

Molecular tools in the diagnosis of  
intestinal parasitic infections

**Proefschrift**

ter verkrijging van  
de graad van Doctor aan de Universiteit Leiden,  
op gezag van de Rector Magnificus Dr. D. D. Breimer,  
hoogleraar in de faculteit der Wiskunde en  
Natuurwetenschappen en die der Geneeskunde,  
volgens besluit van het College voor Promoties  
te verdedigen op donderdag 22 april 2004  
klokke 16.15 uur

door

**Jacob Jan Verweij**

Geboren te Berkel en Rodenrijs in 1963

**Promotiecommissie:**

Promoter: Prof. Dr. A.M. Deelder

Co-promoter: Dr. A.M. Polderman

Referent: Prof. Dr. J.P. Ackers  
London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK

Overige leden: Prof. Dr. A.C.M. Kroes  
Prof. Dr. H.J. Tanke  
Dr. L.G. Visser  
Dr. P. J. Beckers  
Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Nijmegen

ISBN 90 6464 430 6

Cover: Flagellates, an artist impression by Nancy Kroon

## Summary

Traditionally, diagnosis of intestinal parasitic infections is made by microscopical examination of (repeated) stool samples for the presence of helminth ova and protozoan trophozoites and cysts. There are a number of factors that influence the specificity and sensitivity of stool examination, for example, day-to-day variation in the shedding of protozoa and helminth eggs, the size of the parasitic stages but most of all specificity and sensitivity depend on the skills of microscopist. The problems, difficulties and adaptations that have been made to improve the diagnosis of intestinal parasitic infections in general and in more detail for *Entamoeba histolytica*, hookworm, *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* infections are discussed in the first chapter of this thesis as a general introduction.

DNA based methods have been developed and introduced in routine diagnosis of parasitic infections, first using DNA probe hybridisation techniques and later using polymerase chain reaction (PCR) based techniques. Although these methods proved to be highly sensitive and specific these methods have not found a broad acceptance in the routine diagnostic laboratory. The first and also very important step in the application of DNA based methods is the isolation of the target DNA; therefore, a DNA-isolation method of parasitic DNA from faecal samples suitable for routine use was developed. PCR-based parasite detection methods were improved and new methods were developed and evaluated in their application in patient care and in epidemiological studies.

The recognition of *E. histolytica* and *E. dispar* as two separate morphologically identical species, one causing disease and one being a harmless commensal, has urged the development of new diagnostic tools for the diagnosis and for a better understanding of the epidemiology of amoebiasis. The application of the PCR-SHELA for the differentiation of *E. histolytica* and *E. dispar* using DNA isolated from stool samples in a routine non-endemic setting is described in chapter 2. It is clear that *E. dispar* is the species involved in the majority of *E. histolytica*/*E. dispar* cyst positive cases as diagnosed by microscopy in Dutch laboratories.

Surprisingly, some of the samples that were initially characterized, as *E. histolytica*/*E. dispar* showed no amplification in either of the two PCRs. Upon confirmatory microscopical examination these cysts were determined as uninucleated *Entamoeba* species, and therefore classified as *E. polecki* or *E. chattoni*. However, molecular based confirmation using PCR-primers designed on

the basis of the small-subunit ribosomal RNA genes of *E. polecki* and *E. chattoni* failed in 12 of 15 cases (chapter 3). Sequence analysis of these samples revealed two other genetic variants of uninucleated *Entamoeba* clustering with *E. polecki* and *E. chattoni*. This shows that there are at least four genetic types of uninucleated cyst producing *Entamoeba* species that infect humans.

Until now, confirmation of microscopical findings is based on the microscopical examination by a more senior, more experienced microscopist. In chapter 4, a reverse line hybridisation assay is described for the detection and identification of *Entamoeba* species. This DNA-based method has proved to be an objective tool that can be used for confirmation and quality control.

Chapter 5 describes that the species-specific detection of *E. histolytica* and *E. dispar* has led to a better understanding and interpretation of serology results. Previously it was unclear why one "cyst-carrier" showed an antibody response and another cyst-carrier did not. It is now clear that the majority of these seronegative cyst-carriers are infected with *E. dispar* whereas the majority of those infected with *E. histolytica* do show an elevated antibody response. Remarkably, there was no clear difference in the antibody response in asymptomatic *E. histolytica* carriers and patients presenting with diarrhoea, dysentery or liver abscess. This indicates that tissue invasion is also present in asymptomatic *E. histolytica* cases and therefore these cases should be treated in the same way as invasive amoebiasis.

