

Strategimøte nr 28, 2014:

Fæcesparasittologi

Programgruppe:

Tore Lier (leder)

Jan Egil Afset

Patricia Merckoll

Trond Ranheim

EKSTERNE KVALITETSVURDERINGER I BAKTERIOLOGI, MYKOLOGI OG
PARASITTOLOGI

Strategimøte nr. 28, 2014

FÆCESPARASITTOLOGI

7. november 2014, kl. 10.00 – 16.00

Gjestehuset Lovisenberg

Programgruppe

*Tore Lier (leder), Jan Egil Afset, Patricia Merckoll og Trond
Ranheim*

Forord

Strategimøte nr. 2 i 1988 omhandlet parasittologi. Det skjer mye innen et fagfelt på et kvart århundre og det var derfor på høy tid med en oppdatering.

Det 28. Strategimøte i regi av Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi omhandlet ”Fæcesparasittologi” og ble avholdt 07.11.2014 i Oslo. På møtet deltok 39 representanter fra landets medisinsk-mikrobiologiske laboratorier.

Ansvarlig programkomité, som også har ferdigstilt denne avsluttende rapporten, var Tore Lier (leder), Jan Egil Afset, Patricia Merckoll og Trond Ranheim. Komitéen har hatt et spesielt ansvar for den innledende og oppsummerende delen, mens ansvaret for de enkelte innleggene i rapportens del 2 er overlatt til de enkelte innleiderne. Rapporten har vært sendt på høringsrunde både til innledere og ansatte ved de medisinsk-mikrobiologiske laboratoriene.

Vi håper rapporten vil vise seg å bli nyttig for de enkelte laboratoriene.

Oslo, 30.06.2015

For Referansegruppen

Per Sandven

Martin Steinbakk

INNHOLDSFORTEGNELSE

PROGRAM	6
DELTAkere OG OBSERVATØRER	7
1 SAMMENDRAG OG ANBEFALINGER	9
1.1 ANBEFALT METODIKK FOR FORBEHANDLING AV FÆCES FØR MIKROSKOPI	9
1.2 ANBEFALTE FARGEMETODER FOR FÆCESPRØVER	10
1.3 MOLEKYLÆRE METODER OG NUKLEINSYREEKSTRAKSJON FRA FÆCES	11
1.4 KLINISKE INDIKASJONER OG SCREENING	12
1.5 PROBLEMATISKE AGENS: COCCOIDER, DIENTAMOEBBA, BLASTOCYSTIS, GIARDIA OG ENTAMOEBBA.....	13
1.6 UTVIDET PARASITTDIAGNOSTIKK I NORGE?	15
2 SAMMENDRAG AV INNLEGGENE	16
2.1 BAKGRUNN: RESULTAT FRA QUESTBACK, FOHM OG MSIS	16
2.2 PRESENTASJON AV NASJONAL KOMPETANSETJENESTE FOR TROPISKE INFEKSJONSSYKDOMMER.....	17
2.3 ANBEFALT METODIKK FOR FORBEHANDLING AV FÆCES FØR MIKROSKOPI	18
2.4 ANBEFALTE FARGEMETODER (HVLKE METODER FOR HVLKE AGENS)	20
2.5 HVILKEN ROLLE HAR ANTIGENTESTER?.....	23
2.6 HVILKEN ROLLE HAR MOLEKYLÆRE METODER I DIAGNOSTIKK AV PARASITTER I FÆCES?.....	25
2.7 NUKLEINSYREEKSTRAKSJON FRA FÆCES	28
2.8 KLINISKE INDIKASJONER OG SCREENING	30
2.9 HVA GJØR VI MED DET VI IKKE FINNER MED STANDARD MIKROSKOPI: COCCIDIER OG DIENTAMOEBBA/BLASTOCYSTIS. HVA ER BEST, NÅR BRUKER VI DET?	33
2.10 HVA GJØR VI MED DET VI IKKE FINNER MED STANDARD MIKROSKOPI: GIARDIA OG ENTAMOEBBA HISTOLYTICA/DISPAR. HVA ER BEST, NÅR BRUKER VI DET?	38

