CAT
Critically Appraised Topic

Opsporen van parasieten in faeces: wat en voor wie?

Author: Kristien Van Vaerenbergh
Supervisor: Prof. Dr. K. Lagrou
Search/methodology verified by: Dr. Johan Frans
Date: 21/1/2004
Expiry date: *21/1/2006*

CLINICAL BOTTOM LINE

Opsporen van parasieten in faeces is een arbeidsintensieve en dure analyse, met beperkte opbrengst. Waar het vroeger gangbaar was om bij elke diarree episode over te gaan tot zowel faeces cultuur als opsporen van parasieten, wordt nu aangeraden selectief te werk te gaan bij de investigatie van infectieuse diarree. Verschillende klassen van diarree kunnen onderscheiden worden: 'community-acquired' diarree en reizigersdiarree, 'hospital-acquired' diarree (ontstaan na 3 dagen hospitalisatie) en ten slotte persisterende diarree en diarree bij immuungecompromitteerden. Opsporen van parasieten is van toepassing bij persisterende diarree, zeker bij immuungecompromitteerden.
Omstandigheden waarbij de detectie van parasieten negatief beïnvloed wordt, zijn gebruik van antibiotica en barium inname. Tevens is de opbrengst minimaal bij investigatie van diarree, onstaan na de eerste drie dagen van hospitalisatie. Gezien het intermittente karakter van shedding van parasieten, is het wenselijk meerdere stalen per patiënt te onderzoeken, afgenomen op verschillende dagen.
Gezien momenteel gewerkt wordt zonder fixeermiddel, is routinematig rechtstreeks onderzoek niet zinvol. Het kan beperkt worden tot vloeibare, etterige en bloederige stalen, waar de kans op vinden van trofozoieten het hoogst is, en op voorwaarde dat de stalen onmiddellijk na produktie naar het labo gebracht worden en kunnen bekeken worden. Dit om de morfologische deterioratie van trofozoieten tegen te gaan.
Het lijkt zinvol om Cryptosporidium voor elk parasitologisch onderzoek op te sporen. Door middel van gemodifieerde zuurvaste kleuring of safranine kleuring worden ook Isospora en Cyclospora opgespoord. Deze pathogenen dienen uitgesloten te worden bij persisterende diarree, zeker bij reizigers en kinderen in kribbes, en bij diarree bij immuungecompromitteerden. Het is wenselijk om te weten tot welke risicopopulatie de patiënt behoort (reiziger, immuungedeprimeerd). Recent antibioticagebruik en duur van hospitalisatie zijn nuttige gegevens, om in overleg met de clinicus, Clostridium difficile uit te sluiten, ipv parasieten op te sporen.
Naar de toekomst toe, is het belangrijk te overwegen om een systeem van gefixeerde faeces met permanente kleuring in te voeren. Dit is vooral om de opbrengst aan trofozoieten, ook aan Dientamoeba fragilis, te verhogen, naast de mooie beelden verkregen met permanente kleuring. Er moet dan wel niewe expertise opgebouwd worden, om deze preparaten te beoordelen.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Gedurende de laatste decaden werden tal van intestinale pathogenen geïdentificeerd die diarree kunnen veroorzaken. Gezien deze diversiteit aan pathogenen, is microbiologisch onderzoek nuttig om bij het stellen van de diagnose van infectieuze diarree, de verantwoordelijke pathogeen te identificeren. Het opsporen van deze brede waaier aan pathogenen gebeurt hoofdzakelijk door middel van faeces cultuur, opsporen van Clostridium difficile, en opsporen van parasieten. Voor een diagnostisch labo zijn dit zeer arbeidsintensieve en dure analysen.

Momenteel bestaat het opsporen van parasieten in faeces uit microscopisch onderzoek na concentratie (methode van Ritchie), evt aangevuld met auramine kleuring voor Cryptosporidium. In 2004 werd deze analyse 1778 keer uitgevoerd, waarbij in 4.8 % van de stalen parasieten werden aangetroffen. Opvallend was de grote diversiteit van aanvragende eenheden. Consultatie algemene inwendige ziekten was aanvrager voor 29% van de stalen, consultatie pediatrie voor 9.5% en spoedgevallen voor 8%. In oktober en november 2004 samen werden 267 faeces stalen onderzocht voor parasieten, met een positief resultaat in 3.7%. Voor 76% van de stalen, was er maar één staal per patiënt voor handen. In 9 % van de aanvragen was de patiënt langer dan 3 dagen gehospitaliseerd, met steeds een negatief resultaat. In 31.5 % was de aanvraag een combinatie van faeces cultuur, opzoeken C. difficile en parasieten.

Hoe kan deze opbrengst geoptimaliseerd worden? In deze CAT wordt bekeken welke intestinale parasieten belangrijk zijn voor enkele specifieke patiëntenpopulaties. Kunnen we, rekening houdende met een beperkt aantal karakteristieken van de patiënt, onze methoden hieraan aanpassen? In welke situaties wordt de detectie van intestinale parasieten bemoeilijkt? Kunnen we, rekening houdende met de '3-day-rule', met het feit dat parasieten onderzoek beter vermeden kan worden na antibiotica inname, en met het feit dat herhaald onderzoek aanbevolen wordt voor het opsporen van parasieten, komen tot een consensus met de aanvragende clinici ivm aanvraagcriteria voor het opsporen van parasieten in faeces?

QUESTION(S)

1) *Opsporen van parasieten in faeces: voor wie is deze analyse van toepassing?*
2) *Optimale voorwaarden voor opzoeken van parasieten in faeces*
3) *Opsporen van parasieten in faeces: een veelheid aan methoden*
4) *Wat kan er concreet aangeboden worden ?*

SEARCH TERMS

Zoektermen: 'Intestinal Diseases, Parasitic (MeSH)', 'Diarrhea (MeSH)', 'laboratory techniques and procedures (MeSH)', acute diarrhea , chronic diarrhea, stool culture, intestinal parasites, yield, rejection criteria, diarrhea and HIV, travelers'diarrhea, antibiotic-associated diarrhea, hospital-acquired diarrhea, blastocystis, entamoeba, cryptospora, cyclospora, dientamoeba, giardia, microsporidia, schistosoma, strongyloides

Databases: Pubmed, Pubmed Clinical Queries, Pubmed Systematic Reviews, National Guideline Claeringhouse, SUMsearch, UpToDate, Cochrane Library

Beroepsorganisaties: Infectious Diseases Society of America (www.idsociety.org), European Society Clinical Microbiology and Infectious Diseaeses (www.escmid.org/sites/index.asp), American Society Microbiology, World Health Organization (www.who.int), Centers for Disease Control And Prevention (www.cdc.gov), British Colombia Medical Association (www.healthservices.gov.bc.ca/msp/protoguides)

Tekstboeken: Manual of Clinical Microbiology, 8 th edition, Murray Patrick R. et al., ASM Press, 2003; Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th edition, Mandell GL, Churchill Livingstone; Clinical Microbiology Procedures Handbook, second edition, Isenberg Henry I., ASM Press, 2004; Medische parasitologie, handleiding bij de laboratoriumdiagnostiek, derde herziene druk. Polderman AM en Rijpstra AC, Bohn Stafleu Van Loghum, Houten, Nederland, 1999.

RELEVANT ARTICLE(S) / REFERENCES

GUIDELINE:

1. Thomas PD, Forbes A, Green J et al. Guidelines for the investigation of chronic diarrhea, 2nd edition. Gut 2003; 52(Suppl V): V1-V15.
2. Manatsathit S, Dupont HL, Farthing M et al. Guideline for the management of acute diarrhea in adults. Journal of gastroenterology and hepatology 2002; 17 (Suppl.) S54-S71.
3. Infectious Diseases Society of America. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. Clin Infect Dis 2001; 32: 331-351.
4. Guarino A and Albano F. Guidelines for the approach to outpatient children with acute diarrhea. Acta Paediatr. 2001; 90: 1087-1095.
5. Ova and Parasite testing on stool samples. Reviewed 2001; BCHealthServices (www.healthservices.gov.bc.ca/msp/protoguides)
6. Infectious Diseases Society of America. Kaplan JE, Masur H, Holmes KK et al. An Overview of the 1999 US Public Health Service/Infectious Diseases Society of America Guidelines for Preventing Opportunistic Infections in Human Immunodeficiency Virus–Infected Persons. Clinical Infectious Diseases 2000;30:S15-28.
7. AGA technical review on the evaluation and management of chronic diarrhea. Gastroenterology 1999; 116: 1464-1486.
8. NCCLS. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; approved guideline; 1997; 17(23): M28-A.

REVIEW:

9. Donowitz M, Kokke FT and Saidi R. Evaluation of patients with chronic diarrhea. N Eng J Med 2004; 332(11): 725-729.
10. Keiser PB and Nutman TB. Strongyloides stercoralis in the immunocompromised population. Clin Microbiol Reviews 2004; 17(1): 208-217.
11. Musher DM and Musher BL. Contagious acute gastrointestinal infections. N Eng J Med 2004; 351 (23):2417-2427.
12. Johnson EH, Windsor JJ and Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical and diagnostic aspects of Dientamoeba fragilis. Clin Microbiol Reviews 2004; 17: 553-570.
13. Haque R, Huston CD, Hughes M et al. Amebiasis. N Eng J Med 2003; 348(16): 1565-1573.
14. Mcdonald V. Parasites in the gastrointestinal tract. Parasite immunology 2003; 25: 231-234.
15. Chen XM, Keithly JS, Paya CV and LaRusso NF. Cryptosporidiosis. N Eng J Med 2002; 346(22):1723-1731.
16. Garcia LS. Laboratory identification of the Microsporidia. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 1892-1901.

