



PCR-fecesonderzoek bij gastro-enteritis

Samenvatting

Weel J, Schuurs T, Mulder B, Bruijnesteijn van Coppenraet L, Van der Zanden A, Van der Reijden W, Ruijs G. PCR-fecesonderzoek bij gastro-enteritis. *Huisarts Wet* 2015;59(7):297-301.

ACHTERGROND De polymerasekettingreactie (PCR) wordt steeds belangrijker in de diagnostiek van infectieuze diarree. De PCR-test is snel en sensitief, maar dit kan de interpretatie ook bemoeilijken. Er is weinig bekend over de prevalentie van de pathogenen bij gezonde mensen.

METHODE In een patiëntcontroleonderzoek deden vier regionale laboratoria PCR-fecesonderzoek bij 1515 patiënten met gastro-enteritis en 1195 gezonde controlepersonen. De inclusie vond plaats van medio 2010 tot eind 2012 door de bij de laboratoria aangesloten huisartsen, die fecesmonsters instuurden conform de indicatie in de NHG-Standaard Acute diarree. Patiënten en controlepersonen vulden vooraf een vragenlijst in.

RESULTATEN Van de patiënten had 93,1% diarree en 69,7% buikpijn. Andere klachten, zoals slijm of bloed bij de ontlasting, braken en koorts, werden opvallend minder vaak gerapporteerd. Vergeleken met de controlepersonen hadden patiënten significant vaker gereisd en antacida of antibiotica gebruikt. *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *Clostridium difficile*, *Shigella*/EIEC, ETEC, EAEC, aEPEC, *Cryptosporidium parvum/hominis* en *Giardia lamblia* werden bij patiënten significant vaker gevonden, maar niet in alle leeftijdsklassen. Deze micro-organismen werden ook vaak bij controlepersonen aangetroffen, vooral bij kinderen jonger dan 5 jaar. Voor tEPEC, EHEC en STEC was er geen verschil; *Dientamoeba fragilis* werd juist vaker aangetroffen bij controlepersonen dan bij patiënten.

CONCLUSIE Het aantonen van een bepaald pathogeen met PCR verklaart de klachten nog niet met zekerheid; bij de interpretatie zal altijd andere klinische informatie moeten meewegen. Een hoge DNA-load (lage Ct-waarde) geeft alleen zekerheid bij ETEC en *Salmonella*. Bij STEC/EHEC differentieert de PCR-test onvoldoende tussen pathogene en niet-pathogene varianten. Dat *Dientamoeba fragilis* vaker wordt aangetroffen bij gezonde mensen wijst erop dat het waarschijnlijk geen darmpathogeen is.

INLEIDING

Acute diarree komt veel voor en gaat vaak vanzelf over. De recentelijk herziene NHG-Standaard Acute diarree stelt dat diagnostiek meestal niet nodig is, maar adviseert de huisarts die toch besluit een eventuele infectieuze oorzaak op te sporen om naast de conventionele kweek en Triple Feces Test (TFT) ook moleculaire diagnostiek in te zetten, bij voorkeur de polymerasekettingreactie (PCR).¹

Sinds 2007 is PCR-fecesonderzoek steeds belangrijker geworden in de diagnostiek van infectieuze oorzaken van diarree. Een belangrijke stimulans gaf het onderzoek van De Boer, die in 2013 aantoonde dat laboranten in kweken van fecesmonsters significant vaker *Campylobacter jejuni* aantreffen als zij van tevoren al wisten dat die monsters *Campylobacter*-DNA

bevatten.² Dat PCR de sensitiviteit van de microbiologische diagnostiek heeft vergroot is prettig, maar zorgt ook voor hoofdbreken. Zo ging de prevalentie van *Dientamoeba fragilis*, een darmparasiet die bij kinderen vermoedelijk buikpijn kan veroorzaken, omhoog van 5-7% bij microscopische bepaling naar 25-30% bij PCR.³ Dit soort uitslagen leidt tot de vraag wat een positieve PCR-uitslag nu precies betekent voor de huisarts. Daarbij komt nog een andere vraag: artsen-microbiologen kijken bij PCR-diagnostiek niet alleen naar de aanwezigheid, maar ook naar de totale hoeveelheid DNA van een bepaald pathogeen in het monster. Hoe relevant is die DNA-load voor de huisarts bij bacteriële en parasitaire gastro-enteritis? Wil je daarover een uitspraak kunnen doen, dan moet je de PCR-uitslagen van patiënten met gastro-enteritis vergelijken met de uitslagen van controlepersonen zonder klachten.