Program

Tid	Tema	Innleder
10:00	Innledning og velkommen	Dag Harald Skutlaberg Leder for Referansegruppen
10:10	Bakgrunn: resultat fra Questback, FoHM og MSIS	Tore Lier, Avd for mikrobiologi og smittevern, UNN
10:30	Presentasjon av Nasjonal kompetansetjeneste for tropiske infeksjonssykdommer	Kristine Mørch, Haukeland Universitetssykehus
10:40	Anbefalt metodikk for forbehandling av fæces før mikroskopi	Tore Lier, Avd for mikrobiologi og smittevern, UNN
10:50	Anbefalte fargemetoder (hvilke metoder for hvilke agens)	Patricia Merckoll, Mikrobiologisk avdeling, Ahus
11:10	Hvilken rolle har antigenester?	Lucy Robertson, Veterinærhøgskolen
11:20	Diskusjon	
11:25 Kaffe		
11:45	A) Hvilken rolle har molekylære metoder i diagnostikk av parasitter i fæces? B) Nukleinsyreekstraksjon fra fæces	Truls Leegaard, Mikrobiologisk avdeling, Ahus og Hege Smith Tunsjø, Gentekn. seksjon, Ahus
12:05	Diskusjon	
12:15	Kliniske indikasjoner og screening	Tore Lier, Avd for mikrobiologi og smittevern, UNN
12:35	Diskusjon	
12:45 Lunsj		
13:30	Hva gjør vi med det vi ikke finner med standard mikroskopi: coccidier og dientamoeba/blastocystis. Hva er best, når bruker vi det?	Jan Egil Afset, Mikrobiologisk avdeling, St Olavs Hospital
13:50	Diskusjon	
14:00	Hva gjør vi med det vi ikke finner med standard mikroskopi: Giardia og Entamoeba histolytica/dispar. Hva er best, når bruker vi det?	Kurt Hanevik, Nasjonal kompetansetjeneste for tropiske infeksjonssykdommer
14:20	Diskusjon	
14:30 Kaffe		
14:50	Hva skal vi gjøre selv her til lands og hva skal sendes til utlandet? Debatt	Kristine Mørch og Truls Leegard
15:05	Oppsummering og diskusjon	
16:00 Slutt		

Deltakere og observatører

Jan Egil Afset
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital HF,
7030 TRONDHEIM

Lumnije Dedi
Mikrobiologisk avdeling,
Oslo universitetssykehus Ullevål
0407 OSLO

Andreas Emmert
Unilabs Laboratoriemedisin AS
3736 SKIEN

Nils Grude
Mikrobiologisk laboratorium,
Sykehuset i Vestfold HF,
3103 TØNSBERG

Kurt Hanevik
Nasjonal kompetansetjeneste for
tropiske infeksjonssykdommer,
Haukeland Universitetssykehus'
5021 BERGEN

Reidar Hjetland
Mikrobiologisk avdeling,
Helse Førde HF,
Sentralsjukehuset,
6800 FØRDE

Unn Houge
Avd. for medisinsk mikrobiologi,
Sørlandet sykehus HF,
4604 KRISTIANSAND S

Gina Ilaug Guldaal
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Eivor Nordstrand Jacobsen
Mikrobiologisk avdeling,
Helse Nordmøre og Romsdal HF,
6407 MOLDE

Simreen Johal
Bakteriologisk enhet,
Avd. for laboratoriemedisin,
Nordlandssykehuset HF,
8092 BODØ

Angela Kümmel
Avdeling for laboratoriemedisin
Medisinsk mikrobiologi
Sykehuset Levanger
7600 LEVANGER

Astri Lervik Larsen
Mikrobiologisk avdeling,
Sykehuset Østfold HF,
1603 FREDRIKSTAD

Truls Leegard
Avdeling for mikrobiologi og
smittevern,
Akershus Universitetssykehus HF,
1474 LØRENSKOG

Tore Lier
Avd. for mikrobiologi og smittevern,
Universitetssykehuset Nord-Norge,
9038 TROMSØ

Maria Mathisen
Avd. for mikrobiologi og smittevern,
Universitetssykehuset Nord-Norge,
9038 TROMSØ

Patricia Merckoll
Avdeling for mikrobiologi og
smittevern,
Akershus Universitetssykehus HF,
1474 LØRENSKOG

