

Underdiagnostiseres *Giardia lamblia* og *Cryptosporidium* med nåværende rutinemetode for parasittundersøkelse?

PÅVISNING AV *Cryptosporidium* oocyster og *Giardia* cyster i fekal materiale indikerer parasittinfeksjon i tarmkanalen. Mikroskopering av jodfarget preparat, som ofte brukes som rutinemetode, antas å ha begrenset sensitivitet. På utvalgte prøver benytter vi derfor en mer sensitiv immunfluorescensmetode i tillegg, men antall prøver som undersøkes slik er lavt.

Av **TRINE EKER CHRISTOFFERSEN¹**,
CATHRINE ANDRESEN², **KHUSHBAKHT**
NASEEM², **MARIAM RAHHAOUI²** **PERNILLE**
JOHANNESSEN² og **ASTRI LERVIK LARSEN³**

Hensikten med denne studien var å undersøke om parasitter detekteres oftere dersom tilleggsmetoden benyttes på alle prøver, noe som i så fall vil indikere at parasittinfeksjon underdiagnostiseres med nåværende rutinemetode.

Innledning

Giardia lamblia er den hyppigst diagnostiserte humane tarmparasitten på verdensbasis, og infeksjonen giardiasis forekommer både som epidemi og sporadisk (1). Smitte skjer direkte eller indirekte fekal-oralt. Forurenset drikkevann er den vanligste årsaken til giardiasis og prevalensen er høy i områder med dårlige sanitære forhold. *Giardia* påvises vanligvis i

to til fem % av avføringsprøver rekvirert for parasittundersøkelse i industriland, mens 20 – 30 % av prøvene er positive for *Giardia* i utviklingsland (1). Giardiasis kan forårsake diaré, oppblåsthet, magesmerter, kvalme og brekninger, men kan også fortone seg asymptomatisk. I områder med høy prevalens av *Giardia* vil en stor andel av infiserte personer være langvarige bærere av parasitten uten å få symptomer på sykdom. *Giardia* er imidlertid en kjent årsak til turistdiaré hos personer bosatt i industriland. Akutt forurensing av drikkevann i områder der parasittinfeksjoner vanligvis ikke forekommer gir også utbrudd med symptomatisk giardiasis. Kloakkforurensing av et vannreservoar i Bergen førte i 2004 til at omtrent 1500 personer ble diagnostisert med giardiasis, men det antas at antall smittede var betydelig høyere (2). Samme år var det et utbrudd av giardiasis i en barnehage i Trondheim med tolv verifiserte tilfeller (3). Høy prevalens av *Giardia* i barnehagemiljø er for øvrig et velkjent fenomen.

Metronidazol er vanligvis førstevalget ved behandling av giardiasis, og både syke og asymptomatiske bærere skal behandles.

Cryptosporidium er en annen type encellet parasitt som forårsaker tarminfeksjon hos mennesker (4). Smittekilder

og sykdomsforløp likner giardiasis og gir en forbigående gastroenteritt av en til fire ukers varighet hos individer med normalt immunforsvar. Både giardiasis og cryptosporidiose kan også gi mer kroniske tilstander, og *Cryptosporidium* kan hos immunsvekkede personer gi alvorlig infeksjon. Behandlingen ved *Cryptosporidium*infeksjon er i første omgang å korrigere en eventuell immunsvikt, men antiparasittær behandling med nitazoxanid kan også være aktuelt. *Cryptosporidiose* er langt mer sjelden enn giardiasis, og dessuten vanskeligere å påvise. Likevel har det blitt rapportert flere tilfeller av cryptosporidiose i Norge i senere tid, hvorav det største utbruddet rammet en leirskole i 2009 der 51 personer ble infisert (5).

Giardia og *Cryptosporidium* er begge avhengige av en vert for å formere seg. Parasittenes livssyklus inkluderer en hvileform og en aktiv form. Hvileformene til *Giardia* og *Cryptosporidium* kalles henholdsvis cyster og oocyster, og er relativt motstandsdyktige i fuktig miljø utenfor verten. Cystene og oocystene blir aktivert og formerer seg i øvre tarmkanal, men returnerer til hvileform før de skilles ut som infeksiøse cyster og oocyster med avføringen.

