

Fixatieven in de parasitologie

Idzi Potters, Marjan Van Esbroeck

Zoals voor alle onderzoeken geldt ook voor parasitologisch onderzoek dat monsters bij voorkeur zo snel mogelijk in het laboratorium kunnen onderzocht worden. In de praktijk is dat vaak niet haalbaar. Stalen worden vanuit (ziekenhuis)laboratoria doorgestuurd voor parasitologisch onderzoek en ambulante patiënten krijgen recipiënten mee naar huis om het monster later per post naar het laboratorium te sturen. Dat er geruime tijd overgaat alvorens het onderzoek kan gebeuren stelt voor sommige onderzoeken weinig of geen problemen (moleculaire analyse, ELISA,...). Voor het microscopisch onderzoek is dit echter wel nadelig en kan de toevoeging van fixatieven aan het monster, onmiddellijk na productie, de ontwikkeling van eieren en larven van helminthen tegengaan en ervoor zorgen dat de morfologie van cysten en trofozoïeten van protozoa beter behouden blijft. In de praktijk wordt 1 deel feces gemengd met 3 delen fixatief.

Niet enkel het toevoegen van een fixatief op zich, maar ook het gebruik van permanente kleuringen in het labo, kan de identificatie van vooral de trofozoïeten vereenvoudigen. Een bijkomend voordeel van het gebruik van fixatieven en/of van permanent gekleurde preparaten is de mogelijkheid om het monster door te sturen naar een referentielaboratorium ter confirmatie van de eigen bevindingen.

De oudere fixatieven zoals Schaudinn's fixatief en PVA bevatten vaak kwikchloride, wat ze minder geschikt maakt door het veiligheidsgevaar dat zij met zich meebrengen, zowel voor het milieu als voor de laboratoriumtechnoloog.

Kwikchloride wordt meer en meer vervangen door de minder toxische zink- en koperzouten zoals zinksulfaat, zinkchloride, kopersulfaat, koperchloride en zink-formaline.

De meest gekende kwikvrije fixatieven zijn formaline 10%, SAF (natriumacetaat, azijnzuur, formaline) en MIF (merthiolaat iodine formaline). Hoewel minder schadelijk voor het milieu dan de kwikbevattende fixatieven, houden deze fixatieven omwille van het vermoedelijk carcinogene vermogen van formaline ook een veiligheidsrisico in.

Elk fixatief heeft zijn voor- en nadelen. Formaline 10% is gemakkelijk te bereiden, maar fixeert enkel cysten, eieren en larven, kan gebruikt worden voor rechtstreeks onderzoek (RO) en voor concentratiemethoden, maar niet voor permanente kleuring. PVA en afgeleide fixatieven (m-PVA, Zinc-PVA) zijn moeilijker te bereiden, fixeren trofozoïeten, cysten, eieren en larven en kunnen gebruikt worden voor permanente kleuring (met zeer mooie resultaten), maar niet voor aanrijkingsmethoden. Monsters gefixeerd met PVA (en PVA-afgeleiden) zijn doorgaans niet geschikt voor immunoassays zoals die voor de detectie van *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* en *Entamoeba histolytica/dispar*. SAF fixeert trofozoïeten, cysten, eieren en larven en kan gebruikt worden voor RO, concentratiemethoden en permanente kleuring. Ook bepaalde immunoassays blijven mogelijk (deze informatie is te vinden in de bijsluiters). MIF fixeert trofozoïeten, cysten, eieren en larven en kan gebruikt worden voor RO en concentratietechnieken. De houdbaarheid is echter vrij beperkt en

permanente kleuringen zijn niet mogelijk. Een overzicht van de verschillende fixatieven met hun eigenschappen en voor- en nadelen is te vinden in Tabel 1.