17. Bartlett J. Antibiotic-associated diarrhea. N Eng J Med 2002; 346 (5): 334-339.
18. Oldfield EC. Evaluation of chronic diarrhea in patients with human immunodeficiency virus infection. Reviews in gastroenterological disorders 2002; 2(4):176-188.
19. Ryan ET, Wilson ME and Kain KC. Illness after international travel. N Eng J Med 2002; 347(7): 505-516.
20. Tan KSW, Singh M and Yap EH. Recent advances in Blastocystis hominis research. Int Journal for parasitology 2002; 32: 789-804.
21. Ross A, Bartley PB, Sleigh AC et al. Schistosomiasis. N Eng J Med 2002; 346(16): 1212-1220.
22. Okhuysen PC. Traveler's diarrhea due to intestina protozoa. CID 2001; 33: 110-114.
23. Gopal Rao G, Ozerek AE and Jeanes A. Rational protocols for testing faeces in the investigation of sporadic hospital acquired diarrhea. J hosp infect 2001; (47): 79-83.
24. Aranda-Michel J and Giannella RA. Acute diarrhea: a practical review. The American Journal of medicine 1999; 106:670-676.
25. Cartwright CP. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. J Clin Microbiol 1999; 37(8): 2408-2411.
26. Ortega YR and Adam RD. Giardia: overview and update. CID 1997; 25: 545-550.

ORIGINAL:

27. Thielman NM and Guerrant NL. Acute infectious diarrhea. N Eng J Med 2004;350 (1): 38-47.
28. Girginkardesler N, Goskun S, Balcioglu IC et al. Dientamoeba fragilis, a neglected cause of diarrhea, successfully reated with secnidazole. CMI 2003; 9: 110-113.
29. van Gool T, Weijts R Lommerse E and Mank TG. Triple Faeces Test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:284-290.
30. Blessmann J, Buss H, Ton Nu PA et al. Real-time PCR for detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in fecal samples. J Clin Microbiol 2002; 40(12): 4413-4417.
31. Bauer TM, Lalvani A, Feherenbach J et al. Derivation and validation of guidelines for stool cultures for enteropathogenic bacteria other than Clostridium difficile in hospitalized adults. JAMA 2001; 285(3): 313-319.
32. De Wit M, Koopmans M, Kortbeek L et al. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. CID 2001; 33: 280-288.
33. Siddiqui AA and Berk SL. Diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. CID 2001; 33: 1040-1047.
34. Weber R, Ledergerber B, Zbinden R et al. Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons. Arch Intern Med 1999; (159): 1473-1480.
35. Sluiters JF. Parasitaire infecties bij immuungecompromitteerden. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 71-75.
36. Mank TG. De winst van het parasitologisch onderzoek van gefixeerde ontlasting. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24:52-55.
37. Haque R, Ali IKM, Akther S and Petri WA. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of Entamoeba histolytica infection. J Clin Microbiol 1998; 36(2): 449-452.
38. Mank TG, Deelder AM, van Eijk JT, Polderman AM. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16(8): 615-619.
39. Troll H, Marti H and Weiss N. Simple differential detection of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in fresh stool specimens by sodium acetate- acetic acid- formalin concentration and PCR. J Clin Microbiol 1997; 35(7): 1701-1705.
40. Choi SW, Park CH, Silva T et al. To culture or not to culture : fecal lactoferrin screening for inflammatory bacterial diarrhea. J Clin Microbiol 1996; 34(4): 928-932.
41. Chitkara YK, McCasland KA and Kenefic L. Development and implementation of cost-effective guidelines in the laboratory investigation of diarrhea in a community hospital. Arch Intern Med 1996; 156: 1445-1448.
42. Morris AJ, Murray PR and Reller LB. Contemporary testing for enteric pathogens: the potential for cost, time and health care savings. J Clin Microbiol 1996; 34(7): 1776-1778.
43. Hines J and Nachamkin I. Effective use of the clinical microbiology laboratory for diagnosing diarrheal diseaeses. CID 1996; 23: 1292-1301.
44. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH et al. Cyclospora species- A new protozoan pathogen of humans. N Eng J Med 1993; 328 (18): 1308-1312.
45. Morris AJ, Wilson ML and Reller LB. Application of rejection criteria for stool ovum and parasite examinations. J Clin Microbiol. 1992; 30(12): 3213-3216.

46. SenayH and MacPherson D. Parasitology: diagnostic yield of stool examination. CMAJ 1989; 140: 1329-1331.

LETTER/EDITORIAL:

47. Norberg A, Nord CE and Evengard B. Dientamoeba fragilis-a protzoal infection which may cause severe bowel distress. CMI 2003; 9: 65-68.
48. Zahariadis G, Connon JJ and Fong IW. Fulminant Clostridium difficile colitis without diarrhea: lack of emphasis in diagnostic guidelines. AJG 2002; 97(11): 2929-2930.
49. Hanscheid T, Cristino JM and Salgado MJ. Feasibility of introducing rejection criteria for stool cultures in a teaching hospital in Portugal. CMI 2002; 8: 118-121.
50. Sheppard MJ. Ratinal protocols for testing faeces in the investigation of sporadic hospital-acquired diarrhea. J hosp infect 2001; 49(1):80-81.
51. Ozerek AE, Gopal Rao G. Is routine screening for conventional enteric pathogens necessary in sporadic hospital-acquired diarrhea? J hosp infect 1999; 41:159-161.
52. Rohner P, Pittet D, Pepey B et al. Etiological agents of infectious diarrhea: implications for requests for microbiological culture. J Clin Microbiol 1997; 1427-1432.
53. Asnis DS, Bresciani A, Ryan M et al. Cost-effective approach to evaluation of diarrheal illness in hospitals. J Clin Microbiol 1993; 31(6): 1675.
54. Siegel DL, Edelstein PH, Nachamkin I. Inappropriate testing for diarrheal diseases in the hospital. JAMA 1990; 263(7):979-982
55. Montesorri GA. Searching for parasites in stool: once is usually enough. CMAJ 1987; 137: 702.

TEXTBOOK

56. Uptodate (online)
57. Polderman AM en Rijpstra AC. Medische parasitologie, handleiding bij de laboratoriumdiagnostiek, 1999, derde, herziene druk. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten, Nederland.
58. Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, et al. Manual of Clinical Microbiology, 2003, 8th edition. ASM Press, Washington DC.
59. Mandell GL. Principles and Practice of Infectious Diseases, 2004, 6th edition. Churchill Livingstone.
60. Isenberg Henry I. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2004, second edition. ASM Press, Washington DC.
61. CDC, diagnostic Procedures for Stool Specimens, last modified 2003 (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

APPRAISAL

Deel 1: parasieten opzoeken in faeces: voor wie is deze analyse van toepassing?

Acute infectieuse diarree

Acute diarree (<4 weken aanwezig) is een niet-specifiek verschijnsel dat kan veroorzaakt worden door infecties, inname van medicatie, inflammatoire darmaandoeningen en ischemie. Ofschoon acute diarree vaak van infectieuse aard is, kan zelden een specifiek organisme geïdentificeerd worden. Meestal zal het gaan om een zelf-limiterend proces, waarbij geen medische hulp gezocht wordt. Toch is acute diarree een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit vooral in pediatrische en geriatrische populaties. De incidentie in vb Zuid-Amerika is 2.7 episodes per jaar gedurende de eerste 2 levensjaren. In Europa en Verenigde Staten kunnen we rekenen op één episode per persoon en per jaar. Naast de acute mobiditeit en mortaliteit, kan diarree de oorzaak zijn van ernstige problemen op lange termijn, zoals het hemolytisch-uremisch syndroom (enterohemorragische E. coli) en syndroom van Guillain-Barré na Campylobacter jejuni.

Acute diarree bij niet-gehospitaliseerde patiënten kan zich presenteren als een niet-inflammatoire, watige diarree met grote volumes per dag, zonder etter of bloed, zonder uitgesproken abdominale pijn of koorts. Anderzijds is er de inflammatoire diarree, gekenmerkt door een frequente, weinig-volumineuse, mucoiede en bloederige defecatie.Dit

kan gepaard gaan met tenesme, koorts, ernstige abdominale pijn, en bloed en etter in de stoelgang. Inflammatoire diarree kan ook niet-infectieus van origine zijn (ulceratieve colitis…).

Clinical Presentations and Likely Causes of Acute Diarrheal Disease in Outpatients

Clinical Type	Approximate Percentage of Patients	Likely Cause	
		Industrialized Countries	Less-developed Countries
Watery diarrhea	90	Rotavirus, other viruses	Rotavirus, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Enteropathogenic *E. coli*, *Campylobacter jejuni*
Dysentery	5 to 10	*Shigella*, Enteroinvasive *E. coli*, *Campylobacter jejuni*	*Shigella*, Enteroinvasive *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Entamoeba histolytica*
Protracted diarrhea (>14 days)	3 to 4	Enteropathogenic *E. coli*, *Giardia*, *Yersinia*	Enteropathogenic *E. coli*, *Giardia*
Severe purging with rice-water stool	1 (higher in cholera-endemic areas)	*Salmonella*, Enterotoxigenic *E. coli*	*Vibrio cholerae*, Enterotoxigenic *E. coli*
Hemorrhagic colitis	<1?	Enterohemorrhagic *E. coli*	Enterohemorrhagic *E. coli*

Modified from (6).