Det er cyster og oocyster som detekteres ved påvisning av giardiasis eller cryptosporidiose i fekal materiale.

Nygård *et al.* rapporterte for en tid tilbake at de fleste av landets medisinsk-mikrobiologiske laboratorier benytter mikroskopering av konsentrerte, fargede preparat som rutinemetode for påvisning av parasitter (6). Ved mikroskopering av jodfarget preparat gjenkjennes *Giardia*-cystene relativt enkelt på grunn av sin ovale form, størrelse (7–12 µm) og distinkte polynukleære morfologi. Ved

¹ Førsteamanuensis, Bioingeniørutdanningen, Høgskolen i Østfold

² Bachelorstudenter 2011 – 2013, Bioingeniørutdanningen, Høgskolen i Østfold

³ Overlege, Seksjon bakteriologi, Senter for laboratoriemedisin, Sykehuset Østfold

■ Artikkelen er basert på et bachelorprosjekt utført våren 2013 og utvidet med en prøvetakingsperiode høsten 2013.

langvarige infeksjoner der antallet cyster som regel er lavt, reduseres sensitiviteten til denne metoden. *Cryptosporidium*-oocystene er mindre (2–6 µm) og derfor vanskeligere å identifisere. I tillegg kan den kokkoide morfologien til oocystene forveksles med andre bestanddeler i feces som for eksempel *Candida* spp (gjærsopp). Jodfarget preparat antas derfor å være lite egnet for påvisning av *Cryptosporidium*. Flere laboratorier benytter mer sensitive tilleggsundersøkelser, spesielt når cryptosporidiose mistenkes. Disse undersøkelsene benyttes imidlertid bare på utvalgte prøver, og ti laboratorier oppgav i overnevnte studie at de undersøkte færre enn ti prøver per år for *Cryptosporidium* (6).

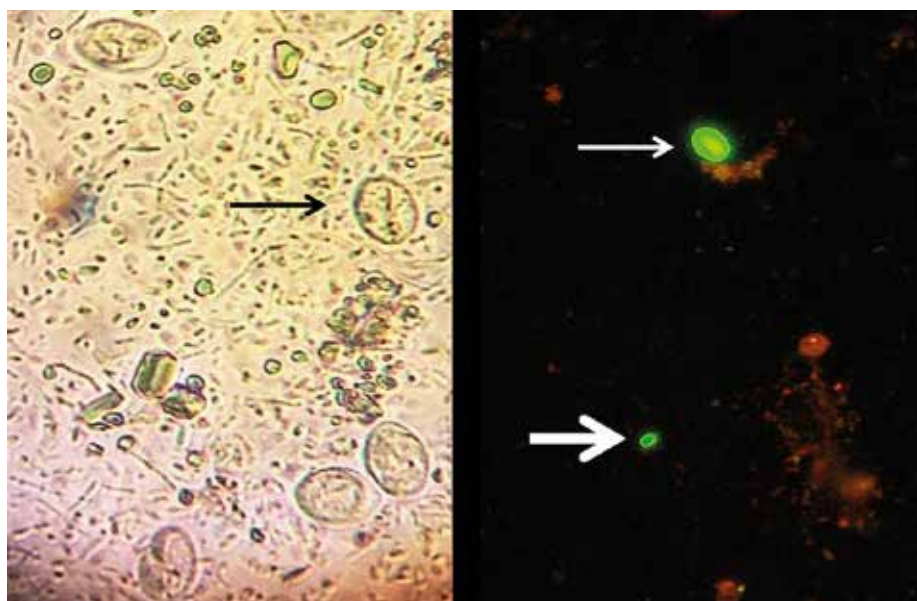
Forekomsten av giardiasis og cryptosporidiose i Norge antas å være lav, men stadig økt innvandring, reiseaktivitet og rapporterte utbrudd gjør at det er mistanke om at parasittinfeksjonene underdiagnostiseres (3, 6). I dag rekvireres parasitt-påvisning på medisinsk indikasjon hos innvandrere, og ofte ved mistanke om tarminfeksjon hos nordmenn som har vært utenlands.