Wij hebben geprobeerd antwoord op deze vragen te krijgen door middel van een patiënt-controleonderzoek bij huisarts-patiënten.

Wat is bekend?

- De polymerasekettingreactie (PCR) is de laatste tien jaar steeds belangrijker geworden in de diagnostiek van infectieuze oorzaken van diarree.
- De PCR-methode is sneller en sensitiever dan het standaardonderzoek met kweek en Triple Feces Test (TFT).
- Met PCR is niet alleen de aanwezigheid, maar ook de DNA-load van een bepaald pathogeen in het fecesmonster te bepalen.
- De waarde van PCR-fecesonderzoek is nog niet helemaal duidelijk, omdat er nog weinig bekend is over de prevalenties van de betreffende pathogenen in de gezonde bevolking.

Wat is nieuw?

- PCR-fecesonderzoek is zeer sensitief, maar moet voorzichtig geïnterpreteerd worden.
- Een hoge DNA-load (lage Ct-waarde) geeft alleen zekerheid bij ETEC en *Salmonella*.
- Bij STEC/EHEC differentieerde de in dit onderzoek gebruikte PCR-test onvoldoende tussen pathogene en niet-pathogene varianten.
- *Dientamoeba fragilis* is waarschijnlijk geen darmpathogeen.

Centrum voor infectieziekten Friesland Izore, Jelsumerstraat 6, 8917 EN Leeuwarden; dr. J.F.L. Weel, arts-microbioloog; dr. T. Schuurs, moleculair microbioloog. Isala Klinieken, Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten (LMMI), Zwolle; dr. L.E.S. Bruijnesteijn van Coppenraet, moleculair microbioloog; dr. G.J.H.M. Ruijs, arts-microbioloog. LabMicta, laboratorium voor medische microbiologie en infectieziekten voor Twente en de Achterhoek, Enschede; dr. A.G.M. van der Zanden, moleculair microbioloog; dr. B. Mulder, arts-microbioloog. Streeklaboratorium Kennemerland, Haarlem; dr. W. van der Reijden, moleculair microbioloog • Correspondentie: jan.weel@izore.nl • Mogelijke belangenverstrengeling: niets aangegeven.

Dit onderzoek is eerder gepubliceerd als: Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Dullaert-de Boer M, Ruijs CJ, Van der Reijden WA, Van der Zanden AG, Weel JF, Schuurs TA. Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:592.e9-19. Deze bewerking is speciaal toegesneden op de huisartsen in Nederland. Publicatie gebeurt met toestemming van de uitgever.

Tabel 1 Kenmerken van het onderzoek bevolking en gegevens ontvangen van vragenlijsten

Kenmerk	Patiënt	%	Controle	%
Leeftijd				
■ < 5 jaar	152/1515	10,4	104/1185	8,8
■ 5-20 jaar	313/1515	20,6	208/1185	17,4
■ 21-50 jaar	557/1515	36,8	445/1185	37,5
■ >50 jaar	493/1515	32,2	428/1185	36,1
Man	651/1515	43,0	518/1195	43,3
■ Recent bezoek buitenland	226/1514	14,9	72/1194	6,0*
■ Gezinsleden met gastro-enteritis	221/1282	14,6	43/713	3,6*
■ Gebruik antacida	221/1501	14,6	100/1194	8,4*
■ Gebruik antibiotica	99/1498	6,5	29/1192	2,4*
Diarree	1137/1221	93,1	-	-
■ < 1 week	188/1221	15,4	-	-
■ 1-2 weken	313/1221	25,6	-	-
■ > 2 weken	636/1221	52,1	-	-
Buikpijn	944/1355	69,7	-	-
Koorts	185/1348	13,7	-	-
Braken	175/1346	13,0	-	-
Bloed in de feces	115/1345	8,6	-	-
Slijm in de feces	302/1343	22,5	-	-

Het getal na de deelstreep is het totaal aantal deelnemers dat de vraag had ingevuld.