The diagnosis of *E. histolytica* dysentery in a spider monkey induced the study in chapter 6 on the presence of *E. histolytica* amongst primates in the "Vallée des singes". The study demonstrates that Old World as well as New World nonhuman primates can be (naturally) infected with *E. histolytica* with and without symptoms. Available data on the prevalence of *E. histolytica* so far, were usually based on microscopy and as a consequence unreliable. Therefore, new accurate prevalence data should be obtained using species-specific diagnostic methods. The study in Ethiopia as described in chapter 7 shows that the contribution of *E. histolytica* in the aetiology of diarrhoea is low and moreover the found overdiagnosis of amoebiasis using microscopy shows the importance of training and quality control in such diagnostic settings. A high prevalence of *E. dispar* and a low prevalence of *E. histolytica* were revealed in northern Ghana as described in chapter 8. The PCR showed to be highly sensitive as it revealed more than twice the number of *E. histolytica*/*E. dispar* cases as found with microscopy.

The new diagnostic possibilities provided by these DNA-based methods are not restricted by their use in patient care and epidemiology of amoebiasis. The use of DNA-based methods as a diagnostic tool in epidemiological studies in a particular endemic area is described in the prevalence studies for *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus*.

Human infections with *O. bifurcum* occur at high prevalence (20-80%) in regions of northern Togo and Ghana in most cases together with the human hookworm, *N. americanus*. Infections with *O. bifurcum* are easily missed because the eggs of *O. bifurcum* are morphologically indistinguishable from those of hookworms. Therefore, coprocultures need to be performed to allow eggs to hatch and develop to characteristic third-stage larvae for the differential diagnosis. In chapters 9 and 10 species-specific PCR for both species showed to be a sensitive and highly specific diagnostic tool that can be directly used for surveillance and also for quality control when studies are carried out using coprocultures.

Many adaptations have been made to improve the microscopical diagnosis of intestinal protozoan infections. Concentration techniques to increase the number of parasites and diverse additional staining techniques to enhance the morphologic characteristics of these organisms are used to improve the sensitivity and specificity of the microscopical examination. In this context, the use of DNA based methods was exploited as a possible alternative in a number of these infections and the results were compared with those found with the conventional diagnostic methods.

*Cyclospora cayetanensis* is a newly recognised intestinal coccidian pathogen that is associated with diarrhoea in travellers returning from South-East Asia or South-America and with the consumption of imported food. Probably, the oocysts of *C. cayetanensis* are often missed with microscopical examination because the oocysts do not stain with iodine like protozoan cysts and due to the unfamiliarity of the laboratory personnel with this parasite. Oocysts of *C. cayetanensis* can be easily detected as they show autofluorescence with UV fluorescence microscopy. In chapter 11, amongst 100 returning travellers with diarrhoea *C. cayetanensis* was found as the most frequent parasitic cause of diarrhoea after *Giardia lamblia*. A newly developed real-time PCR showed to be specific and more sensitive than any microscopical method for the detection of *C. cayetanensis* infections. Until

now fluorescence microscopy is the easiest method for detection of *C. cayetanensis*. The use of PCR for routine diagnosis would be more appropriate when combined with other parasitic targets in a multiplex assay.

*G. lamblia*, *C. parvum* and *E. histolytica* are the most important diarrhoea causing protozoa. Although microscopy is still the most used diagnostic method for the detection of all three pathogens, for each of them more specific and sensitive methods are needed for an accurate differential diagnosis. However, the choice of the appropriate technique for a certain pathogen is hampered by the often similar clinical presentation of these protozoan infections. A real-time PCR assay based on the small subunit ribosomal RNA gene of *G. lamblia* is described in chapter 12. The assay showed to be specific and as sensitive as antigen detection and is more sensitive than microscopy. The primers and probe as described for the real-time *G. lamblia* assay were then used in a real-time multiplex PCR in combination with specific primers and probes for *C. parvum* and *E. histolytica* for the simultaneous detection of *G. lamblia*, *C. parvum* and *E. histolytica*. This multiplex PCR showed to be specific and sensitive for the detection of all three parasites.