Ved vårt laboratorium mikroskoperer vi jodfarget preparat for å påvise parasitter i fekalt materiale. Ved spesielle indikasjoner, for eksempel utbrudd med gastroenteritt, immunsuppresjon eller langvarig klinikk, utføres i tillegg en mer sensitiv immunfluorescensbasert metode. Tilleggsmetoden utføres også dersom rekvirenten spør spesielt etter *Giardia* eller *Cryptosporidium*. Likevel undersøkes relativt få prøver med denne tilleggsmetoden, noe som kan føre til en eventuell underdiagnostisering. Vi ønsket derfor å undersøke om den mer sensitive metoden bør benyttes oftere enn i dag.

Materiale og metode

Prøvemateriale. I periodene 15. april til 19. mai og 9. september til 6. oktober 2013 ble det mottatt henholdsvis 84 og 51 fecesprøver rekvirert for parasittundersøkelse ved Seksjon bakteriologi, Senter for laboratoriemedisin, Sykehuset Østfold.

Preparering av fecesprøver. Feces (2–3 ml) ble løst i 7 ml 10 % formalin. Uløselige komponenter ble fjernet og 3 ml eter tilsatt. Prøvene ble konsentrert ved sentrifugering ved 1500 g i tre minutter.



FIGUR 1: Visualisering av parasitter med to forskjellige deteksjonsmetoder. Fiksert og konsentrert feces ble farget med jod og visualisert ved lysmikroskopi (venstre), eller immumerket med FITC-konjugerte antistoffer og visualisert med fluorescensmikroskopi (høyre). *Giardia*-cyster er anvist med tynne piler og *Cryptosporidium*-oocysten med en tykk pil.

Påvisning av cyster og oocyster ved lysmikroskopi. En dråpe preparert fecesprøve blandet med tre til fire dråper jodløsning ble avsatt på objektglass og analysert for cyster og oocyster i et lysmikroskop ved 40 x forstørrelse.

Påvisning av cyster og oocyster ved fluorescensmikroskopi. MERIFLUOR *Cryptosporidium*/*Giardia* (C/G) fra Meridian Bioscience ble benyttet for direkte immunfluorescens deteksjon i henhold til produsentens anbefalinger. Preparerte prøver ble tilsatt parasittspesifikke antistoffer konjugert til fluorescein isothiocyanate (FITC) og inkubert i 30 minutter. Overflødig reagenser ble vasket av og prøven ble analysert i et fluorescensmikroskop ved 40 x forstørrelse. Positiv og negativ kontroll ble inkludert i alle prøveoppsett.

Resultater

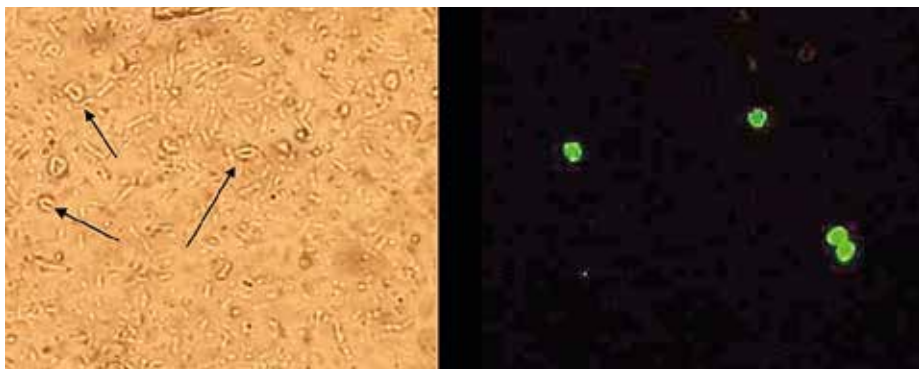
Funn av *Cryptosporidium* oocyster og *Giardia* cyster detektert med standard metode og fluorescensmikroskopi: Fecesprøver rekvirert for parasittundersøkelse ble preparert og analysert med lys- og fluorescensmikroskopi som beskrevet i materiale og metode. Resultatene er presentert i Tabell 1.