Aranda-Michel J., Giannella R A., American journal of medicine, 1999

De IDSA-richtlijnen (Practice Guidelines for The Management of Infectious Diarrhea, Guerrant *et al*, 2001) werden onwikkeld vanuit 2 vaststellingen:
Ten eerste was men zich bewust van een steeds **breder wordend arsenaal van pathogenen** die diarree kunnen veroorzaken, en met toegenomen diagnostische mogelijkheden. Deze pathogenen worden vaak gemakkelijk overgebracht door voedsel of water, of van de ene persoon op de andere, met belangrijke gevolgen voor kwetsbare populaties (immuundeficiënte patiënten). Daarnaast is er ook de snelle globalisatie en industrialisatie van onze voedselvoorziening.
Ten tweede is er de noodzaak om een **kosten-efficiënte benadering** van evaluatie en management van infectieuse diarree te realiseren, door een selectief gebruik van diagnostische middelen, preventieve en curatieve maatregelen.

Zes richtlijnen werden ontwikkeld, gaande van orale rehydratatie, klinische en epidemiologische evaluatie, uitvoeren van faeces onderzoek, toedienen van antibiotica, niet toedienen van motiliteitsremmers, en ten slotte beschikbare vaccins. Focus van deze richtlijnen is de geïndustrialiseerde wereld (bijlage 1). Richtlijnen voor diarree in ontwikkelingslanden zijn in 1993 gepubliceerd door de WHO.

Richtlijn in verband met faeces onderzoek (zie bijlage 1):

- Waar het vroeger gangbaar was bij elke diarree cultuur faeces en opzoeken parasieten aan te vragen, wordt nu een selectieve aanpak geadviseerd. Community-acquired en rezigersdiarree maken de eerste categorie uit, vervolgens hospital-acquired diarree (optredend na 3 dagen hospitalisatie), tenslotte persisterende diarree en diarree bij immuungecompromitteerde patiënten.
- Gezien de meeste episodes van diarree zelflimiterend of viraal zijn, en gezien ze in bijna de helft van de gevallen kortdurend (minder dan één dag) zijn, is

microbiologisch onderzoek binnen de 24 uur na aanvang van klachten meestal niet nodig en volstaat supportieve therapie.

- Gezien de meeste darmpathogenen een incubatietijd hebben van 24-72 uur, wordt diarree die ontstaat tijdens de eerste drie dagen van hospitalisatie, aangepakt als community-acquired diarree. Talrijke pathogenen kunnen hiervan de verwekker zijn. In eerste instantie wordt hier een klassieke faeces cultuur uitgevoerd. Bij bloederige diarree moet E. coli O157:H7 uitgesloten worden. Bij recent antibioticagebruik of chemotherapie ook C. difficile uitsluiten.
- Bij nosocomiale diarree moet infectie met *C. difficile* uitgesloten worden. Vaak is nosocomiale diarree niet infectieus van oorzaak (medicatie-gerelateerd of tgv toediening van parenterale voeding).
- In geval van persisterende diarree moeten parasieten uitgesloten worden (in eerste instantie Giardia, Cryptosporidium, Isospora belli en Cyclospora)
- Integreren van klinische en epidemiologische eigenschappen in algoritme blijft een uitdaging.
- Hoewel de aanwezigheid van fecale leucocyten of lactoferrine een inflammatoire diarree suggereren is er onenigheid over het gebruik van deze testen in de initiële evaluatie van patiënten met community- of hospital-acquired diarree.

Interessante klinische en epidemiologische gegevens die mee de het verder beleid kunnen sturen:

- Karakteristieken van stoelgang (waterig, bloederig, muceus, purulent…)
- Aanwezigheid van dysenterie symptomen (koorts, tenesme, bloed of etter in de stoelgang)
- Verblijf in kribbe, of er tewerkgesteld
- Consumptie van onveilig voedsel
- Voorgeschiedenis van reis + bestemming
- Recent gebruik van medicatie (antibiotica)
- Onderliggend lijden met predispositie vooor diarree (HIV)
- Beroep (voedselketen, gezondheidszorg)

Diarree bij HIV-geïnfecteerden

Diarree was een frequente complicatie van HIV infectie. In de Verenigde Staten was chronische diarree (tenminste 28 dagen) vóór de periode van antiretrovirale combinatietherpapie (HAART) verantwoordelijk voor 17 % van de nieuwe AIDS-diagnoses bij the Centers for Disease Control and Prevention.

Het gebruik van HAART heeft tot een dramatische afname van de incidentie van diarree en andere opportunistische infecties geleid. Diarree bij HIV-patiënten is vaak infectious van oorzaak. Ook andere opportunistische aandoeningen (lymfoom, Kaposi sarcoom), antiretrovirale middelen (nelfinavir) kunnen diaree veroorzaken.

De verwekkers van infectieuse diarree kunnen variëren afhankelijk van de graad van immuunsuppressie. Virulente kiemen, die diarree veroorzaken bij gezonde gastheren, worden

teruggevonden bij HIV-patiënten met nog intacte of gecompromitteerde immunologische afweer. Bij verder gevorderde HIV-infectie of AIDS gaan ook minder virulente kiemen in staat zijn diarree te veroorzaken.

	CD4 <200 cellen /ul	CD4 >200 cellen /ul
Bacteriën	Enteroaggreg. E. coli	Salmonella
	Mycobacteria (MAC, TB)	Campylobacter
Parasieten	Cryptosporidia	Cryptospordia
	Microsporidia	Isospora
Viraal	Cytomegalovirus	Rotavirus
	Herpes simplex virus	Calicivirus

UpToDate: Diarrhea in HIV-infected individuals

Vroeger werd soms gekozen voor een conservatieve benadering van diarree bij HIV, gezien de geringe kans de pathogeen te identificeren, de detectie van organismen met een dubieuse pathogeniciteit, de slechte prognose van AIDS, het gebrek aan evidentie dat verder onderzoek tot verbetering van de levenskwaliteit zou leiden. Dankzij HAART is de prognose van HIV sterk verbeterd. Verbetering van de immunolgische toestand heeft ook geleid tot genezen van chronische diarree zelf, veroorzaakt door pathogenen zoals microsporidia en cryptosporidia. Bini *et al* (1999) toonden aan dat een stijging van de CD4 cellen (minstens 50/ul stijging) leidde tot een genezing van chronische diarree in 87%. Diarree komt terug bij falen van antiretrovirale therapie.

Een stapsgewijze benadering van chronische diarree bij HIV-patiënten wordt aangeraden: met eerst anamnese en klinisch onderzoek (associatie met protease inhibitor), vervolgens onderzoek van faeces en tenslotte endosopie (cfr bijlage 2). Dit om de kans te verhogen elke behandelbare oorzaak van diarree op te sporen.

De Swiss HIV Cohort Study (Weber R *et al*, 1999) volgde prospecief 1933 HIV-patiënten, gedurende 25.5 maanden (mediaan). De epidemiologie van darmpathogenen geassocieerd met diarree, eveals de opbrengst van faeces onderzoek en endoscopie werden bestudeerd, naar aanleiding van 560 episodes van diarree. Onderzoek van faeces bestond uit bacteriële cultuur, ova en parasieten (ook opzoeken van microsporidia en cryptosporidia). Bij chronische diarree werden ook Clostridium difficile, mycobacteriën, en Strongyloides larven opgezocht. Bij persisterende diarree werden 2 bijkomende faeces staaltjes geanalyseerd. Darmpathogenen werden geïdentificeerd bij acute diarree in 16.5 % , in 46 % bij chronische diarree (vanaf 4 weken). Diarree en identificatie van pathogenen (microbiologie/endoscopie) was sterk geassocieerd met zware immuundeficiëntie (CD4 < 50 /ul). Stoelgansonderzoek had minstens dezelfde sensitiviteit als histologisch /EM onderzoek van darmweefsel, uitgezonderd voor Leishmania en cytomegalovirus.

Microsporidiose:

- Verwekker van opportunistische infecties
- Wereldwijd voorkomen
- Humane pathogenen: vooral *Enterocytozoon bieneusi, ook Encephalitozoon species*
- HIV-patiënten: chronisch diarree, vooral bij CD4 < 100 cellen/ul; Meestal waterige diarree met abdominale krampen, evt wasting, nausea en malabsorbtie; asymptomatische infectie mogelijk
- ook bij orgaantransplant patiënten
- reizigers, ouderlingen ook vatbaar
- transmissie: feco-oraal, evt via urine;
- Symptomen: vooral diarree, ook respiratoir, genito-urinaire symptomen, afhankelijk van species
- R/ naast antiparasitaire therapie (albendazole voor Encephalitozoon, vaak chronische behandeling) is verbetering immunologisch antwoord belangrijk voor volledig herstel.
- Diagnose: geen effectieve concentratietechnieken, kleine spore (0.8-4um)
  gemodifieerde trichroomkleuring of chemofluorescentie technieken (Uvitex 2B, FungiFluor, Calcofluor white)
  gouden standaard is elektronenmicroscopie (EM); Sensitiviteit van gemodifieerde trichroomkleuring en Calcofluor tov EM 100 %, specificiteit 83 en 77 %.