Probably for many years, microscopy will remain the most used technique for the diagnosis of intestinal parasitic infections. However, DNA-based methods have been shown to be truly objective tools for confirmation and quality control and they provide new standards for evaluation and standardisation of other diagnostic methods. Moreover, the continuous evolution and simplification of DNA-based techniques and the excellent specificity and sensitivity in the detection of intestinal parasites as shown in this thesis make it clear that there are no technical reasons to withhold the implementation of such techniques in a routine diagnostic laboratory. Further studies should be performed to investigate the diagnostic and financial effectiveness of such an alternative approach in the differential diagnoses of intestinal parasitic infections.



# Samenvatting

Naast de voor velen bekende veroorzakers van infectieziekten zoals bacteriën en virussen kunnen ook parasieten ziekten veroorzaken. Parasieten zijn meer complexe organismen: ééncelligen (protozoa) zoals amoeben maar ook meercellige organismen zoals wormen. Antonie van Leeuwenhoek was in 1681 de eerste die een parasitaire verwekker van diarree aantoonde. Hij bekeek met een zelfgemaakte microscoop zijn eigen ontlasting en zag daar kleine ééncellige organismen met zweepdraden. Door zijn uitvoerige beschrijving van de "kleine dierkens" kunnen we aannemen dat het hier *Giardia lamblia* betrof, een parasiet waarvan we nu weten dat het een van de meest voorkomende niet-virale veroorzakers van diarree is. Na al die eeuwen is microscopisch onderzoek nog altijd de basis voor de diagnostiek van darmparasieten en wordt ontlasting met behulp van een microscoop onderzocht op de aanwezigheid van het cyste- of vegetatieve stadium van ééncelligen of de eieren van wormen. In de loop van de tijd heeft men voor de verschillende parasieten voorbereidende concentratiemethoden en aanvullende kleuringen ontwikkeld waardoor het microscopisch onderzoek gevoeliger is en gemakkelijker uit te voeren. Doordat de klachten die door de verschillende parasieten worden veroorzaakt vaak niet heel specifiek zijn, is het lastig om vooraf de juiste methode te kiezen. Bovendien ligt het voor de hand dat de gevoeligheid van het onderzoek ook zeer afhankelijk is van de tijd, aandacht en bedrevenheid van degene achter de microscoop. Daarom is de laatste jaren ook gezocht naar alternatieven voor het microscopisch onderzoek. De problemen en de aanpassingen die in de loop van de jaren ontwikkeld zijn om de diagnostiek van darmparasieten in het algemeen te verbeteren en meer in detail voor *Entamoeba histolytica*, mijnworm, *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia lamblia* en *Cryptosporidium parvum* infecties, worden besproken in het eerste hoofdstuk van dit proefschrift.

Voor het aantonen van virussen en in mindere mate van bacteriën worden sinds jaren technieken gebruikt die zijn gebaseerd op het aantonen van het erfelijk materiaal (DNA) van deze organismen. Hierbij wordt vaak gebruik gemaakt van een methode waarbij in een testbuisje met behulp van een enzym (Taq polymerase) een zeer kleine hoeveelheid DNA van een specifiek organisme (target DNA) vermenigvuldigd wordt tot een hoeveelheid DNA die zichtbaar gemaakt kan worden. Deze techniek wordt polymerase ketting reactie of PCR genoemd. Ook voor het aantonen van parasieten zijn dergelijke methoden ontwikkeld en deze bleken ook voor deze pathogenen zeer gevoelig en specifiek. Het gebruik van deze technieken in de routinediagnostiek is echter een nog niet geaccepteerd alternatief voor het traditionele microscopisch onderzoek. Bij de toepassing van deze DNA-detectie technieken is de eerste en zeer belangrijke stap de isolatie van het parasitair DNA uit het patiëntenmateriaal. Hiervoor werd een in een routinelaboratorium toepasbare methode ontwikkeld voor de isolatie van parasitair DNA uit ontlasting. PCR methoden voor de detectie van parasitair DNA werden geëvalueerd en nieuwe methoden werden ontwikkeld en geëvalueerd op de toepasbaarheid in de patiëntendiagnostiek en in epidemiologische studies.