Kristine Mørch
Nasjonal kompetansetjeneste for
tropiske infeksjonssykdommer,
Haukeland Universitetssykehus'
5021 BERGEN

Hans-Johnny Schjelderup Nilsen
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital HF,
7030 TRONDHEIM

Irene Beate Olsøy
Avd. for medisinsk mikrobiologi,
Sørlandet sykehus HF,
4604 KRISTIANSAND S

Annette Onken
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
Sykehuset Vestre Viken HF,
Bærum sykehus,
1309 RUD

Frank O. Pettersen
Mikrobiologisk avdeling,
Oslo universitetssykehus Ullevål
0407 OSLO

Niclas Raffelsberger
Avd. for mikrobiologi og smittevern,
Universitetssykehuset Nord-Norge,
Postboks 56,
9038 TROMSØ

Lucy Robertson
Institutt for mattrygghet og
infeksjonsbiologi
Norges miljø- og biovitenskapelige
universitet
Ullevålsvn 72, OSLO

Monica Romstad
Avd. for medisinsk mikrobiologi,
Stavanger Univ.sjukehus
Helse Stavanger HF,
4068 STAVANGER

Rolf-Arne Sandnes
Avdeling for medisinsk mikrobiologi
Sykehuset Innlandet HF
2629 LILLEHAMMER

Per Sandven
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 OSLO

Miriam Sare Ledaal
Mikrobiologisk avdeling,
Oslo universitetssykehus Ullevål
0407 OSLO

Dag Harald Skutlaberg
Avd. for mikrobiologi og immunologi,
Helse Bergen HF,
Haukeland Universitetssykehus,
5021 BERGEN

Martin Steinbakk
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 OSLO

Liv Jorunn Sønsteby
Mikrobiologisk laboratorium,
Haugesund sykehus,
5504 HAUGESUND

Trygve Tjade
Først Medisinsk Laboratorium
Søren Bullsvei 25,
1051 OSLO

Einar Tollaksen Weme
Avdeling for medisinsk mikrobiologi
Vestre Viken HF, Drammen sykehus
3004 DRAMMEN

Hege Smith Tunsjø
Avdeling for mikrobiologi og
smittevern,
Akershus Universitetssykehus HF,
1474 Lørenskog

Einar Vik
Mikrobiologisk avdeling,
Helse Nordmøre og Romsdal HF,
6407 MOLDE

Heidi Villmones
Mikrobiologisk laboratorium,
Sykehuset i Vestfold HF,
3103 TØNSBERG

Astrid Louise Wester
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Thin Thin Yi Win
Først Medisinsk Laboratorium
Søren Bullsvei 25,
1051 OSLO

1 SAMMENDRAG OG ANBEFALINGER

1.1 Anbefalt metodikk for forbehandling av fæces før mikroskopi.

Det anbefales å bruke en konsentrasjonsmetode før man mikroskoperer fæces på jakt etter cyster og egg. I Norge brukes konsentrasjonsmetode med enten formalin/etylacetat eller EcoFix®. EcoFix® er et kommersielt produkt, og det henvises til pakningsvedlegg. Det finnes en lang rekke varianter av formalin/etylacetat konsentrasjonsmetode og det er ikke tilstrekkelig sammenlignende dokumentasjon til å si at en variant er den beste. Vi anbefaler metodebeskrivelsen fra NEQAS, som igjen er basert på metodebeskrivelsen i 'UK Standards for Microbiology Investigations' fra NHS (se referanse i bakgrunns materialet). Dette er en velprøvd metodevariant og en mikrobiologisk standard for Storbritannia.

Parasittcyster og egg er ganske holdbare over tid i ufiksert fæces. Ved transporttid på mange dager anbefales det at punkt 1 i metodebeskrivelsen gjøres på legekantoret for bedre preservering og for å hindre overvekst av gjærsopp.

Etylacetat bør anvendes i stedet for eter. Det bør tilsettes en surfaktant, gjerne Triton X. Formalin i 10% blanding (fortynnes med destillert vann) anbefales. Triton X kan også blandes direkte i formalinløsningen (0,1% Triton X). Flere laboratorier siler nok fæcesblandingen gjennom gasbind i stedet for en sil. Dette er egentlig ikke anbefalt av NEQAS. Metoden bør utføres i avtrekksskap.