Cryptosporidiose:

- In 1976 voor het eerst beschreven als oorzaak van gastro-intesinale pathologie bij de mens. Momenteel wordt Cryptosporidium beschreven als een belangrijke verwekker van diarree, zowel bij de immuuncompetente als de immuungecompromitteerde gastheer. Bij de mens vooral C. parvum.
- Klinisch beeld kan variëren van asymptomatische infectie, milde waterige, diarree, tot ernstige enteritis. Diarree is vaak geassocieerd met anorexie, malaise, nausea en abdominale krampen. Het risico op ernstige of chronische diarree is verhoogd bij patiënten met cellulaire of humorale immuundeficiëntie, waaronder HIV, orgaantransplantatie, immuunsuppressiva, IgA deficiëntie en hypogammaglobulinemie.
- Bij HIV veroorzaakt Cryptosporidium zelflimiterende infecties bij patiënten met CD4 > 200/ul, bij dalen van CD4 cellen vaak chronische diarree met wasting. Volumineuse, waterige diarree is ook mogelijk. Immunologisch herstel is belangrijk voor genezing
- Jonge kinderen vaak getroffen
- Extra-intestinale aantasting: galblaas en pancreas (acalculeuse cholecystitis, scleroserende cholangitis, pancreatitis), luchtwegen (bilaterale pulmonaire infiltraten)
- Transmissie: via faeco-orale route (binnen huisgezin, kribbe, gezondheidsinstelling), of via fecaal gecontamineerd water of voedsel. Gecontamineerd drink- of zwemwater, is verantwoordelijk voor reizigersdiarree en outbreaks in de gemeenschap. Oocysten zijn zeer infectieus, en weerstandig aan vele desinfectantia, ook aan chloor.
- Geexcreteerde oocysten hebben geen verdere maturatie nodig voor infectiviteit; Volledige levenscyclus wordt volbracht binnen dezelfde gastheer.
- Diagnose: -oöcysten 4-6 um
  -gemodifieerde zuurvaste kleuring van faeces, auramine / safranine
  -EIA of DFA (Direct fluorescent antibody assay);

Gezien het aantal oocysten in faeces niet constant is, wordt aangeraden drie stalen te onderzoeken. Verhoogde kans tot detectie in losse stoelgang en bij concentratie van faeces.

- Samen met Giardia lamblia: frekwentste parasitaire darmpathogeen bij de mens; wereldwijd voorkomen.

Isospora belli:

- samen met Cryptosporidium en Cyclospora: coccidiaire, unicellulaire protozoa; minst frequente van de drie
- wereldwijd voorkomen, vooral bij immuungedeprimeerden; ook in outbreaks
- klinische manifestatie: - niet-bloederige diarree, steatorree, koorts, eosinofilie; zelflimiterend bij immuuncompetente patiënten
  - chronische diarree met relapse bij AIDS-patiënten (cfr cryptosporidiose)
- diagnose: gemodifieerde zuurvaste kleuring, safranine kleuring of fluorescentie technieken
- immuunreconstitutie belangrijk, naast specifieke therapie (oa trimethoprim-sulfamethoxazole)

<u>Immuungecompromitteerde patiënten en parasitaire infecties:</u>

Bij patiënten onder immuunsuppressie na orgaantransplantatie, gebruik van corticosteroiden, AIDS-patiënten ea, kunnen zowel de klassieke darmpathogenen als minder gewone pathogenen, verwekkers zijn van diarree. Infectie in deze populatie kan ernstiger verlopen, met een hogere kans op complicaties en minder goede therapierespons.
Naar lokalisatie kunnen opportunistische parasitiare pathogenen bij de immuun-gecompromitteerde gastheer, als volgt ingedeeld worden:

In weefsels:
Pneumocystis species: pneumonie, gedissemineerde infectie
Toxoplasma gondii: koorts, gedissemineerde infectie, encefalitis
Leishmania sp.: koorts, hepatosplenomegalie, adenopathieën, viscerale leishmaniase
Entamoeba histolytica: koorts, malaise, leverabces

In darm en weefsels:
Microsporidia: diarree, aantasting van longen, darmen en nieren
Strongyloides stercoralis: diarree, buikpijn, gedissemineerde infectie, sepsis
Cryptosporidium parvum: diarree, galwegen, longen

In darm:
Isospora belli: diarree, buikpijn
Giardia lamblia: diarree, malabsorbtie, predispositie bij hypogammaglobulinemieeën

Betreffende intestinale parasieten, is het van belang Strongyloides stercoralis uit te sluiten bij transplantkandidaten:

- Bij voorgeschiedenis van verblijf in endemische regio (Zuidoost-Azië, Latijns-Amerika, subsaharisch Afrika, zuidoostelijke staten van USA, ook Turkije, Noord-Italië)
- Bij onverklaarde eosinophilie
- Chronische infectie: onopvallend, of met cutane symptomen (larva currens), gastro-intestinale symptomen (abdominale opzetting, diarree, nausea, anorexie), of pulmonaire symptomen (hoest, kortademigheid); symptomen kunnen jaren persisteren
- Diagnose: - detectie van larven in faeces: moeilijk, gezien de worm load in de darmen vaak laag is, met weinig larven in de faeces. Herhaald onderzoek (3 stalen) kan sensitiviteit verhogen tot 50% ; Hogere opbrengst na concentratie, larven vaak moeilijker te onderscheiden. Speciale technieken (Baermann methode, cultuur) zelden toegepast in routine laboratoria
  - serologie: EIA met sensitiviteit en specifiteit van > 90 %
  - beiden zijn complementair - bij recente infecties nog geen AS aantoonbaar
- levenscyclus: larven penetreren de huid, migreren via de bloedbaan naar de longen, vanuit de alveolen klimmen ze op via de luchtwegen, worden ingeslikt en matureren in duodenum en jejunum. Volwassen wormen kunnen 5 jaar leven. Vrouwtjes leggen eitjes, die tot niet-infectieuse larven ontwikkelen. Deze larven en eitjes komen in de faeces terecht. Larven kunnen echter ook tot infectieuse vormen matureren binnen de gastro-intestinale tractus. Via penetratie van de perianale huid of colonmucosa wordt een cyclus van autoinfectie volbracht, wat kan leiden tot hyperinfectie en gedissemineerde ziekte met bacteriëmie en meningitis (zeer belangrijke mortaliteit).
- Vóór het starten van immuunsuppressiva (ook corticosteroiden), Strongyloides uitsluiten (indien verblijf in endemisch gebied in VG). Immuunsuppressie risicofactor voor hyperinfectie! Ook bij HTLV- en HIV-infectie; vooral serologie gebruikt
- R/ thiabendazole, ivermectin

Reizigersdiarree

Het risico om reizigersdiarree op te lopen is reëel, en sterk afhankelijk van de reisbestemming. Globaal gezien kunnen drie risicoklassen onderscheiden worden:

- Laag risico (< 10 %): Europa (behalve mediterraan gebied), Australië en Nieuw-Zeeland, Verenigde Staten, Canada en Singapore.
- Matig risico (10 tot 20 %): Caraiben, Zuid-Afrika, Middelands Zee gebied
- Hoog risico (> 30 %): Azië (Singapore uitgezonderd), Afrika (Zuid-Afrika uitgezonderd), Mexico, Zuid- en Centraal-Amerika.

Meestal zal reizigersdiarree acute diarree zijn, die 5 tot 10 dagen kan duren. Verwekkers zijn vaak bacteriën. Intestinale parasieten zijn maar in een gering percentage aantoonbaar bij acute reizigersdiarree (Ryan E.T. et al, N Eng J Med 2002 (347)7:505-516).

Acute diarree (<2 weken)	verwekkers	
Viraal	Calicivirussen (Norwalk), rotavirus, enterovirus	5 tot 10 %
Bacterieel	enterotoxigene E. coli, Campylobacter jejuni, Shigella species, Salmonella species, Vibrio, Aeromonas, Pleisiomonas, Clostridium difficile	50 tot 75%
Parasitair	Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Entamoeba histolytica, Cyclospora cayetensis, Isospora belli	tot 5 %

Bij chronische diarree daarentegen zijn parasieten wel belangrijke verwekkers. Risicofactoren voor het oplopen van parasieten zijn niet goed gedefinieerd. Lengte van verblijf, hygiëne en socio-economische ontwikkeling van het gastland spelen een rol. De belangrijkste parasieten zijn Giardia, Cryptosporidium en Entamoeba histolytica. Daarnaast spelen ook Microsporidia, Isospora belli en Cyclospora cayetensis een rol.

Chronische diarree	verwekkers	
Bacterieel	cfr supra; ook Yersinia enterocolitica, M. tuberculosis, M. avium complex, Tropheryma whippelii	zeldzaam
Fungi	Histoplasma capsulatum	zeldzaam (resp. symptomen)
Parasitair	Microsporidium	immuundeficiëntie
	Gardia lamblia	**tot 30%**
	Entamoeba histolytica	bloederige diarree met koorts
	Cryptosporidium parvum	waterige diarree
	Isospora belli	eosinophilie
	Cyclospora cayetensis	waterige diarree, braken, koorts, residuele moeheid en anorexie
	Dientamoeba fragilis	pathogeniciteit?
	Wormen (Strongyloides, Schistosomen..)	zeldzaam, meestal hoge ‘burden’

Cyclospora:
- recent geïdentificeerd als verwekker van diarree (reizigers, AIDS-patiënten, food-borne outbreaks in USA)
- diagnose: gemodifieerde zuurvaste kleuring of fluorescentie technieken; dd Cryptosporidium (cysten Cyclospora 8 tot 10 um)
- transmissie: person-to-person onwaarschijnlijk, gezien geëxcreteerde oocysten zeven dagen nodig hebben alvorens infectieus te zijn; via water, voedsel
- klinische manifestatie: asymptomatisch, zelf-limiterende episode van diarree, aanslepende diarree met anorexie en klachten bovenste GI-tractus (AIDS-patiënten: cfr Isospora en Cryptosporidium)
- therapie: trimethoprim-sulfamethoxazole

Dientamoeba fragilis:
- behoort tot de protozoaire flagellaten, zoals Trichomonas; tot nog toe geen cyste vorm gekend; Trofozoiet: polymorf voorkomen, 5-15 um, 1 of 2 kernen met 4-6 granules
- pathogeniciteit lang betwijfeld; symptomen van diarree en abdominale pijn, ook nausea, braken en anorexie geassocieerd met Dientamoeba fragilis; eosinofilie
- wereldwijd voorkomen
- milde/ subklinische infectie tijdens kinderjaren: in Canadese studie vertoonden 91 % van gezonde kinderen antistoffen (Chan F. *et al,* 1996)
- diagnose: fixatie en permanente kleuring (trichroom), zoniet geen detectie van fragiele trofozoiet; drie stalen bekijken, zowel gevormde als losse faeces.
- Transmissie? Vaak samen met Enterobius vermicularis