*E. histolytica* is de veroorzaker van amoebendysenterie en kan zelfs door de darmwand heen de lever bereiken en daar grote schade aanrichten. Wereldwijd zijn naar schatting 50 miljoen mensen geïnfecteerd met *E. histolytica* en overlijden er jaarlijks 100.000 personen aan de gevolgen van deze infectie. In 1997 werd officieel het bestaan erkend van *E. histolytica* en *E. dispar* als twee afzonderlijke maar morfologisch identieke soorten, waarbij alleen de eerste

soort ziekte veroorzaakt en de tweede een onschuldige darmbewoner is. Het ontbreken van microscopisch zichtbare verschillen maakt het noodzakelijk nieuwe diagnostische technieken te ontwikkelen voor zowel de diagnostiek als voor het begrijpen van de epidemiologie van *E. histolytica* infecties.

In hoofdstuk twee van dit proefschrift wordt de toepassing van PCR voor de differentiatie van *E. histolytica* en *E. dispar* beschreven. Het blijkt dat *E. dispar* de soort is in het overgrote deel van de *E. histolytica*/*E. dispar* cysten die in Nederland bij microscopisch onderzoek wordt gezien. Het was opmerkelijk dat in een aantal faecesmonsters, waarin in eerste instantie cysten werden gezien die men determineerde als *E. histolytica* /*E. dispar*, met geen van beide PCR's DNA amplificatie aangetoond kon worden. In deze monsters werden bij microscopisch confirmatie onderzoek *Entamoeba* cysten gezien die bijna zonder uitzondering slechts één kern bezaten, dit in tegenstelling tot cysten van *E. histolytica*/*E. dispar* die meestal vier kernen hebben. Er wordt veelal verondersteld dat deze éénkernige *Entamoeba* soorten afkomstig zijn van dieren en soms ook mensen infecteren. De parasieten krijgen vervolgens de naam van de *Entamoeba* soort passend bij het dier waarvan de parasieten vermoedelijk afkomstig zijn, zoals bijvoorbeeld *E. polecki* bij varkens en *E. chattoni* bij apen. Bij verdere analyse van de DNA sequenties coderend voor het kleine subunit ribosomale RNA gen van deze *Entamoeba* soorten bleek dat er naast *E. polecki* en *E. chattoni*, twee andere zeer nauw verwante genetische varianten te bestaan. Hieruit blijkt dat er minstens vier genetisch verschillende typen éénkernige *Entamoeba* zijn die in staat zijn mensen te infecteren (hoofdstuk 3).

Bij het beoordelen van microscopische preparaten en het benoemen van de parasieten die hierin worden gezien heeft de oudste of meest ervaren microscopist het laatste woord. Het is duidelijk dat een tweede microscopische beoordeling als confirmatietechniek nooit geheel objectief is. Een confirmatie zou bij voorkeur met een onafhankelijke techniek moeten worden uitgevoerd. In hoofdstuk 4 wordt een DNA-hybridisatie techniek beschreven waarbij een groot aantal *Entamoeba* soorten op basis van de unieke DNA sequenties kunnen worden onderscheiden. Deze techniek is dus uitstekend geschikt voor confirmatie en kwaliteitscontrole van microscopisch onderzoek.

Voor het aantonen van een *E. histolytica* infectie worden ook serologische testen gebruikt waarbij de aanwezigheid van antistoffen tegen *E. histolytica* in het bloed een indirecte aanwijzing is voor de aanwezigheid van de parasiet. In hoofdstuk 5 wordt aangetoond dat het onderscheiden van *E. histolytica* en *E. dispar* de interpretatie van deze serologische testen een stuk eenvoudiger heeft gemaakt. Bij patiënten met een leverabces veroorzaakt door *E. histolytica* kunnen doorgaans altijd antistoffen worden aangetoond. Het was voorheen echter onbegrijpelijk waarom bij een tot de darm beperkte infectie bij de ene cystendrager wel antistoffen tegen *E. histolytica* werden aangetoond maar bij de andere cystendrager niet. Het is nu duidelijk geworden dat de meeste cystendragers waarbij geen antistoffen worden aangetoond dragers zijn van *E. dispar* terwijl bij de meerderheid van de *E. histolytica* dragers vrijwel altijd antistoffen kunnen worden aangetoond. Het was opmerkelijk dat er weinig verschil werd aangetoond in de antistofproductie bij personen zonder klachten, personen met diarree, bloederige diarree of personen met een leverabces. Dit suggereert dat *E. histolytica* altijd, ook bij personen zonder klachten, in meer of mindere mate invasief is. Daarom zouden alle patiënten met een *E. histolytica* infectie, onafhankelijk van de klachten, met een weefselamoebicide en een darmamoebicide middel moeten worden behandeld.