Metodebeskrivelse av formalin-etylacetat sedimetasjons-konsentrasjonsteknikk:

1. En stor ert fæces (ca 1 gram) løses opp i 7 ml 10% formalinløsning.
2. Når fæces er godt oppløst, helles løsningen gjennom en egnet sil, og den filtrerte løsningen overføres til et sentrifugerør.
3. Tilsett 3 ml etylacetat og en liten dråpe Triton X. Vortex i 15 sekunder eller rist kraftig for hånd i 60 sekunder.
4. Sentrifuger røret ved 1100xg i 3 minutter.
5. Det har nå dannet seg fire lag: sediment i bunnen, deretter formalin, så et lag med fett og fæcesrester og øverst etylacetat. Løsne fettlaget fra røret ved å føre en pinne eller øse rundt kanten av laget.
6. Hell av supernatanten. La noen få dråper renne tilbake langs røret og ned til sedimentet. Re-suspenser sedimentet som nå er klart til mikroskopering.

1.2 Anbefalte fargemetoder for fæcesprøver

Bakgrunn

Vanlig parasittmikroskopi etter konsentrasjonsbehandling har sine begrensninger. Det er derfor utviklet ulike fargemetoder som skal bedre diagnostikken i disse tilfellene. Disse metodene er imidlertid tidskrevende og forutsetter oftest erfaring med metoden for at de skal være pålitelige. En kostnad/nytte-vurdering er derfor nødvendig.

Makroskopisk eksaminasjon.

Hvis prøven ikke er fiksert i formalin eller Ecofix kan det noteres om prøven er fast eller flytende. Det samme gjelder hvis det er synlig slim eller blod. Tas det prøve fra et slikt område til konsentrasjonsbehandling kan det øke sjansen for å finne for eksempel *E. histolytica*. Segmenter fra bendelorm og voksne Enterobius-ormer kan også ses.

Mikroskopisk eksaminasjon

Saltvann våtpreparat

På fersk, ufiksert fæces kan man lage et preparat med saltvann til mikroskopi direkte, før konsentrasjonsbehandling. Tillater vurdering av motilitet av for eksempel amøbetrofozoitter. Det kreves dog meget fersk prøve og erfaren mikroskopist. Metoden har også lav følsomhet og anbefales ikke til rutinebruk.

Jod våtpreparat

Jod våtpreparat etter konsentrasjonsbehandling er den anbefalte screeningmetoden. Tilsetning av jod (Lugol) før mikroskopering er nødvendig for påvisning av cyster. For å mikroskopere egg er det en smaksak om det skal tilsettes jod eller ikke.

Modifisert syrefast fargeprosedyre

Denne teknikken er nyttig for identifisering av oocyster av coccidier (*Cryptosporidium*, *Cystoisospora* og *Cyclospora*). For *Cryptosporidium* har dog immunfluorescens-mikroskopi i de fleste tilfeller høyere følsomhet, og for flere laboratorier vil PCR langt på vei erstatte denne fargeprosedyren.

Cystoisospora og *Cyclospora* er sjeldent. *Cystoisospora*, og med noe erfaring også *Cyclospora*, kan også oppdages ved vanlig mikroskopi etter konsentrering.

Mikrosporidie-farging

Mikrosporidier er hovedsakelig assosiert til immunsupprimerte, men kan også gi bl.a. diare hos immunkompetente. De fleste farginger av fæcesutstryk for undersøkelse er varianter av såkalt forsterket eller modifisert Trichrome-farging eller bruk av calcofluor. Mikrosporidier er meget små og avlesning av preparater krever mye erfaring for å være pålitelig. Trolig vil høyst 1-2 laboratorier kunne oppnå tilstrekkelig erfaring. Alternativet er å sende preparat til laboratorier med erfaring i utlandet.