Entamoeba histolytica/dispar:
- E. histolytica verantwoordelijk voor amoeben dysenterie
- E. dispar niet pathogeen
- diagnose: E. histolytica morfolgisch niet te onderscheiden van E. dispar, wel dmv PCR, antigendetectie (sens. 90 %) en serologie (sens. 70-90 %); Serologie blijft jaren positief, probleem in regio's met hoge seroprevalentie om onderscheid tussen oude/nieuwe infectie te maken
- kliniek E. histolytica: -asymptomatisch (evolutie naar invasieve ziekte mogelijk)
  -amoeben dysenterie (weken aanslepende abdominale krampen, gewichtsverlies, bloederige of waterige diarree)
  -zz: acute necrotiserende colitis, toxisch megacolon, perianale ulceratie, leverabces
- Onderscheid belangrijk: E. dispar verantwoordelijk voor meerderheid van 'E. species' infecties; E. histolytica pathogeen en moet behandeld worden

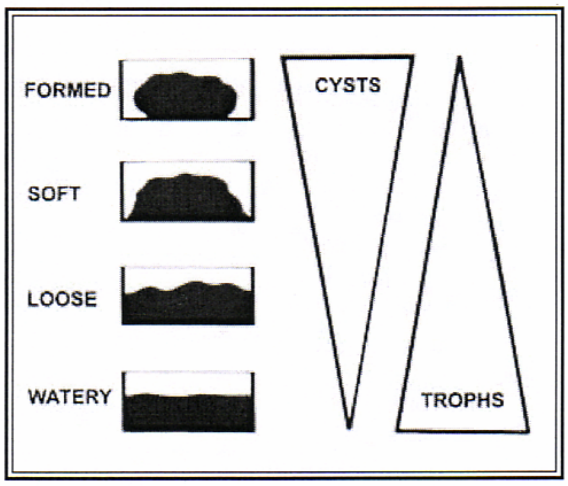
Deel 2: Optimale voorwaarden voor opzoeken van parasieten in faeces

(NCCLS, M28-A, 1997; CDC, 2003; ASM, 2004)

Een van de belangrijkste stappen bij het diagnosticeren van parasieten in faeces is de correcte staalcollectie. Zo er niet voldaan wordt aan deze voorwaarden, zal het staal van weinig diagnostische waarde zijn.

Collectietijden en aantal stalen: Gezien parasieten intermittent (cyclische basis) en in wisselende aantallen aanwezig zijn, is collectie van 3 stalen over een periode van 7-10 dagen aangewezen (elke dag, om de twee dagen). Vermijd collectie van meer dan 1 staal op dezelfde dag. Voor de diagnose van amoebiasis worden zelfs 6 stalen aangeraden, dit wordt owv kost zeldzaam uitgevoerd.

Tijdsframe voor onderzoek: Voor het vinden van beweeglijke protozoa is het bekijken van verse preparaten nodig. Afhankelijk van de consistentie, moeten de stalen binnen de 30 minuten na produktie bekeken worden (vloeibare stalen), binnen het uur (zacht, half-gevormd) of binnen dezelfde dag (gevormde stalen). Indien deze tijden niet haalbaar zijn, moet gekozen worden voor gebruik van een fixeermiddel. Hoewel het bewaren van het staal in de koelkast de deterioratie van de parasieten zal vertragen, wordt het bewaren van de trofozoiet morfologie het best gegarandeerd bij gebruik van bewaarmiddel.



Distributie van protozoa in verhouding tot consistentie van stoelgang (CDC, 2003)

Uitgedroogde stalen komen niet in aanmerking voor analyse. Voer geen analyses uit wanneer het staal uitdroging vertoont aan de oppervlakte of randen.

Interfererende substanties: Bepaalde substanties en medicaties kunnen interfereren met de detectie van parasieten, voornamelijk minerale olie, bismuth, barium, antibiotica, antimalaria middelen en niet-absorbeerbare antidiarreica. Wacht bij gebruik van deze middelen 7 dagen alvorens collectie uit te voeren .

Staalcollectie: Gebruik een goed sluitende container met een brede opening. Vermijd contaminatie met urine of water. Veel antigendetectie-assays kunnen uitgevoerd worden op faeces in fixeermiddel (5 of 10 % formaline, SAF). Compatibiliteit van specifieke kits nakijken. Er is geen maximum limiet voor de te collecteren hoeveelheid faeces. Tracht minimaal enkele grammen te collecteren (theelepeltje), dit om uitdroging te voorkomen.

'3-day-rule': De opbrengst van faeces cultuur en faeces parasieten voor patiënten die langer dan drie dagen gehospitaliseerd waren, werd door verschillende groepen nagekeken (Siegel *et al*, 1990; Morris *et al*, 1996; Fan *et al*, 1993). Hieruit bleek dat de opbrengst in deze populatie

uitermate laag is. Anderzijds is in deze populatie het zoeken naar C. difficile-geassocieerde diarree wel zinvol. In 2002 toonde een Portugese studie (Hänscheid *et al*) aan dat een '5-day-rule' in hun setting een betere optie was. Analyses aangevraagd voor het weekend werden vaak pas gecollecteerd na het weekend. Ook in een pediatrische populatie (Church et al, 1995) bleven routine faeces culturen negatief. Hier werd een grens van 4 dagen gehanteerd. Een recente pediatrische studie toonde eveneens de minimale opbrengst van klassieke faeces cultuur na 3 dagen hospitalisatie (Zaidi *et al*, 1999). Bauer *et al* (2001) stellen in een Europese multicenter studie een 'modified 3-day –rule' voor mbt enteropathogenen bacteriën naast C. difficile: patiënten 65 jaar met comorbiditeit, HIV-geïnfecteerde patiënten, patïenten met neutropenie, igv van andere manifestaties van intestinale infecties of bij het vermoeden van nosocomiale outbreaks wordt klassieke faeces cultuur wel uitgevoerd, ondanks het feit dat klachten ontstonden na de eerste drie hospitalisatiedagen.
Alleszins blijkt uit deze studies dat overleg tussen labo en kliniek rond deze rejectiecriteria noodzakelijk is. Ook moeten deze exclusiecriteria op individuele basis herroepen kunnen worden (vb verder investigatie na een eerste negatief bevonden staal, vermoeden van een nosocomiale outbreak igv faecescultuur). Criteria moeten steeds bekeken worden in kader van specifieke situatie in een bepaald ziekenhuis.

Deel 3: Opsporen van parasieten in faeces: een veelheid aan methoden

Hier wordt een globaal overzicht gegeven van beschikbare methoden. Latere CATs zullen specifiek gewijd worden aan methodologie.

Eerst is er de macroscopische inspectie met aandacht voor consistentie, aanwezigheid van bloed, slijm, proglottiden, aarsmaden, wormen.. Een eerste indicatie over de aard van de infectieuse aandoenig kan zijn: vettig aspect van faeces bij verstoorde vetresorbtie (in het bijzonder Giardia lamblia), stinkende diarree met bloed en slijm vermengd bij amoebendystenterie.

De hoeksteen voor de detectie van intestinale parasieten is het microscopisch onderzoek. In Europa wordt meestal vertrokken van verse, ongefixeerde faeces. Rechtstreeks microscopisch onderzoek is de enige methode om vegetatieve stadia van parasieten op te sporen in verse ongefixeerde faeces. De structuur van de parasieten wordt niet aangetast, je krijgt een idee van de dichtheid van de parasieten. Deze methode is eerder ongevoelig (weinig startmateriaal), waardoor de pakkans klein is bij lage aantallen parasieten. Daarenboven is de tijdsmarge zeer klein tussen produktie en bekijken van vloeibare/ halfgevormde stalen (cfr supra), alvorens degeneratie van vegetatieve stadia optreedt.

Vervolgens wordt het staal geconcentreerd om protozoaire cysten en wormeneieren en larven op te sporen. Gezien de intermittente shedding van intestinale parasieten, is het wenselijk parasitologisch onderzoek te herhalen op stalen van verschillende dagen, bij voorkeur met 2-3 dagen tussentijd. Door het gebruik van concentratiemethoden worden zoveel mogelijk bacteriën, plantaardige resten en debris uit het staal verwijderd, waardoor het aantal eieren of cysten per microscopisch te onderzoeken preparaat toeneemt. Enerzijds zijn er de globale concentratiemethoden, waarbij alle eieren, cysten en larven min of meer gelijkelijk geconcentreerd worden. Daarnaast zijn er de parasiet-specifieke methoden, zoals de

Baermann-methode voor Strongyloides. Globale concentratiemethoden zijn gebaseerd op flotatie of op sedimentatie. Vegetatieve stadia worden hiermee niet gedetecteerd. Bij flotatie worden oplossingen met een hoog soortelijk gewicht gebruikt (zinksulfaat of suiker), waardoor cysten en lichte eieren op het oppervlakte gaan drijven en het debris naar beneden zinkt. Deze methode geeft propere preparaten, zwaardere eieren drijven echter niet. Sedimentatie gebruikt oplossingen met een laag soortelijk gewicht, waardoor grote partikels relatief snel sedimenteren en gescheiden worden van bacteriën en andere kleine deeltjes. Formaline-ether (of formaline-ethyl acetaat) concentratiemethoden (zoals de methode van Ritchie) gaan oppervlaktestructuren van cysten en eieren zodanig beïnvloeden dat ze relatief sterk hydrofiel worden. Faeces worden gehomogeniseerd in verdunde formaline. Na uitschudden met ether (of ethyl acetaat) en centrifigeren resulteert dit in een allround concentratie van eieren, larven en cysten. Het concentraat is goed te bewaren, het is een veilige (infectiegevaar) en snelle methode. Wanneer stalen voor langere tijd (enkele dagen) in formaline of SAF bewaard werden, gaat dit het concentrerend vermogen negatief beïnvloeden. De formaline-ether techniek (en afgeleiden) is de meest gebruikte techniek, dit omwille van de kleinere kans op technische fouten, de eenvoudigere uitvoerbaarheid en de grootste range van detecteerbare organismen.