* Significant ($p < 0,05$).

METHODE

Onderzoekspopulatie

Vier microbiologische laboratoria hebben het onderzoek uitgevoerd: Isala (Zwolle), LabMicta (Enschede), Streeklaboratorium Kennemerland (Haarlem) en Izore (Leeuwarden). In 2010 spraken zij af dat ieder laboratorium zou proberen fecesmonsters van 500 patiënten en 500 controles uit huisartsenpraktijken in de eigen regio in te brengen. De huisartsen konden blijven werken op dezelfde manier als zij altijd al deden. Huisartsen die besloten een fecesmonster in te sturen voor onderzoek op bacteriële of parasitaire verwekkers van gastro-enteritis, vroegen de patiënt mee te doen met het onderzoek en een vragenformulier in te vullen. De vragen betroffen leeftijd, geslacht, buitenlandse reizen, gezinsleden met klachten van gastro-enteritis, gebruik van antacida en antibiotica, en voor de patiënten: duur van de diarree, koorts, braken, buikpijn en slijm of bloed bij de ontlasting.

De onderzoekers vroegen de huisarts in kwestie om in dezelfde periode een patiënt te zoeken van dezelfde leeftijd en hetzelfde geslacht die geen klachten had van gastro-enteritis, geen mensen met gastro-enteritis in de omgeving had en in de voorgaande twee weken geen antibiotica had gebruikt. Omdat al snel bleek dat het includeren van deze controlepersonen lastiger was dan gehoopt, nodigden de onderzoekers in elke regio ook voor leeftijdscategorie en geslacht gematchte, gezonde vrijwilligers uit die aan de inclusievoorwaarden voldeden. Ook de controlepersonen leverden een vers fecesmonster in en vulden het vragenformulier in.

Het onderzoek werd goedgekeurd door de medisch-ethische commissie van het UMCG onder de voorwaarde dat de uitslag van het fecesonderzoek niet bekendgemaakt zou worden aan de controlepersonen.

Fecesmonsters

De monsters werden gealiquoteerd, bij -80°C opgeslagen en geanalyseerd met multiplex real-time PCR. Om te voorkomen dat de analysemethoden die de verschillende laboratoria gebruikten van invloed zouden zijn op de uitkomst van het onderzoek, werd deze analyse dubbel uitgevoerd op een centraal laboratorium. De hier gepresenteerde resultaten zijn gebaseerd op de uitkomsten van het centrale laboratorium. Voor uitgebreide informatie over methode, primers en probes voor de real-time PCR's verwijzen wij naar de oorspronkelijke publicatie.⁴

Bij elke analyse werd als interne controle het zeehondherpesvirus aan het fecesmonster toegevoegd. Daarnaast werd gezocht naar *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, pathogene *Yersinia enterocolitica*, toxigene *Clostridium difficile*, *Shigella spp.* en entero-invasieve *Escherichia coli* (EIEC), enterohemorragische *E. coli* (EHEC), shigatoxineproducerende *E. coli* (STEC), *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* en *Cryptosporidium hominis*, *Dientamoeba fragilis*, enterotoxigene *E. coli* (ETEC), entero-aggregatieve *E.coli* (EAEC), atypische en typische enteropathogene *E.coli* (aEPEC en tEPEC).

Statistiek

Voor de verwerking van de data is SPSS versie 18 gebruikt. Dichotome variabelen werden berekend met de exacte toets van Fisher, voor categoriale variabelen met meer dan twee categorieën gebruikten we de chikwadraattoets of de exacte toets van Fisher indien het om kleine groepen ging. Continue variabelen analyseerden we met de Mann-Whitney-U-toets. Als maat voor significantie hielden we een waarschijnlijkheid aan van 95% (p-waarde 0,05).