Lys- og fluorescensmikroskopi: Deteksjon av parasitter er visualisert med både lys- og fluorescensmikroskopi (Figur 1). Jod-

	Standard metode	Immunfluorescensdeteksjon
<i>Giardia</i>	3	3
<i>Cryptosporidium</i>	0	1
Totalt ant. prøver	135	135

TABELL 1: Deteksjon av *Cryptosporidium*-oocyster og *Giardia*-cyster i fecespreparat ved standard metode (lysmikroskopering av jodfarget preparat) og immunfluorescensdeteksjon (fluorescensmikroskopi av preparat behandlet med parasittspesifikke, FITC-konjugerte antistoffer).

fargede *Giardia* cyster er relativt lett gjenkjennelige ved lysmikroskopering som polynukleære, ovale strukturer i størrelsesorden 7–12 µm. Ved fluorescensmikroskopi gjenkjennes også morfologi, men *Giardia* cystenes polynukleære karakteristikk kan ikke observeres. *Cryptosporidium* oocyster ble påvist ved fluorescensmikroskopi i én prøve fra en pasient med gastroenteritt etter utenlandsopphold (Figur 2). Prøven ble ikke undersøkt med immunfluorescensmikroskopi som en del av rutineundersøkelsen fordi parasitten ble oversett ved lysmikroskopering. Jodfarget preparat ble hentet frem igjen etter påvisning av *Cryptosporidium* oocyster i tilleggsprøven og parasitten ble deretter også påvist ved lysmikroskopi.



FIGUR 2: Jodfarget (venstre) og fluorescensmerket (høyre) preparat av prøven der *Cryptosporidium*-oocyster ble påvist. *Cryptosporidium*-oocyster er anvist med tynne piler i det jodfargede preparatet.

Diskusjon og konklusjon

Med utgangspunkt i mistanken om at giardiasis og cryptosporidiose underdiagnostiseres i Norge, samt at vår standardmetode for påvisning av parasitter i fekalt materiale ikke ansees for å være spesielt sensitiv, ønsket vi å undersøke om antall positive prøver ville øke dersom alle prøver mottatt for parasittundersøkelse ble undersøkt med en mer sensitiv metode. Rutinen per i dag er at denne mer sensitive tilleggsmetoden kun benyttes på utvalgte prøver.

Flere norske laboratorier som utfører parasittpåvisning har tidligere oppgitt at de innehar supplerende hurtigtester basert på bl.a. immunkromatografi, ELISA (ProSpecT Giardia Microplate Assay) og immunfluorescens (MERIFLUOR C/G) (6). Vi benytter sistnevnte som supplerende test i vår rutine. MERIFLUOR C/G benytter en miks av FITC-merkede antistoffer spesifikke for overflatestrukturer på *Giardia* og *Cryptosporidium*, noe som skal gi høy sensitivitet, blant annet i prøver med liten parasittmengde. Ulemper med slike tester er at de er relativt kostbare og tidkrevende å utføre. Ved Sykehuset Østfold ble kun 27 av 601 prøver rekvirert for parasittundersøkelse, undersøkt med denne tilleggsmetoden i 2012.

Det ble ikke påvist flere tilfeller av giardiasis når immunfluorescenstest ble benyttet på alle prøvene i vår undersøkelse (Tabell 1). Begge metodene påviste *Giardia lamblia* i 3 av 135 prøver. Resultatene indikerer derfor at giardiasis ikke underdiagnostiseres i vårt opptaksområde. Det må imidlertid tas høyde for at alle

prøvene analysert i studien var spesifikt rekvirert for parasittundersøkelse, noe som diskuteres videre nedenfor.