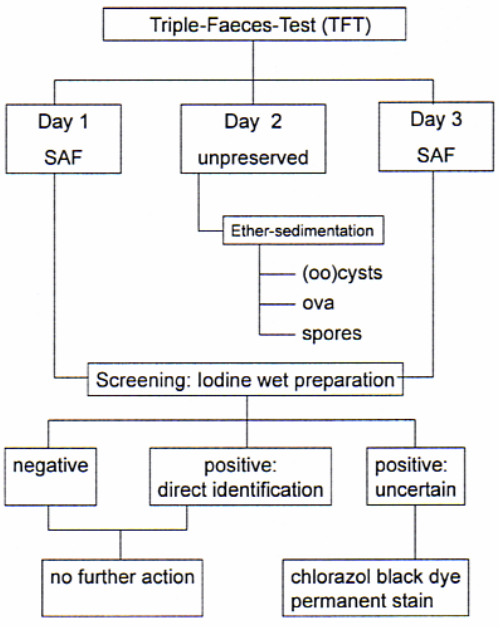
In de praktijk komt het faeces staal vaak pas na uren (of evt dagen) aan op het laboratorium. Dit maakt het rechtsreeks onderzoek om vegetatieve stadia op te sporen onbetrouwbaar. De compliance is vaak laag, wat maakt dat de uiteindelijke diagnose gesteld wordt vertrekkende van ėėn of twee stalen.

Om het probleem van morfologische deterioratie van vegetatieve stadia tegen te gaan, kan gewerkt worden met fixeermiddelen en permanente kleuringen, zoals in de Verenigde Staten en Nederland gebeurt. Verschillende fixeermiddelen zijn beschikbaar, met elk eigen voor- en nadelen en specifieke indicaties (cfr bijlage 3). Permanente kleuringen maken het mogelijk preparaten opnieuw te bekijken, expert advies in te winnen bij twijfel en zijn geschikt om cysten en trofozoïeten te bekijken. Kleine protozoa die vaak gemist worden bij rechtstreeks onderzoek en na concentratie worden wel zichtbaar met permanente kleuringen. Voorbeelden van permanente kleuringen zijn: Trichroom kleuring (snelle, eenvoudige procedure; verschillend aankleuren van kern en cytoplasma maakt detectie van organismen duidelijker), zuur-vaste kleuring (auramine kleuring, gemodificeerde Kinyoun, gemodifieerde Ziehl-Neelsen) voor Cryptosporidium parvum, Isospora belli en Cyclospora cayetenensis, ijzer-hematoxyline kleuring (complex, gebruikt voor de originele beschrijving van intestinale parasieten; zuurvaste stap ingebouwd), chromotrope kleuring (Microsporidium), Chlorazol zwart (eenvoudig)…Nadeel van fixatie en permanente kleuring is de vereiste expertise om de preparaten te beoordelen. Gefixeerde stalen zijn niet geschikt voor PCR, opsporen Microsporidium, minder geschikt voor copro-antigen testen.

Andere technieken (Direct Fluorescent Antibody assay, EIA) maken gebruik van monoclonale antistoffen om parasieten in faeces (of andere specimens) op te sporen. Deze procedures zijn ontwikkeld om een welbepaald species te detecteren (Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Cryptosporidium parvum). Hoewel ze duur zijn, kunnen ze nuttig zijn bij bepaalde infecties door de verhoogde sensitiviteit, specificiteit en tijdswinst. Mank *et al* (1997) toonden aan dat EIA voor giardiasis bijna even gevoelig is als microscopie op twee sequentiële stalen.

Ook moleculaire diagnostiek (PCR) kan aangewend worden, in dit kader voor identificatie van Entamoeba species, ook voor detectie en identificatie van Microsporidium. Blessmann *et al* (2002) vergeleken real-time PCR met microscopie voor de detectie en differentiatie van Entamoeba histolytica en E. dispar. PCR was significant gevoeliger dan microscopie en PCR was 100% specifiek voor elk van de twee species. PCR resultaten werden niet beïnvloed door de aanwezigheid van andere Entamoeba species.

In een aantal Nederlandse studies wordt de conventionele manier (vertrekkende van verse, niet-gefixeerde faeces) vergeleken met permanente kleuring op gefixeerde faeces (vb Bami-doos). Zo ontwikkelde de groep van T. van Gool (Amsterdam) een diagnostische test, 'Triple Faeces Test' (TFT), bestaande uit twee SAF-gefixeerde preparaten en één ongefixeerd preparaat die tesamen ingeleverd worden. Een verhoogde sensitiviteit wordt bekomen omwille van drie aspecten: ten eerste fixatie direkt na produktie, drievoudige verzameling en permanente kleuring. Tussen microscopie en produktie verlopen vaak uren (3-10 uren, mediaan 6 uur; Mank et al, 1999), met nefaste gevolgen voor de vegetatieve stadia van darmparasieten, Dientamoeba fragilis (enkel vegetatieve vormen, die binnen het uur degenereren) en Blastocystis hominis. SAF (Sodium Acetate Acetic Acid Formaline) is eenvoudig in gebruik, kan gebruikt worden voor concentratie en is te combineren met verschillende kleuringen (ijzer-hematoxyline, Chlorazol zwart, niet trichroom kleuring).
Stalen van 544 consecutieve patiënten werden geïncludeerd. In 85% werd een exacte inlevering van 3 stalen gedaan. Hiervan werd in 72 % de SAF-gefixeerde preparaten enkel met jodium bekeken, ofwel werden de preparaten negatief bevonden, ofwel werd de parasieten direkt geïdentificeerd. Met de conventionele methode en met TFT, werden parasieten teruggevonden in 22.9 % en in 45 % van de stalen respectievelijk. Pathogene species werden 39 keer met de conventionele en 94 keer met TFT teruggevonden. De extra tijd nodig voor een TFT na te kijken tov één vers faeces staal bedroeg 14 minuten, de extra kost aan materiaal 2.2 euro per patiënt.



Laboratory handling of the Triple Faces Test (TFT)

Deel 4: Opsporen van parasieten in faeces: wat kan er in de praktijk aangeboden worden?

Met betrekking tot microbiologisch faeces onderzoek, beschikken we over volgende analyses: cultuur faeces, C. difficile cultuur en toxine , opsporen van parasieten in faeces, opsporen van virussen.

In 2004 werd de analyse 'parasieten in faeces' 1778 keer uitgevoerd. Aanvragen waren afkomstig van 70 eenheden, met als drie belangrijkste aanvragers: consultatie algemene interne geneeskunde, spoedgevallen en consultatie pediatrie (zie bijlage 4).
Voor 2004 werden 106 parasieten gedetecteerd in 86 stalen, en dit bij 67 patiënten. Dit resulteert in 4.8% positieve stalen. Hiervan ging het in 36/106 over evt pathogene parasieten: 1 Cryptosporidium, 2 Taenia, 25 Giardia Lamblia, en tenslotte 8 Entamoeba histolytica (dd E. dispar). De overige parasieten waren: Chilomastix mesnili (1), Endolimax nana (26), Entamoeba coli (27), Entamoeba hartmanni (11) en Iodamoeba bütschlii (5)(zie bijlage 5). Van de 67 patiënten waarbij parasieten gevonden werden, waren 36/67 afkomstig van van E409, 8/67 van E302 en 7/67 van E595. Van de 67 patiënten, waren er 50 waarvan maar 1 staal is onderzocht. Voor 12 patiënten waren er twee stalen voor handen (waarvan zeven 1 positief en 1 negatief staal; de overige 5 twee positieve stalen).
Tegenover de voorbije jaren, is er een dalende trend waar te nemen in het aantal analyses: waar het aantal aanvragen 2327 was in 2001 en 2002, 2111 in 2003, waren het er 1778 in 2004. De meeste aanvragen gebeurden in de maanden: juli-augustus, ook januari en december. In de periode april-juli was de opbrengst het hoogst (6.5-8.2 %).

Parasieten opsporen in faeces, bestaat hier uit microscopisch onderzoek na concentratie (Ritchie methode), aangevuld met auramine of safranine kleuring na expliciete vraag voor opzoeken van Cryptosporidium of bij microscopisch onderzoek verdacht voor Cryptosporidium. De kostprijs aan het labo voor opzoeken van parasieten in faeces bedraagt 7.44 euro (goederen, logistiek en loonkost), bijkomende Cryptosporidiumkleuring 8.40 euro.

Rekening houdend met bestaande richtlijnen, is het nuttig selectief te werk te gaan bij faeces onderzoek. Daarnaast zijn er de omstandigheden waaronder parasieten onderzoek niet optimaal zijn (cfr punt 2).

- Onderzoek naar parasieten heeft een plaats in:
  - -onderzoek van aanslepende diarree buiten het ziekenhuis (community-acquired, reizigers, immuungecompromitteerde patiënten)
  - -niet bij investigatie van diarree bij patiënten langer dan 3 dagen gehospitaliseerd; kan evt wel bij verdere investigatie van community-acquired diarree.
  - - niet bij patiënten onder antibiotica
  - -opsporen van Clostridium difficile, samen met parasitologisch onderzoek, lijkt weinig aangewezen
  - - opsporen van virussen en parasieten weinig aangewezen. Sneltest van adeno- en rotavirus resultaat is binnen 24 uur geweten, in geval staal rechtstreeks naar virologie gaat.