Indien de fixatie van het monster gevolgd wordt door een permanente kleuring wordt voorgesteld om gebruik te maken van fixatie door SAF in combinatie met de ijzerhematoxylinekleuring van Kinyoun of fixatie met zink-PVA in combinatie met de trichroomkleuring. Daar fecesmateriaal dat met SAF gefixeerd is, niet goed hecht op objectglaasjes, is het gebruik van een adhesiemiddel als Mayer's albumine noodzakelijk voor de bereiding van permanent gekleurde preparaten.

Tabel 1. Overzicht van de verschillende fixatieven.

	Formaline 10%	PVA	PVA-afgeleiden (kwikvrij)	SAF	MIF
Toxiciteit	+	+++	+	+	+
Bereiding	gemakkelijk	moeilijk	moeilijk	gemakkelijk	gemakkelijk
Houdbaarheid	maanden/jaren	maanden/jaren	maanden/jaren	maanden/jaren	Beperkt
Immunoassays	mogelijk*	niet mogelijk	niet mogelijk	mogelijk*	mogelijk*
Fixatie eieren/larven	++	++	++	++	++
Fixatie cysten	++	+++	+++	+++	++
Fixatie trofozoïeten	-	+++	++	+++	++
Concentratie (ether-sedimentatie)	mogelijk	niet mogelijk	niet mogelijk	mogelijk	mogelijk
Permanente kleuringen	niet mogelijk	Trichroom-kleuring	Trichroom-kleuring	Ijzerhematoxyline Chlorazol Black Ziehl-Neelsen	niet mogelijk

*de correcte informatie is te vinden in de bijsluiters van de gebruikte kit.

Bij het verzenden van monsters naar het referentielaboratorium, is het raadzaam om steeds zowel een portie gefixeerde feces als een portie niet-gefixeerde feces te versturen. De fixatie dient onmiddellijk na productie te gebeuren. Het niet-gefixeerde deel kan indien nodig gebruikt worden voor aanvullend onderzoek zoals PCR (zie ook www.itg.be → Medische diensten → Laboratoria). Het formulier voor het versturen van een stoelgangmonster naar het referentielaboratorium kan gevonden worden op de website van het WIV:

http://www.wiv-isp.be/epidemiologie/epinl/plabnl/N_parasites.pdf

Om een zo goed mogelijk parasitologisch onderzoek toe te laten kan het fixeren van de monsters gecombineerd worden met het onderzoeken van verschillende opeenvolgende stoelgangmonsters van een patiënt. In het Academisch Medisch Centrum van Amsterdam werd hiertoe de Triple Feces Test (TFT) ontwikkeld, een pakket bestaande uit drie tubes, waarvan twee tubes (tube 1 en 3) een hoeveelheid SAF bevatten en één tube (tube 2) leeg is. De tubes worden in een vormvaste plastic blister geplaatst, samen met een laagje absorberend materiaal dat de inhoud van één tube SAF indien nodig kan absorberen. Dit alles wordt in een hermetisch sluitend plastic zakje gedaan en verstuurd in een speciaal daarvoor ontwikkelde plastic enveloppe (Figuur 1).



Figuur 1: De TFT-kit zoals gebruikt in het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, Nederland

In een begeleidende brief wordt de patiënt gevraagd om stoelgangmonsters te verzamelen van drie opeenvolgende dagen: op dag 1 in een tube met SAF, op dag 2 in de lege tube en op dag 3 in de andere tube met SAF. Na de derde dag dient de patiënt de volledige kit zo snel mogelijk terug aan het laboratorium te bezorgen, eventueel per post. Vooral in Nederland is het gebruik van de TFT sterk ingeburgerd.

Idzi Potters
Marjan Van Esbroeck

Intituut voor Tropische Geneeskunde
Centraal Labo voor Klinische Biologie
Nationalestraat 155
B-2000 Antwerpen
Stichting van Openbaar Nut 0410.057.701

Bronnen:

- "Fixatives and permanent stains in the laboratory diagnosis of intestinal protozoal infections" T. van Gool, T. G. Mank, 1999
- "Triple Faeces Test: An effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice" T. van Gool, R. Weijts, E. Lommerse, T. G. Mank, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2003) 22:284-290