procedure bij SAF-gefixeerde fecesmonsters: IJzerhaematoxyline-Kinyoun gekleurd preparaat; formaline-ether concentratie. **: Procedure bij verse, niet-gefixeerde feces: directe preparaten (JKJ- en eosine gekleurd) formaline-ether concentratie. ($p < 0,00001$)

Een belangrijk voordeel bij het gebruik van gefixeerde feces in combinatie met een permanente kleuring, zoals bij ons onderzoek, ten opzichte van de conventionele wijze van fecesonderzoek is dat de fragiele trofozoieten van darmprotozoa kunnen worden aangetoond, waardoor de sensitiviteit van parasitologisch fecesonderzoek wordt verbeterd. Dit geldt met name in het geval van *Dientamoeba fragilis*, waarvan voor zover bekend geen cystevorm bestaat. Een voordeel is ook dat het separaat vervaardigen van een Ziehl-Neelsen preparaat achterwege kan blijven, aangezien *Cryptosporidium spp* goed waarneembaar zijn met de hier beschreven methode van fixatie en kleuring.

Een relatief nadeel van de methode is dat het voor enkele technieken voor het opsporen van wormeieren en larven (bijv. glycerine sedimentatie bij *Schistosoma spp*) noodzakelijk is uit te gaan van verse, ongefixeerde feces (1). Hetzelfde geldt voor het opsporen van *Microsporidium spp* (11). In veel gevallen blijft het dus noodzakelijk om ook ongefixeerde feces te laten aanbieden voor onderzoek. Andere nadelen zijn het tijdrovende karakter van de IHK-kleuring en het feit dat standaardisatie van de kleuring en het beoordelen van de voor de meeste microscopisten onbekende beelden enige oefening vereist. Gezien de aard van de permanent gekleurde preparaten is het echter mogelijk bij moeilijk te identificeren organismen op een nader te bepalen tijdstip een specialist te consulteren. Daarnaast kan een collectie worden aangelegd van geïdentificeerde protozoaire cysten en trofozoieten.

Naschrift

Onderzoek van gefixeerde feces wordt, tot op heden, slechts binnen enkele laboratoria in Nederland toegepast. Momenteel worden medisch microbiologen, klinisch chemici, en analisten getraind in de vernieuwde procedures van parasitologisch fecesonderzoek. De training omvat een driedaagse, praktijkgerichte cursus welke georganiseerd wordt door medewerkers van de afdelingen parasitologie van respectievelijk het AMC (dr. T. van Gool) en de Stichting Artsenlaboratorium Haarlem (dr. Th. G. Mank). De cursus staat onder auspiciën van de Nederlandse Vereniging voor Parasitologie.

Literatuur

- 1 Polderman AM, Rijpstra AC. Medische parasitologie, handleiding bij de laboratoriumdiagnostiek. 2e ed. Houten/Zaventem, Bohn Stafleu Van Loghum 1993; 122-196.
- 2 Smith JW, Barlett MS. Diagnostic Parasitology: introduction and methods. In: Balows A, Hausler WJ, Herrman KC, Isenberg HD, Shadomy HJ (ed.): Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC 1991; 701-716.
- 3 Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. American Society for Microbiology, Washington DC 1993; 501-540.
- 4 Garcia LS, Shimizu RY. Medical parasitology: update on diagnostic techniques and laboratory safety. Laboratory Medicine 1993; 24: 81-88.
- 5 Parasitology Subcommittee/Microbiology Section of Scientific Assembly. Recommended procedures for the examination of clinical specimens submitted for the diagnosis of parasitic infections. American Journal of Medical Technology 1978; 44: 1101-1106.
- 6 Yang J, Scholten T. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. American Journal of Clinical Pathology 1977; 67: 300-304.
- 7 Scholten T. An improved technique for the recovery of intestinal protozoa. Journal of Parasitology 1972; 58: 633-634.
- 8 Junod C. Technique coprologique nouvelle essentielle destinée à la concentration des trophozoites d'amibes. Bulletin Société Pathologiste Exotique 1972; 65: 390-398.
- 9 Palmer J. Modified Iron Haematoxylin/Kinyoun stain. Clinical Microbiology Newsletter 1991; 13: 39-40.
- 10 Ridley DS, Hawgood BC. The value of formol-ether concentration of fecal cysts and ova. Journal of Clinical Pathology 1956; 9: 74-76.
- 11 Gool T van, Hollister WS, Eeftinck Schattenkerk J, van den Bergh Weerman KM, Bartelsman MA, Bruins WM, Canning JJM et al. Diagnosis of microsporidian infections in patients with HIV by a new rapid fluorescent technique. Journal of Clinical Pathology 1993; 46: 694-699.

Summary

The benefits of the parasitological investigation of SAF-preserved stool specimens. Mank ThG. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 52-55.

The use of sodium acetate acetic acid formalin (SAF-) preserved stool specimens was compared with that of non-preserved specimens for the recovery of intestinal protozoa. A total of 247 patients, 170 with diarrhoea of more than one week's duration and 77 refugees, were asked to collect a stool specimen. Each specimen was placed into two vials, one empty, the other containing SAF-fixative. Laboratory investigations included microscopic examination of the concentrated sediment and direct wet smears from both types of stool specimens and the microscopic examination of a permanent stained smear from the unsedimented, SAF-preserved stool specimens. Examination of the SAF-preserved stool specimens revealed intestinal protozoa in 149 of the 247 patients. With the conventional procedure using unpreserved stool specimens, intestinal protozoa were found in 89 of the 246 patients. The results show that the examination of SAF-preserved stool specimens, consisting of the microscopic examination of both the concentrated sediment and the permanent stained smear from the unsedimented material, increases the chance of recovering intestinal protozoa as compared to the conventional procedure.

Key-words: diagnostics; intestinal protozoa; SAF-fixative; preserved stools