Permanent farging av trofozoitter

Det kan lages utstryk av fæces som farges, oftest med Trichrome-farging, for å se etter trofozoittformen av protozoer. Dette er spesielt nyttig ved tilstander hvor man kan forvente at mange av protozoene vil være i trofozoittform, for eksempel ved kraftig diare, og for protozoer som ikke kan eller vanskelig kan identifiseres ved vanlig jodpreparat (*Dientamoeba*, *Blastocystis*). Protozoer som har forlatt tarmen i trofozoittform omdannes ikke til cyster, men ødelegges etter relativt kort tid. Formalin er ikke optimalt for å bevare trofozoitter, så for å lage slike farginger trengs enten en meget fersk prøve eller prøve innsendt i egnet fikseringsmedium (eks SAF). Denne metoden er derfor lite forenlig med nåværende praksis ved de fleste norske laboratorier. Undersøkelse av slike

preparat tar også nokså lang tid og krever øvelse. Nyttien er også relativt liten; den patologiske betydningen til *Blastocystis* og *Dientamoeba* er omdiskutert og tilfeller der man nesten bare vil finne eksempelvis amøber i trofozoitt-form er relativt sjeldne. PCR-metodikk vil også delvis kunne erstatte denne prosedyren.

1.3 Molekylære metoder og nukleinsyreekstraksjon fra fæces

Det er etter hvert kommet mange studier som viser at molekylær diagnostikk er like god som tradisjonell mikroskopisk påvisning av tarmpatogene parasitter. Mens det ved mikroskopisk analyse anbefales å undersøke tre prøver, angis en prøve å gi minst like god sensitivitet ved bruk av PCR. En annen fordel med PCR-metodikk er at metoden egner seg for automatisering og analyse av store prøvevolum, uten å kreve samme grad av erfaring hos teknisk personale som mikroskopisk påvisning. Dersom man tviler på den kliniske betydningen av funnet, f.eks. ved høy CT-verdi, kan man be om ny prøve.

Det er nå beskrevet PCR-metodikk for påvisning et stort antall parasitter. Det finnes flere ulike kommersielle metoder som inkluderer noe varierende utvalg av protozoer, mens helminter foreløpig ikke er inkludert. Viktigst vil det være å inkludere *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.* og *Entamoeba histolytica*, som anses klinisk viktige i den vestlige verden og/ eller kan være vanskelig å påvise med tradisjonelle metoder. Det forventes at flere norske laboratorier i de nærmeste årene vil innføre multiplex PCR som også inkluderer parasitter. Muligheten for falske positive svar må tas med i vurderingen ved testing av meget lavprevalente grupper, f.eks. *Entamoeba histolytica* hos personer med diaré uten reiseanamnese.

Ved etablering av PCR metodikk er det viktig å sikre optimal forbehandling av fæcesprøvene. Parasitter har tykk cellevegg som vanskeliggjør ekstraksjon av nukleinsyrer og feces er et komplekst materiale, med mange stoffer som hemmer DNA polymeransen. Dersom man ønsker å detektere både virus, bakterier og parasitter fra samme prøvemateriale, må man balansere behovet for å bryte ned parasittenes cellevegg med risikoen for å degradere viralt RNA. Flere forbehandlingstrinn for å ekstrahere nukleinsyrer fra parasitter er anbefalt i litteraturen, blant annet frysing, koking, flere frys/tin-sykluser og mekanisk lysering. Ulike buffere har vist store forskjeller i utbytte av nukleinsyrer og/eller grad av hemming av PCR-reaksjonen.

Det finnes flere kommersielle metoder for ekstraksjon av nukleinsyrer fra parasitter, men ikke alle har vist akseptable resultater ved utprøving. Det anbefales derfor både å vurdere tilgjengelig litteratur og kontakte laboratorier med erfaring med slik metodikk før en velger ekstraksjonsmetode. En metode som har vist seg å fungere godt til ekstraksjon av nukleinsyrer fra både fra parasitter, bakterier og virus er beskrevet under innlegget "Hvilken rolle har molekylære metoder i diagnostikk av parasitter i fæces? Nukleinsyreekstraksjon fra fæces. "

1.4 Kliniske indikasjoner og screening

Klinisk indikasjon

Det er sjeldent å pådra seg en parasittinfeksjon i Norge, og nokså sjeldent ved reise i Europa og Nord-Amerika. Det følgende er indikasjoner ved bruk av mikroskopi. Ved bruk av multiplex-PCR vil indikasjonene være annerledes da Giardia, Cryptosporidium og Entamoeba oftest analyseres samtidig som bakterier og virus.