Cryptosporidium oocyster ble oppdaget ved fluorescensmikroskopi i én prøve der parasitten ikke ble påvist ved rutinemethoden. Det gir grunn til å vurdere om en mer sensitiv metode bør benyttes oftere for å påvise cryptosporidiose. Men siden *Cryptosporidium* kun ble påvist i én prøve, antas gevinsten ved å utføre immunfluorescenstest på alle prøver å være liten. Nåværende praksis med bruk av immunmerking på utvalgte prøver later til å være en mer fornuftig tilnærming. Våre observasjoner underbygger teorien om at cryptosporidiose er en sjeldent forekommende infeksjon i vår region.

Det finnes adskillige andre tester for påvisning av *Giardia* og *Cryptosporidium*. En aktuell metode er polymerasekjedereaksjon (PCR). Metoden er meget sensitiv, gir mulighet til kvantifisering og kan differensiere genotyper slik at det blir enklere å identifisere etiologisk agens. Eksempelvis rapporterte Ajjampur og medarbeidere at hyppigheten av *Cryptosporidium* spp. økte fra 4,4 % til 15,2 % ($P < 0,001$) når PCR ble anvendt sammenliknet med mikroskopering av farget preparat (7). Dette skyldes trolig at *Cryptosporidium* er relativt vanskelig å påvise i fekalt materiale. I vår sammenlikningsstudie var det ikke rom for å inkludere PCR, men implementering av denne teknikken i parasittdiagnostikk bør vurderes.

Periodiske variasjoner for påvisning av både *Giardia* og *Cryptosporidium* er rapportert, og økt insidens forekommer ofte etter varme perioder (1, 4). Antal-

let positive prøver antas også å stige etter en sesong med økt reiseaktivitet. Vi valgte derfor å analysere prøver både før og etter sommermånedene. Prøven som inneholdt *Cryptosporidium* oocyster ble mottatt i perioden etter sommermånedene, men alle prøvene der *Giardia* cyster ble påvist ble mottatt før sommeren. Dermed ser ikke våre resultater ut til å være påvirket av sesongvariasjoner.

Et annet nevneverdig element i studien er at den konvensjonelle mikroskoperingen ble utført av personell med god erfaring i å påvise parasitter i feces. Slik erfaring er nødvendig for å sikre rutinemethodens validitet. Konklusjonene i denne studien forutsetter at det er erfarent personell som utfører rutinemethoden.

I tillegg til problematikken rundt laboratoriediagnostikken er det også mulig at giardiasis og cryptosporidiose kan være underdiagnostisert fordi parasittundersøkelse rekvireres for sjeldent. Det kunne derfor vært interessant å mikroskopere prøver innsendt for dyrkning av patogene tarmbakterier, der parasittinfeksjon ikke var mistenkt. Funn av *Cryptosporidium* eller *Giardia* i slikt materiell ville underbygget mistanken om at parasittundersøkelse bør rekvireres oftere i fecesprøver. ■

Referanser

- Ortega YR, Adam RD. Giardia: overview and update. Clin Infect Dis. 1997;25(3):545-9.
- Steen K, Damsgaard E. Giardiaepidemien i 2004 og Bergen Legevakt. Tidsskr Nor Laegeforen. 2007;127(2):187-9.
- Wahl E, Bevanger L. Utbrudd av giardiasis i en barnehage i Trondheim. Tidsskr Nor Laegeforen. 2007;127(2):184-6.
- Collinet-Adler S, Ward HD. Cryptosporidiosis: environmental, therapeutic, and preventive challenges. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29(8):927-35.
- Folkhelseinstituttet. Utbrudd av cryptosporidiose i Norge: <http://www.fhi.no/artikler/?id=73801> (4.3.2013).
- Nygård K, Vold L, Robertson L, Lassen J. Underdiagnostiseres innenlandssmittede Cryptosporidium- og Giardia-infeksjoner i Norge? Tidsskr Nor Laegeforen. 2003;123(23):3406-9.
- Ajjampur SS, Rajendran P, Ramani S, Banerjee I, Monica B, Sankaran P et al. Closing the diarrhoea diagnostic gap in Indian children by the application of molecular techniques. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 11):1364-8.