- Het zou nuttig zijn om over een aantal parameters te beschikken bij aanvraag voor parasietenonderzoek:
    - reiziger, bestemming
    - immuungecompromitteerd (HIV, transplant)
    - recent AB-gebruik
    - recente hospitalisatie
- Bij immuungecompromitteerde patiënten, reizigers en kinderen in kribbes is het belangrijk Cryptosporidium steeds mee op te sporen. Te meer daar ook andere parasieten (Isospora belli en Cyclospora) die van belang zijn bij immuungecompromitteerden en reizigers hierdoor kunnen opgespoord worden.
- Bij klinische verdenking op amoebendysenterie en aanwezigheid van amoeben cysten in stoelgang kan PCR aangeboden worden, waarbij wel differentiatie mogelijk is tussen pathogene E. histolytica en niet-pathogene E. dispar. Deze PCR gebeurt in het Instituut voor Tropische Geneeskunde, en wordt momenteel elke twee weken uitgevoerd. Hiervoor vereist is vers stoelgangsstaal. Een andere mogelijkheid is serologie (ook ITG). De sensitiviteit van serologie voor E. histolytica is 70% -90 %. Specificiteit niet 100% (zz ook hoge titers bij E. dispar).
- Bij klinische verdenking van giardiasis met negatief microscopisch onderzoek kan best een tweede of derde staal bekeken worden. EIA, specifiek voor Giardia lamblia, is een andere mogelijkheid. Dit wordt verder onderzocht.
- Gezien de intermittente aanwezigheid van parasieten in faeces (cyclisch karakter, Giardia vooral thv duodenum), graag bij negatief parasitologisch onderzoek een tweede en derde staal, optimaal geproduceerd met 48 uur tussentijd, zeker afkomstig van verschillende dagen.
- Rechtstreeks onderzoek is weinig zinvol indien staal niet gefixeerd werd. Beperken tot vloeibare, etterige en bloederige stalen indien onmiddellijk na produktie naar het labo gebracht en direkt bekeken wordt.
- Bij transplantkandidaten moet Strongyloides uitgesloten worden indien risico gelopen op blootstelling (verblijf in endemisch gebied, evt jaren geleden). Serologie is voor handen in ITG (sensitiviteit 90% ; Elisa, antigen afkomsig van opgegroeide larven).
- Opsporen Microsporidiose: gezien deze pathogeen veel minder frequent problemen stelt sinds introductie van HAART, zal opsporen ervan nog sporadisch van toepassing zijn. Op vraag zou fluorescentie kunnen gebeuren.

<u>TO DO</u>

- op aanvraagformulier: parasieten opzoeken in faeces (**chronische** diarree)

- op aanvraagformulier: 4 velden: - reiziger
  - immuungedeprimeerd
  - recent antibioticagebruik
  - hospitalisatie sinds …

  momenteel nog geen mogelijkheid via KWS AB inname na te kijken

- contacteren van voorschrijvende clinicus indien ‘5-day-rule’ overschreden
  indien recent AB gebruik
  indien Clostridium difficile en parasieten samen zijn aangevraagd

- voor alle parasitologische onderzoeken Cryptosporidium opzoeken
- chronische diarree bij kinderen met negatieve investigatie (oa herhaaldelijk parasitologisch onderzoek) : recipiënt met SAF ter beschikking stellen (uitsluiten van Dientamoeba fragilis)
- bij detectie van E. histolytica: rapporteren 'E. histolytica/E. dispar'. Indien gewenst, kan staal doorgestuurd worden voor PCR.
- nakijken transplant protocols : Strongyloides stercoralis
- kwaliteitscontrole MLT die parasietenonderzoek uitvoert? Deelname externe kwaliteitscontroles (vb NEQAS)?

Bijlagen

Bijlage 1: Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea, Guerrant *et al*, CID 2001(32), 331-351.

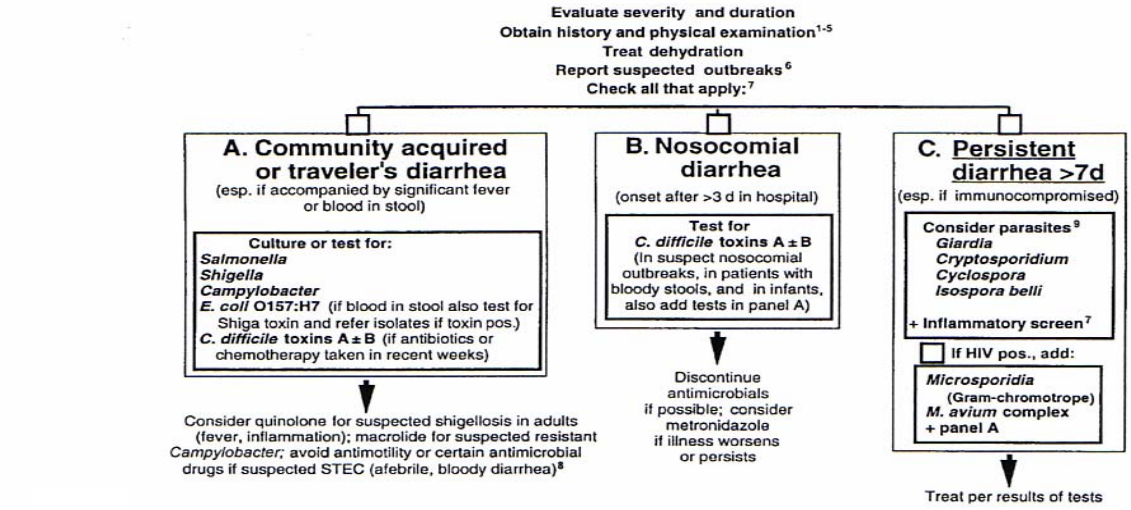
Summary of recommendations for managing infectious diarrhea.

Recommendation	Ranking[a]
Initiate rehydration (oral whenever possible)	A-I
Perform a thorough clinical and epidemiological evaluation for any significant diarrheal illness (profuse dehydrating, bloody or febrile diarrhea, or illness in infants, elderly, or immunocompromised patients). That is, ascertain how the illness began; stool characteristics (frequency and quantity); symptoms or signs of hypovolemia; travel history; whether the patient attends a day care center; whether the patient has ingested raw or undercooked meat, raw seafood, or raw milk; whether the patient's contacts are ill; the patients sexual contacts, medications, and other medical conditions, if any.	A-II
Perform selective fecal studies (as shown in figure 1)	B-II
Institute selective therapy for	
Traveler's diarrhea	A-I
Shigellosis	A-I
Campylobacter infection	B-II
Avoid administering antimotility agents with bloody diarrhea or proven infection with Shiga toxin–producing *Escherichia coli*	E-I
Selectively administer available vaccines[b] and, for travelers to (or residents of) areas where typhoid is endemic, administer typhoid vaccine (parenteral Vi or oral Ty21A)	B-II

[a] Letters indicate the strength of the recommendation and Roman numerals indicate the quality of evidence supporting it, respectively (see Table 1).

[b] Oral live (103 HgR) and killed (WCBS) cholera vaccines are available outside the United States for travelers to areas where cholera is endemic, although diarrhea is uncommon in careful travelers (B-II).

Bijlage 1 vervolg: Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea, Guerrant *et al*, CID 2001(32), 331-351.



Recommendations for the diagnosis and management of diarrheal illnesses. Pos., positive. [1]Seafood or seacoast exposure should prompt culture for *Vibrio* species. [2]Traveler's diarrheal illnesses that have not responded to empirical therapy with a quinolone or trimethoprim-sulfamethoxazole should be managed with the above approach. [3]Persistent abdominal pain and fever should prompt culture for *Yersinia enterocolitica* and cold enrichment. Right-side abdominal pain without high fever but with bloody or nonbloody diarrhea should prompt culture for Shiga toxin–producing *Escherichia coli* (STEC) O157. [4]Proctitis in symptomatic homosexual men can be diagnosed with sigmoidoscopy. Involvement in only the distal 15 cm suggests herpesvirus, gonococcal, chlamydial, or syphilitic infection; colitis extending more proximally suggests *Campylobacter, Shigella, Clostridium difficile,* or chlamydial (LGV serotype) infection, and noninflammatory diarrhea suggests giardiasis. [5]Postdiarrheal hemolytic uremic syndrome (HUS) should prompt testing of stools for STEC O157 and for Shiga toxin (send isolates to reference laboratory if toxin-positive but STEC-negative). [6]Outbreaks should prompt reporting to health department. Consider saving culture plates and isolates and freeze whole stools or swabs at −70°C. [7]Fecal lactoferrin testing or microscopy for leukocytes can help document inflammation, which is often present in invasive colitis with *Salmonella, Shigella,* or *Campylobacter,* with more severe *C. difficile* colitis, and with inflammatory bowel disease. [8]Some experts recommend avoiding administration of antimicrobial agents to persons in the United States with bloody diarrhea. [9]Commonly used tests for parasitic causes of diarrhea include fluorescence and EIA for *Giardia* and *Cryptosporidium;* acid-fast stains for *Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora,* or *Mycobacterium* species (as well as culture for *Mycobacterium avium* complex); and special chromotrope or other stains for microsporidia, as noted in the text.

Bijlage 2: Evalation of Chronic Diarrhea in Patients with Human Immundeficiency Virus Infection, Oldfield EC, Reviews in gastroenterological disorders, 2002, vol 2 (4): 176-188.

Stepwise Approach to Diagnosis of Chronic Diarrhea

Step 1: History and Physical Examination

Elicit history of association between the onset of diarrhea and institution of a protease inhibitor (diarrhea associated with protease inhibitors has ranged from 12%–56%).