RESULTATEN

Van de beoogde 4000 fecesmonsters konden er 2802 verzameld worden, waarvan we er 2710 hebben meegenomen in de analyse, 1515 van patiënten en 1195 van controlepersonen. De patiëntengroep en de controlegroep waren vergelijkbaar qua geslacht en leeftijd (wij onderscheidden vier leeftijdsgroepen: < 5 jaar, 5-20 jaar, 21-50 jaar; > 50 jaar). Aan alle inclusiecriteria werd voldaan, alleen lukte het niet altijd om binnen een maand na inclusie van een patiënt ook een fecesmonster van een controlepersoon te verkrijgen. De meeste deelnemers werden geïncludeerd tussen juli 2010 en december 2012. Van de 1195 controlepersonen werden er 644 (53,9%) geïncludeerd door de huisarts; de overige 551 werden geworven onder laboratoriummedewerkers of in hun familie- of vriendenkring. Van de 1505 patiënten vulden er 1221 het vragenformulier compleet in. [Tabel 1] bevat de klinische informatie uit de vragenlijsten. In de patiëntengroep maakte 93,1% melding van diarree en was buikpijn de op een na meest vermelde klacht (69,7%). Andere klachten, zoals slijm of bloed bij de ontlasting, braken en koorts, werden opvallend minder vaak gerapporteerd. Verder hadden de patiënten significant vaker dan de controlepersonen gereisd of antacida dan wel antibiotica gebruikt.

In de fecesmonsters van 788 patiënten (52,0%) en 584 con-

trolepersonen (48,9%) werden met PCR-fecesonderzoek één of meer micro-organismen aangetroffen. [Tabel 2] geeft een overzicht. *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *Clostridium difficile*, *Shigella/EIEC*, ETEC, EAEC, aEPEC, *Cryptosporidium parvum/hominis* en *Giardia lamblia* werden significant vaker gevonden bij patiënten dan bij controlepersonen. tEPEC, EHEC en STEC kwamen niet significant vaker voor bij patiënten. Sommige veroorzakers van gastro-enteritis werden helemaal niet gevonden (*Entamoeba histolytica*), andere maar een enkele keer (*Yersinia enterocolitica*). Regelmatig vonden we ook meer dan één verwekker van gastro-enteritis in de feces.

Eén micro-organisme, *Dientamoeba fragilis*, werd juist significant vaker aangetroffen bij controlepersonen dan bij patiënten (37,3 versus 25,7%; $p < 0,001$). Als we *D. fragilis* niet meerekenen, dan werd in 35,7% van de patiënten een bekende verwekker van gastro-enteritis gevonden versus 19,2% van de controlepersonen ($p < 0,001$), en hadden ook significant meer patiënten dan controlepersonen een dubbelinfectie: respectievelijk 8,2% en 2,2%.

Tussen de vier leeftijdsgroepen bleken behoorlijke verschillen te bestaan. *C. difficile* en *G. lamblia* werden alleen in de groep ouder dan 50 significant vaker aangetroffen bij patiënten dan bij gezonde controlepersonen [tabel 3].

Een PCR-test geeft niet alleen aan of een bepaald micro-organisme al dan niet aanwezig is in een monster, maar ook hoeveel DNA van dat micro-organisme aanwezig is. Het resultaat van de test wordt uitgedrukt als een Ct-waarde, een semi-kwantitatieve maat voor de hoeveelheid aangetroffen DNA. Zit er veel DNA van een pathogeen in het fecesmonster, dan

Tabel 2 Aangetroffen verwekkers van gastro-enteritis bij PCR-fecesonderzoek van patiënten en gezonde controlepersonen

	Patiënt (n = 1515)		Controle (n = 1195)		p°
<i>Campylobacter spp.</i>	154	10,2%	33	2,8%	0,000
<i>Salmonella spp.</i>	28	1,8%	4	0,3%	0,000
Pathogene <i>Yersinia enterocolitica</i>	2	0,1%	0		0,507
<i>Clostridium difficile</i>	64	4,2%	21	1,8%	0,000
<i>Shigella/EIEC</i>	14	0,9%	0		0,000
EHEC	2	0,1%	2	0,2%	1,000
STEC	15	1,0%	22	1,8%	0,067
ETEC	48	3,2%	8	0,7%	0,000
EAEC	94	6,2%	34	2,8%	0,000
aEPEC	144	9,5%	84	7,0%	0,022
tEPEC	10	0,7%	10	0,8%	0,655
<i>Entamoeba histolytica</i>	0		0		–
<i>Giardia lamblia</i>	85	5,6%	33	2,8%	0,000
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	46	3,0%	10	0,8%	0,000
<i>Dientamoeba fragilis</i>	390	25,7%	446	37,3%	0,000

EAEC = enteroaggregatieve Escherichia coli; EHEC = enterohemorragische E. coli; EIEC = entero-invasieve E. coli; aEPEC = atypische enteropathogene E. coli; tEPEC = typische enteropathogene E. coli; ETEC = enterotoxische E. coli; STEC = shigatoxineproducerende E. coli.