Prøver uten relevante kliniske opplysninger undersøkes ikke. Parasittundersøkelse gjøres på følgende grupper, hvis parasittundersøkelse er rekvirert:

1. Abdominalplager hos pasienter som har reist utenfor Europa og Nord-Amerika.
2. Abdominalplager hos pasienter uten reiseanamnese etter negativt resultat på undersøkelse for tarmpatogene bakterier og virus.
3. Utredning av eosinofili.
4. Sykehusinnlagte pasienter.

Cryptosporidium (og sjeldnere Giardia) er unntak, da de forekommer som smitte innenlands. Ideelt sett burde alle samfunnservede gastroenteritter testes for cryptosporidier. Som et minimum burde det testes for cryptosporidier ved utbrudd av samfunnservede gastroenteritt og hos immunsvekkede personer. Se også punkt 1.5. Det kan med fordel testes for Giardia ved større utbrudd av gastroenteritt.

Screening (gjelder kun hos personer uten symptomer)

Vi foreslår at man screener følgende grupper:

1. Asymptomatiske flyktningebarn, asylsøkerbarn og adoptivbarn opp til og med 16 års alder. Parasittprøver fra asymptomatiske voksne undersøkes ikke.
2. Personer født utenfor Europa og Nord-Amerika som immunsupprimeres i forbindelse med transplantasjon eller skal få annen immunsupprimerende behandling (inkludert steroid-kur) kan screenes for *Strongyloides stercoralis*.

Indikasjoner for screening skapte mye debatt, og det kom ikke til konsensus blant deltagerne. Spesielt gjaldt dette screening av voksne flyktninger/asylsøkere, enten med mikroskopi av fæcesprøver eller med serologi for *Strongyloides* (fra Sørøst-Asia og Afrika) og serologi for *Schistosoma* (fra Afrika). Disse delte meningene gjenspeiler den svært ulike praksis på dette feltet rundt omkring i verden. Så vidt vi vet er det ingen av de nordiske landene som gjør parasittologisk screening av voksne flyktninger/asylsøkere.

Programkomitéen mener at det ikke har vært dokumentert tilstrekkelig nytte av screening med mikroskopi av fæcesprøver av voksne flyktninger/asylsøkere til å forsvare den store ressursbruken dette medfører. Men man bør ha lav terskel for prøvetakning ut i fra klinisk indikasjon, da dette er en gruppe som nok ofte får en suboptimal helsetjeneste. Indikasjon for screening kan endre seg i framtiden hvis det blir vanlig med multiplex PCR som også dekker de vanligste ormene.

Strongyloides og Schistosoma lever lenge og kan potensielt gi stor skade hos enkelte voksne flyktninger/asylsøkere. Det er derfor argumenter for å gjøre serologisk screening av disse, selv om heller ikke dette er praksis i de andre nordiske land. Dette ville imidlertid kreve oppstart av slik serologi i alle helseregioner. Særlig for Schistosoma er det få kommersielle kit å velge mellom, og det kan diskuteres om en enkelt metode gir tilstrekkelig høye prediktive verdier, spesielt for Schistosoma. Det er usikkert om de mikrobiologiske laboratorier vil ønske å prioritere dette med tanke på de relativt få tilfellene av alvorlig klinisk sykdom og den dårlig dokumenterte kostnad/nytteeffekten av slik screening. Programkomitéen mener at hvis man ønsker å satse mer på parasittologisk diagnostikk i Norge, bør bedre dekning av disse to agens være høyt på prioriteringslisten. Også i dag bør det være lav terskel for testing for disse to agens.

1.5 Problematiske agens: Coccidier, Dientamoeba, Blastocystis, Giardia og Entamoeba

Valg av påvisningsmetode

I løpet av de siste årene er det utviklet gode PCR-metoder for diagnostikk av tarmparasitter med sensitivitet som nå er så god at metoden er å foretrekke i en rettet undersøkelse mot gitte patogener, inklusive cryptosporidier, *Giardia*, og *E.histolytica*. Flere laboratorier bør derfor etablere PCR metodikk for diagnostikk av vanlige humanpatogene parasitter i Norge. På grunn av forbedret sensitivitet ved bruk av PCR vil det vanligvis være tilstrekkelig å undersøke én avføringsprøve. Parasittmikroskopi av avføringsprøver bør likevel fortsatt ivaretas som en tjeneste på mellomstore og store laboratorier for å kunne påvise sjeldnere parasitter, samt ormer og egg, og avklare problemstillinger som behøver en bredere diagnostisk tilnærming. Antigentester har lavere sensitivitet enn PCR, og anbefales ikke som primærmetode. Slike tester kan likevel være et nyttig supplement, spesielt for screening av et stort antall prøver (f.eks. ved en utbrudds-situasjon). Begrensning i teknikkene bør alltid tas i betraktning.