De ontdekking van *E. histolytica* als veroorzaker van bloederige diarree bij een slingeraap in het apenpark "Vallée des singes" in Frankrijk was de aanleiding om in dit park alle apen te onderzoeken op de aanwezigheid van *E. histolytica*. Deze studie, beschreven in hoofdstuk 6, heeft aangetoond dat zowel Nieuwe Wereld-apen als Oude Wereld-apen geïnficeerd kunnen worden met *E. histolytica*. Deze infecties kunnen geheel symptomloos verlopen maar ook zoals bleek bij de slingeraap amoebendysenterie tot gevolg hebben.

De beschikbare gegevens met betrekking tot de verspreiding van *E. histolytica* in de wereld waren tot nu toe veelal gebaseerd op microscopisch onderzoek. Hierbij werd dus geen onderscheid gemaakt tussen *E. histolytica* en *E. dispar*. Daarom is het belangrijk het amoebiasis probleem opnieuw in kaart te brengen, hierbij gebruikmakend van de nieuwe soortspecifieke methoden. In Ethiopië is amoebendysenterie volgens de statistieken een veel voorkomend probleem. De studie die in hoofdstuk 7 wordt beschreven toont echter aan dat bij patiënten met diarree in Ethiopië dit zelden wordt veroorzaakt door *E. histolytica*. Het bleek dat bij het microscopisch onderzoek veel niet-ziekte veroorzakende protozoa en zelfs macrofagen ten onrechte werden gerapporteerd als *E. histolytica*. Een betere scholing van het laboratoriumpersoneel en kwaliteitscontrole kan in een dergelijke situatie de kwaliteit van de diagnostiek zeer verbeteren. Studies in noord Ghana tonen eveneens aan dat *E. histolytica* infecties daar maar zeer sporadisch voorkomen. Veel personen waren wel drager van *E. dispar*, waarbij met behulp van PCR meer dan twee maal zoveel gevallen werden aangetoond als met microscopisch onderzoek.

Deze nieuwe diagnostische mogelijkheden, gebaseerd op het aantonen van parasitair DNA, zijn niet alleen toepasbaar in de patiëntendiagnostiek en epidemiologie van amoebiasis. Het gebruik van deze methoden werd ook toegepast in het epidemiologisch onderzoek naar het voorkomen van de wormen, *Oesophagostomum bifurcum* en *Necator americanus*, in het noorden van Ghana en Togo.

Op een aantal plaatsen in het noorden van Ghana en Togo zijn 20-80% van de mensen geïnficeerd met *O. bifurcum*. In de meeste gevallen zijn deze mensen tegelijkertijd ook geïnficeerd met de mijnworm *N. americanus*. De *O. bifurcum* infecties kunnen makkelijk worden vaak niet onderkend omdat de eieren van deze worm microscopisch niet te onderscheiden zijn van de eieren van de mijnworm, een infectie die meer algemeen bekend is. Het is daarom noodzakelijk een faeceskweek te verrichten waarbij de eieren zich kunnen ontwikkelen tot karakteristieke derde stadium larven, waarbij de larven van *O. bifurcum* en *N. americanus* met microscopisch onderzoek wel van elkaar zijn te onderscheiden. In de hoofdstukken 9 en 10 wordt de ontwikkeling en toepassing van species specifieke PCR's voor beide soorten beschreven. Het blijkt dat beide ontwikkelde PCR's zeer specifiek en gevoelig zijn en direct toegepast kunnen worden in epidemiologische studies. Daarnaast kunnen de PCR's ook als kwaliteitscontrole dienen wanneer studies uitgevoerd worden met gebruik van larvenkweken.