- If association with protease inhibitor use, consider short treatment interruption (consult with referring physician)
- High reported response rates with calcium carbonate 500 mg b.i.d. or Viokase 325 mg with meals

---

Step 2: Stool Examination

Send 2 or 3 stools for:

- Routine culture for *Shigella, Salmonella, Campylobacter*
- Ova and parasite exam
- *Clostridium difficile* toxin
- Smears for acid-fast bacilli (AFB) and culture for *Mycobacterium avium* complex (MAC) (AFB smear will also detect cryptosporidia)
- Cryptosporidia enzyme immunoassay
- Weber's modified trichrome for microsporidia
- If febrile, routine blood culture and MAC blood culture

Step 3: Endoscopy

- Careful patient selection will increase yield (patients with weight loss, fever, and CD4 < 200 cells/mm³, especially < 50 cells/mm³)
- Full colonoscopy with ileoscopy

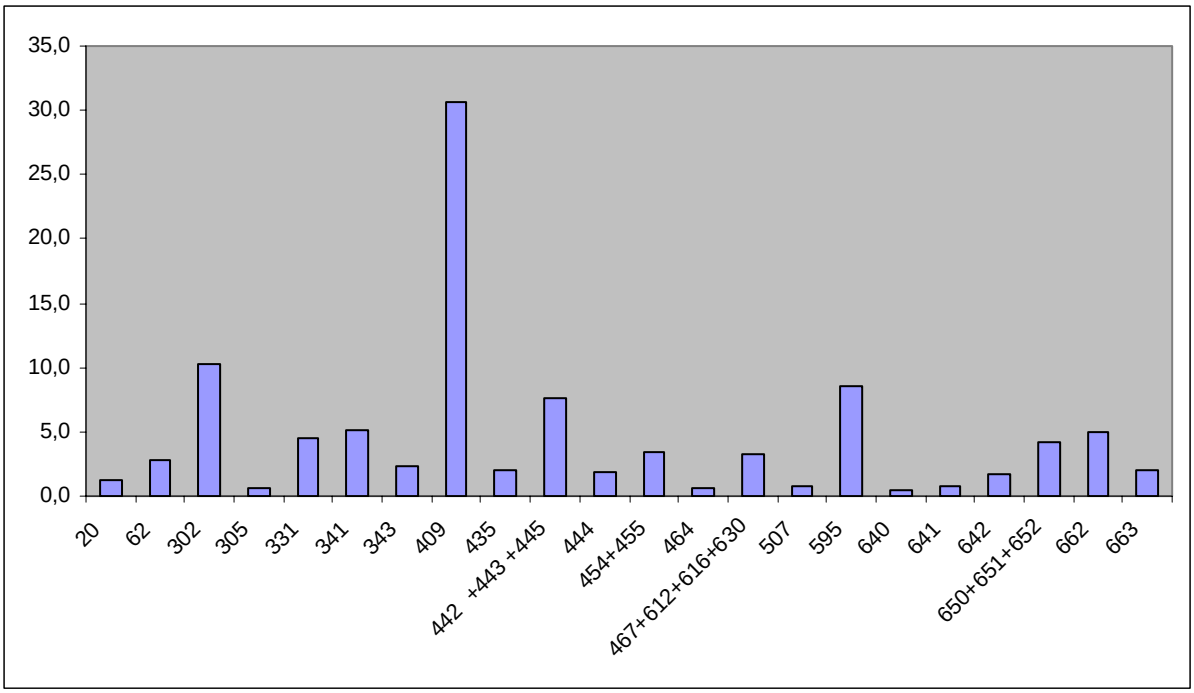
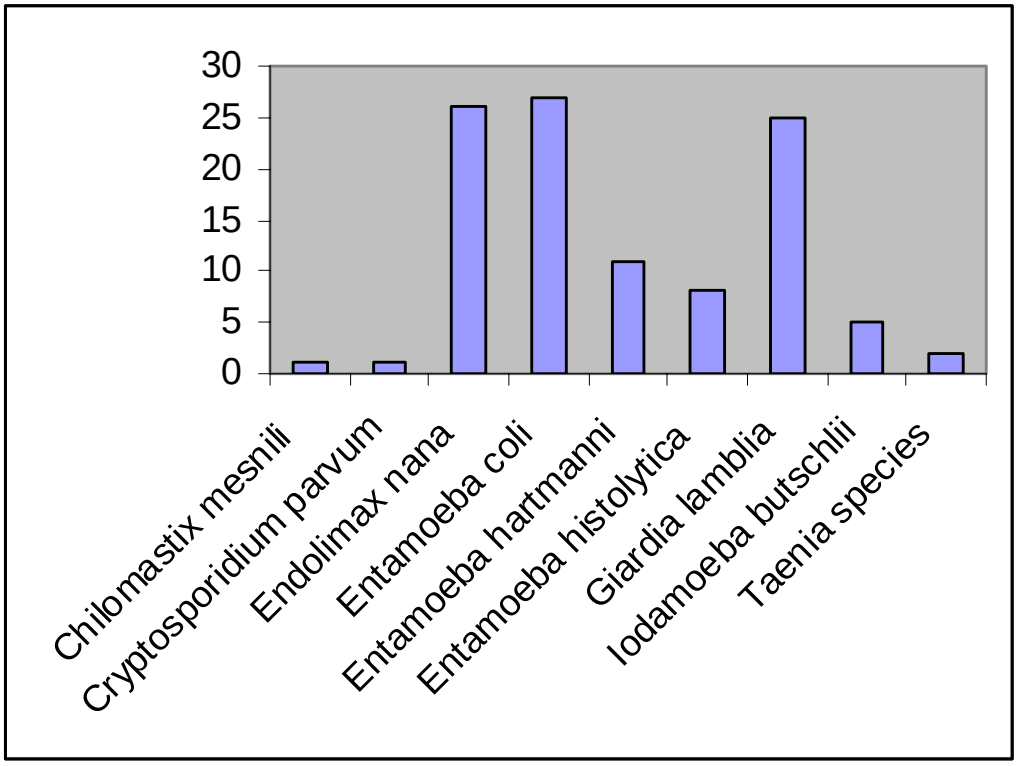
(Flexible sigmoidoscopy may miss up to 39% of cases of cytomegalovirus colitis; ileoscopy will detect many cases of microsporidiosis and may obviate need for upper endoscopy).

Bijlage 3: Overzicht van fixeermiddelen: voor- en nadelen (CDC, 2003)

Preservative	Advantages	Disadvantages
10% Formalin	■ All purpose fixative ■ Easy to prepare ■ Long shelf life ■ Good preservation of morphology of helminth eggs, larvae, protozoan cysts, and coccidia ■ Suitable for concentration procedures and epifluorescence microscopy ■ Suitable for acid-fast, safranin, and chromotrope stains ■ Compatible with immunoassay kits and epifluorescence microscopy	■ Not suitable for some permanent smears stained with trichrome ■ Inadequate preservation of morphology of protozoan trophozoites ■ Can interfere with PCR, especially after extended fixation time
MIF **(merthiolate-iodine-formaldehyde)**	■ Components both fix and stain organisms ■ Easy to prepare ■ Long shelf life ■ Useful for field surveys ■ Suitable for concentration procedures	■ Not suitable for some permanent smears stained with trichrome ■ Inadequate preservation of morphology of protozoan trophozoites ■ Iodine interferes with other stains and fluorescence ■ Iodine may cause distortion of protozoa
LV-PVA **(low viscosity polyvinyl-alcohol)**	■ Good preservation of morphology of protozoan trophozoites and cysts ■ Easy preparation of permanent smears stained with such as trichrome (solution both preserves organisms and makes them adhere to slides) ■ Preserved samples remain stable for several months	■ Inadequate preservation of morphology of helminth eggs and larvae, coccidia, and microsporidia ■ Contains mercuric chloride ■ Difficult and expensive to dispose of ■ Difficult to prepare in the laboratory ■ Not suitable for concentration procedures ■ Cannot be used with immunoassay kits ■ Not suitable for acid-fast, safranin and chromotrope stains
SAF **(sodium acetate-acetic acid-formalin)**	■ Suitable for both concentration procedures and preparation of permanent stained smears ■ Easy to prepare ■ Long shelf life	■ Requires additive (e.g., albumin-glycerin) for adhesion of specimens to slides ■ Permanent stains not as good as with PVA or Schaudinn's

	■ Suitable for acid-fast, safranin, and chromotrope stains ■ Compatible with immunoassay kits	fixative
Schaudinn's Fixative	■ Good preservation of morphology of protozoan trophozoites and cysts ■ Easy preparation of permanent stained smears	■ Less suitable for concentration procedures ■ Contains mercuric chloride ■ Inadequate preservation of morphology of helminth eggs and larvae, coccidia, and microsporidia ■ Poor adhesion of liquid or mucoid specimens to slides
Modified PVA ***copper or zinc***	■ Permanent smears can be made and stained with trichrome ■ Zinc is preferred over copper ■ No mercuric chloride	■ Staining not consistent ■ Organism morphology may be poor ■ Copper-morphology of cysts and trophozoites is poor ■ Zinc-better morphology but not comparable to LV-PVA
One-Vial Fixatives ***(such as Ecofix, Parasafe, Unifix, Proto-fix, STF, and others that may be available)***	■ Concentrate and permanent smear can be made out of one vial ■ Immunoassays can be done on most ■ No mercuric chloride	■ Certain one-vial fixatives must use certain stains ■ Color difference of stain ■ Staining not always consistent ■ Sometimes more expensive than formalin and LV-PVA

Bijlage 4: Aanvragende eenheden van 'parasieten in faeces' in 2004, procentueel weergegeven. (enkel eenheden met 8 aanvragen of meer in 2004 werden weerhouden).



Bijlage 5: Opbrengst 'parasieten in faeces' in 2004: 106 parasieten gedetecteerd