° Significante waarden ($p < 0,05$) zijn vetgedrukt.

komt de real-time PCR-reactie snel op gang en rolt er een lage Ct-waarde uit. De Ct-waarden voor *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, ETEC, tEPEC en *Cryptosporidium parvum/hominis* waren significant lager – meer DNA dus – in de feces van patiënten dan in de feces van controlepersonen. Dat is conform de verwachting. Dat gold ook voor *Clostridium difficile* en EAEC, maar dan alleen in het cohort 20-50 jaar, en voor aEPEC in het cohort < 5 jaar. Die trend in leeftijdscohorten kwam ook regelmatig voor bij

Tabel 3 Verwekkers van gastro-enteritis zoals aangetroffen bij PCR-fecesonderzoek van patiënten en gezonde controlepersonen, per leeftijdscategorie

	Patiënt < 5 jaar			Controle < 5 jaar			Patiënt 5-20 jaar			Controle 5-20 jaar			Patiënt 21-50 jaar			Controle 21-50 jaar			Patiënt > 50 jaar			Controle > 50 jaar		
n			p°			p°			p°			p°			p°			p°			p°			p°
	152	104		313	208		557	445		493	428													
<i>Campylobacter spp</i>	4,6%	0%	0,044	8,9%	2,9%	0,006	10,8%	3,1%	0,000	12,0%	3,0%	0,000												
<i>Salmonella spp</i>	0,7%	1,0	1,000	2,2%	1,0%	0,328	1,8%	0,2%	0,028	2,0%	0%	0,002												
Pathogene <i>Yersinia enterocolitica</i>	0%	0%	–	0,3%	0%	1,000	0,2%	0%	1,000	0%	0%	–												
<i>Clostridium difficile</i>	10,5%	14,4%	0,436	3,2%	1,0%	0,136	2,7%	0,9%	0,059	4,7%	0%	0,000												
<i>Shigella/EIEC</i>	0,7%	0	1,000	0,6%	0%	0,519	1,3%	0%	0,019	0,8%	0%	0,128												
EHEC	0%	0	–	0,3%	0%	1,000	0%	0,4%	0,197	0,2%	0%	1,000												
STEC	0%	1,0%	0,406	0,6%	1,0%	0,653	1,4%	2,5%	0,252	1,0%	1,9%	0,402												
ETEC	2,0%	1,0%	0,648	0,6%	0,5%	1,000	5,2%	0,9%	0,000	2,8%	0,5%	0,009												
EAEC	7,2%	4,8%	0,601	3,8%	1,9%	0,301	7,0%	3,8%	0,037	6,5%	1,6%	0,000												
aEPEC	21,7%	11,5%	0,044	7,3%	7,7%	0,867	9,0%	6,1%	0,095	7,7%	6,5%	0,524												
tEPEC	3,9%	3,8%	1,000	0%	0,5%	0,399	0,2%	0%	1,000	0,6%	1,2%	0,483												
<i>Entamoeba histolytica</i>	0%	0%	–	0%	0%	–	0%	0%	–	0%	0%	–												
<i>Giardia lamblia</i>	9,2%	3,8%	0,135	7,7%	7,2%	1,000	4,3%	2,2%	0,081	4,7%	0,9%	0,001												
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	7,9%	4,8%	0,446	2,9%	1,0%	0,213	3,8%	0,4%	0,000	0,8%	0,2%	0,380												
<i>Dientamoeba fragilis</i>	32,2%	34,6%	0,787	46,3%	58,7%	0,007	20,3%	36,0%	0,000	16,8%	29,0%	0,000												

EAEC = enteroaggregatieve Escherichia coli; EHEC = enterohemorragische E. coli; EIEC = entero-invasieve E. coli; aEPEC = atypische enteropathogene E. coli; tEPEC = typische enteropathogene E. coli; ETEC = enterotoxische E. coli; STEC = shigatoxineproducerende E. coli.