In de afgelopen jaren zijn er veel aanpassingen ontwikkeld om de diagnostiek van intestinale protozoaire infecties te verbeteren. Concentratietechnieken, met als doel het aantal parasieten te vergroten en kleurtechnieken om de morfologische kenmerken van deze organismen te verduidelijken zijn ontwikkeld om de gevoeligheid en specificiteit van microscopische onderzoek te verhogen. Alternatieven voor microscopisch onderzoek zijn

voor sommige parasitaire infecties inmiddels geaccepteerd in de routinediagnostiek. Een voorbeeld hiervan is antigeendetectie in de diagnostiek van *G. lamblia* infecties. In hoofdstuk 11, 12 en 13 wordt het gebruik van DNA-technieken als mogelijk alternatief in de diagnostiek van vier protozoaire infecties onderzocht en werden de resultaten vergeleken met de resultaten die verkregen zijn met gebruik van de conventionele methoden.

*Cyclospora cayetanensis* is een pas recent ontdekte ziekteveroorzakende intestinale parasiet die wordt geassocieerd met diarree bij reizigers uit zuidoost Azië en Zuid-Amerika en met het eten van geïmporteerd voedsel uit deze streken. Waarschijnlijk worden de oöcysten van *C. cayetanensis* vaak gemist bij microscopisch onderzoek omdat deze niet, zoals de andere protozoaire cysten kleuren met de jodium oplossing. Verder speelt de onbekendheid van het laboratorium personeel met deze parasiet vermoedelijk ook een grote rol. De oöcysten van *C. cayetanensis* kunnen echter wel eenvoudig aangetoond worden wanneer het faeces preparaat wordt bekeken onder UV licht, omdat zij dan autofluorescentie vertonen. Hoofdstuk 11 beschrijft een onderzoek naar de mogelijke parasitaire oorzaken van diarree bij 100 reizigers naar de tropen en subtropen. In dit onderzoek worden *C. cayetanensis* en *G. lamblia* gevonden als de meest voorkomende parasitaire oorzaken van diarree. Een nieuw ontwikkelde real-time PCR blijkt heel specifiek, en gevoeliger dan microscopie voor de detectie van *C. cayetanensis* infecties. Bij een real-time PCR is het mogelijk om de vorming van het PCR-product al tijdens de reactie te detecteren. Het gebruik van PCR voor het aantonen van deze infectie zou gemakkelijker in de routinediagnostiek toepasbaar worden als tegelijkertijd ook andere diarree veroorzakende parasieten kunnen worden aangetoond.

*G. lamblia*, *C. parvum* en *E. histolytica* zijn de meest belangrijke diarree veroorzakende protozoa. Hoewel microscopie nog steeds de meest gebruikte laboratoriumtechniek is voor de detectie van deze parasieten, zijn voor elk meer specifieke en meer gevoelige methoden nodig voor een precieze differentiaaldiagnose. Het is echter vaak moeilijk om een goede keuze te maken uit de verschillende beschikbare technieken omdat de klachten van de patiënt vaak weinig aanknopingspunten geven. Daarom is eerst een real-time PCR ontwikkeld voor de detectie van *G. lamblia* gebaseerd op het kleine subunit ribosomale RNA gen van *G. lamblia*. Deze techniek bleek specifiek en ten minste zo gevoelig als antigeendetectie, en gevoeliger dan microscopie. Deze *G. lamblia*-specifieke test is daarna uitgebreid met de assays voor de specifieke detectie van *C. parvum* en *E. histolytica* waardoor het nu mogelijk is *G. lamblia*, *C. parvum* en *E. histolytica* in één test aan te tonen. Deze multiplex-PCR blijkt alle drie de parasieten specifiek en gevoelig aan te tonen.

Microscopie zal naar alle waarschijnlijkheid nog vele jaren de meest gebruikte techniek zijn voor de diagnostiek van intestinale parasitaire infecties. In dit proefschrift is echter aangetoond dat DNA-technieken gebruikt kunnen worden voor een objectieve confirmatie en kwaliteitscontrole. De resultaten kunnen bovendien gebruikt worden als gouden standaard voor de evaluatie en standaardisatie van andere diagnostische testen. De steeds voortgaande ontwikkeling en vereenvoudiging van DNA-technieken en de grotere gevoeligheid en hogere specificiteit bij de detectie van intestinale parasieten nemen technische en logistieke bezwaren tegen de implementatie van deze technieken in het routinelaboratorium weg. Verder onderzoek moet verricht worden naar de diagnostische

effectiviteit en de financiële aspecten van een dergelijke aanpak bij de diagnostiek van intestinale parasitaire infecties.