° Significante waarden ($p < 0,05$) zijn vetgedrukt.

andere micro-organismen, zonder dat significantie bereikt werd.

Bijzonder was de situatie voor *Dientamoeba fragilis*. Niet alleen kwam dit micro-organisme significant vaker voor bij gezonde controlepersonen dan bij patiënten, maar ook de hoeveelheid DNA van *D. fragilis* was significant groter in de feces van controlepersonen (zie de uitgebreide grafieken in onze originele publicatie).⁴

BESCHOUWING

De patiënten in dit onderzoek werden gerekruteerd door een grote groep huisartsen voor wie de vier regionale laboratoria regelmatig medisch-microbiologische diagnostiek uitvoeren. Bij de onderzoekers bestond daarom de angst voor selectiebias, maar die bleek ongegrond. Bij niet-geïnccludeerde patiënten van wie de feces om dezelfde reden was ingestuurd als bij onze patiëntengroep (data zijn niet getoond), vonden wij nagenoeg dezelfde percentages positieve PCR-resultaten.

Aan ons onderzoek zat overigens wel een kwetsbare kant: er werden minder controlepersonen geïnccludeerd dan patiënten. Bovendien waren alle controlepersonen weliswaar gezond en voldeden ze aan de inclusiecriteria, maar waren ze niet allemaal gerekruteerd in de deelnemende huisartsenpraktijken.

Het is interessant om te zien in hoeverre de huisartsen die meewerkten aan het onderzoek zich conformeren aan de herziene NHG-Standaard Acute diarree voor wat betreft de indicaties voor aanvullend onderzoek. [Tabel 2] laat duidelijk zien dat dit zo is. Met name bij kort bestaande diarree wacht de huisarts af, en ruim 80% van de aanvragen voor PCR-onderzoek betrof persisterende diarree. Maar ook andere criteria zoals bloed en slijm bij de ontlasting komen regelmatig voor.

Dientamoeba fragilis

Men mag verwachten dat micro-organismen die gastro-enteritis veroorzaken vaker worden aangetroffen in de feces van patiënten dan in die van gezonde personen. Voor de meeste micro-organismen die wij onderzochten klopt dat ook, behalve voor STEC en tEPEC. Opvallend zijn onze bevindingen inzake *Dientamoeba fragilis*. Deze parasiet wordt sinds de invoering van de TFT heel veel gevonden in de ontlasting van kinderen met buikpijn en wordt sindsdien om die reden ook vaak behandeld.⁵ Wij troffen *D. fragilis* bij patiënten echter juist significant minder vaak en in lagere hoeveelheden aan dan bij gezonde controlepersonen. In een eerder Nederlands onderzoek op basis van microscopie werd *D. fragilis* ook al vaak aangetroffen bij patiënten én bij controlepersonen, maar was het verschil niet significant.⁶ Al met al was deze uitkomst voor drie van de vier deelnemende laboratoria reden om *D. fragilis* niet langer als darmpathogeen te beschouwen en niet langer te screenen op de aanwezigheid van deze parasiet in de feces van patiënten met gastro-enteritis. Een recent gerandomiseerd, dubbelblind placebogecontroleerd onderzoek naar de effectiviteit van metronidazol bij buikpijn ondersteunt dit standpunt: metronidazol had geen significant beter effect op

de klachten dan placebo, terwijl bij veel deelnemers *D. fragilis* niet meer gedetecteerd werd.⁷ Ook een ander recent Nederlands onderzoek vond geen steun voor de rol van *D. fragilis* bij chronische buikpijn.⁸

STEC

Een andere opvallende bevinding betrof STEC. Er is een aan-gifteplicht voor gastro-enteritis door STEC, onder groep B2. In 2012 nog overleden in Duitsland vijftig mensen aan een voedselgerelateerde STEC-uitbraak. Het verschil was weliswaar net niet significant, maar in de feces van patiënten vonden wij minder vaak STEC dan in de feces van gezonde controlepersonen. Wij denken dat de detectie van stx1- en stx2-genen met PCR te weinig differentieert om pathogene vormen van STEC op te sporen. Er is onderzoek gaande dat wijst op het bestaan van specifieke STEC-pathotypes die geassocieerd zijn met ernstige gastro-enteritis en die zelfs het hemolytisch-uremisch syndroom kunnen veroorzaken. Het is duidelijk dat alleen deze pathotypes aan de GGD gemeld zouden moeten worden.

Giardia en Clostridium

Opvallend was verder dat sommige micro-organismen, zoals *G. lamblia* en *C. difficile*, alleen in bepaalde leeftijdscategorieën een hogere prevalentie hadden. *Giardia* wordt toch echt als een darmpathogeen beschouwd waarvan vooral kinderen last hebben, maar wij vonden alleen een significant verschil bij patiënten ouder dan 50 jaar, niet bij patiënten jonger dan 20 en ook niet bij kinderen onder de 5. Kennelijk is er sprake van veel asymptomatisch dragerschap van *G. lamblia* bij kinderen.

Een vergelijkbaar beeld zien we voor *C. difficile*. Bekend is dat kleine kinderen, in tegenstelling tot ouderen, vaak drager zijn van *C. difficile* zonder dat zij klachten hebben.⁹ Ons onderzoek bevestigde dit: wij troffen *C. difficile* in de leeftijdsgroep < 5 jaar net zo vaak bij patiënten als bij controlepersonen aan. Dat gold overigens voor alle deelnemers tot 50 jaar. Echter bij 50-plussers, de leeftijdsgroep waar de meeste problemen met *C. difficile* gezien worden, was het verschil wel significant en kwam asymptomatisch dragerschap niet voor. Opnieuw een aanwijzing dat men omzichtig moet omspringen met PCR-resultaten.

De betekenis van Ct-waarden

Bij aanvang hoopten we dat ons onderzoek uitsluitend zou kunnen geven of, bij een positieve uitslag van de PCR, de Ct-waarde voorspellend zou zijn voor gastro-enteritis. Er wordt wel gezegd dat de PCR-uitslag alleen klinische betekenis heeft wanneer de Ct-waarde onder een bepaalde grens blijft en de hoeveelheid aangetroffen DNA dus groot genoeg is. In ons onderzoek blijkt zo'n duidelijke tweedeling er alleen te zijn voor *Salmonella* en ETEC, met bij alle patiënten een Ct-waarde ≤ 33. Voor *Salmonella spp* en ETEC, maar ook voor *Campylobacter spp* en *Cryptosporidium parvum/hominis*, vonden wij in alle leeftijdscategorieën significant lagere Ct-waarden bij patiënten, maar zagen we incidenteel ook een lage Ct-waarde bij controlepersonen. Voor *Clostridium difficile*, EAEC en aEPEC ligt het nog

complexer: we vonden alleen verschillen in bepaalde leeftijds-categorieën. En bij STEC en *D. fragilis* vonden wij juist omgekeerde verschillen: patiënten hadden hogere Ct-waarden.

Ons onderzoek maakt duidelijk dat PCR-uitslagen een genuanceerde interpretatie vereisen. Het simpele 'positief' of 'negatief' geeft geen adequaat antwoord op de vraag of de klachten veroorzaakt worden door die bepaalde bacterie of parasiet. Ook een min of meer kwantitatieve uitslag zoals de Ct-waarde laat lang niet altijd een eenduidige interpretatie toe. De interpretatie van de PCR-uitslag, en dus de terugkoppeling naar de aanvrager – in het geval van gastro-enteritis is dat bijna altijd de huisarts – blijft maatwerk.

Ondanks deze nuancering heeft de introductie van de PCR in de praktijk vooral voordelen opgeleverd, met name een vermindering van het aantal onnodige coloscopieën. PCR-fecesdiagnostiek is zeer sensitief en de methode is bij aanvragende huisartsen al zo bekend dat fecesonderzoek binnen één ziekteperiode zelden meer herhaald hoeft te worden. Eén van de vier deelnemende laboratoria doet voor patiënten met bloedige diarree ook in het weekend PCR-onderzoek en koppelt een positief testresultaat actief terug naar de huisarts.

In Nederland is eerder patiënt-controleonderzoek gedaan naar verwekkers van gastro-enteritis, toen nog vooral met kweek en microscopie.⁶ Opmerkelijk is dat in dat onderzoek dezelfde percentages positieve fecesmonsters gevonden werden als in ons onderzoek met de veel sensitievere PCR-methode (met uitzondering van *Shigella/EIEC*, *C. parvum/hominis* en *D. fragilis*).² Dat wijst erop dat salmonellose en campylobacteriose minder vaak voorkomen, wellicht als gevolg van betere hygiëne en grotere alertheid bij de voedselbereiding, thuis en in de voedingsindustrie.² Een recent rapport van de European Food and Safety Authority bevestigt deze hoopvolle ontwikkeling.¹⁰

CONCLUSIE

Met PCR-onderzoek zijn in de feces van patiënten met gastro-enteritis significant verhoogde prevalenties te vinden van bepaalde micro-organismen. In combinatie met een hogere DNA-load (lagere Ct-waarde) levert dat voor de meeste van de hier onderzochte micro-organismen een sterke aanwijzing dat het betreffende micro-organisme inderdaad het gezochte pathogeen is. Bij de meeste onderzochte micro-organismen was de overlap in DNA-load tussen patiënten en controlepersonen echter zodanig groot dat deze parameter voor de individuele patiënt geen zekerheid biedt. Alleen voor *Salmonellae* en ETEC zal een lage Ct-waarde het pathogeen met zekerheid aanwijzen.

Twee opmerkelijke bevindingen betreffen *E. coli* en *D. fragilis*. Ten eerste is het aantreffen van stx1- en stx2-genen niet voldoende om te concluderen dat STEC/EHEC de klachten veroorzaakt, want de PCR-test differentieert te weinig tussen pathogene en niet-pathogene vormen van deze bacterie. Ten tweede maken onze bevindingen het onwaarschijnlijk dat *D. fragilis* een darmpathogeen is.

De indicaties voor aanvullend onderzoek bij gastro-enteritis, zoals de NHG-Standaard Acute diarree die aangeeft, worden door huisartsen in het algemeen goed gevolgd. Bij het fecesonderzoek heeft een PCR-test evidente voordelen boven kweek en TFT in termen van sensitiviteit en snelheid, maar men moet voorzichtig zijn bij de interpretatie: ook de resultaten van een PCR krijgen pas waarde in samenhang met andere klinische en achtergrondgegevens.

DANKWOORD

Wij bedanken alle huisartsen die aan het onderzoek hebben meegewerkt. Onze speciale dank gaat uit naar Alewijn Ott, arts-microbioloog/epidemioloog van Certe, Groningen, die meehielp het onderzoek te ontwerpen. ■

LITERATUUR

- 1 Belo J, Bos ML, Brühl PC, Lemmen WH, Pijpers MAM, Van den Donk M, NHG-Standaard Acute diarree. www.nhg.org.
- 2 De Boer RF, Ott A, Güren P, Van Zanten E, Van Belkum A, Kooistra-Smid AM. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2013;51:253-9.
- 3 Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:869-74.
- 4 Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Dullaert-de Boer M, Ruijs GJ, Van der Rijden WA, Van der Zanden AG, Weel JF, Schuur TA. Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:592.e9-19.
- 5 Bosman DK, Benninga MA, Van de Berg P, Kooijman GCL, Van Gool T. *Dientamoeba fragilis*: een mogelijk belangrijke oorzaak van persisterende buikpijn bij kinderen. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2004;148:575-9.
- 6 De Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Van Leeuwen NJ, Bartelds AI, Van Duynhoven YT. Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001;7:82-91.
- 7 Röser D, Simonsen J, Stensvold CR, Olsen KE, Bytzer P, Nielsen HV, et al. Metronidazole therapy for treating *dientamoebiasis* in children is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded and placebo-controlled clinical trial. *Clin Infect Dis* 2014;58:1692-9.
- 8 De Jong MJ, Kortbeek JJ, Benninga MA, Hilbink M, Widdershoven J, Deckers-Kocken JM. *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case-control study. *Arch Dis Child* 2014;99:1109-13.
- 9 Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 2015;372:1539-48.
- 10 Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal* 2013;11:3138.