Cryptosporidier og andre coccidier

Cryptosporidose forekommer også som smitte innenlands. Tilstanden er trolig underdiagnostisert, spesielt fordi de fleste laboratorier kun undersøker for dette når det spesifikt blir bedt om det. Undersøkelse for cryptosporidier bør gjøres som rutineanalyse på alle avføringsprøver fra pasienter med samfunnservivet gastroenteritt. Dette burde være oppnåelig for laboratorier som bruker PCR, men kan være en stor utfordring for de som anvender mikroskopi. Som et minimum foreslår vi å undersøke for cryptosporidier ved utbrudd av samfunnservivet gastroenteritt og hos immunsvekkede pasienter. Tilleggsopplysninger som forsterker indikasjonen for undersøkelse inkluderer 1) utenlandsreise, 2) økning i antall diaretilfeller uten kjent årsak, 3) opplysning om kraftig og langvarig vannfattig diare, 4) typiske risikofaktorer (kontakt med husdyr, bading i svømmebasseng, mistenkt vannbåren smitte), eller 5) alder < 5 år. PCR anbefales som primærmetode til diagnostikk av cryptosporidier. Immunfluorescens (IF)-mikroskopi har nesten like god sensitivitet, men er mindre egnet til storvolumanalyser. Auraminfarging har også høy sensitivitet, men kan trenge konfirmerende testing og har så langt vært lite brukt i Norge. Annen mikroskopi av Cryptosporidier kan være

vanskelig (veldig små og har få kjennetegn) og krever erfaring, spesielt for lette infeksjoner. Antigentester har lavere sensitivitet og anbefales derfor ikke som primærmetode.

Mikroskopi av andre coccidier (*Cystoisospora belli* og *Cyclospora cayetanensis*) gjøres kun på spesifikk problemstilling, med mikroskopi som standardmetode.

Giardia lamblia

Giardia lamblia er relativt vanlig og finnes oftest ved screening av asymptomatiske flyktninger eller ved utredning av langvarig diaré etter hjemkomst fra lav- og mellominntektsland. Infeksjonen forekommer sannsynligvis også hos en liten andel asymptomatiske etnisk norske bærere i Norge og kan således være tilfeldig funn. Større laboratorier bør benytte PCR for diagnostikk av *Giardia*. På grunn av høy sensitivitet vil sannsynligvis én prøve være tilstrekkelig. Mindre laboratorier vil kunne forsvare å sende prøver, evt benytte hurtigtest/ELISA, selv om disse har lavere sensitivitet. Mikroskopi er billigere enn PCR og påvisning av *Giardia*-parasitten er relativt enkelt pga størrelse og morfologi av cystene, men krever tre prøver for optimal sensitivitet. Det finnes også IF mikroskopi som har høy sensitivitet, men også høyere kostnader. Antigentester for *Giardia* er ganske sensitive ved akutt infeksjon, men dårlige til å påvise kronisk bærerskap på grunn av lavt antall cyster, og det er mulig at utskillelsen av antigen kan være forandret etter behandling.

E.histolytica

Det er to kliniske bilder med litt ulik diagnostisk tilnærming: Intestinal amoebiasis, der infeksjonen gir betennelse og sår i tykktarm, og extraintestinal amoebiasis der parasitten forårsaker abscesser, vesentlig i leveren. Serologisk testing er relevant for begge kliniske bilder, mens påvisning av parasitten i avføringsprøve er viktigst ved intestinal amoebiasis. Parasitten er ofte ikke lenger påvisbar i avføringsprøven når pasienten har utviklet leverabscess. Det er meget lav sensitivitet for påvisning av parasitten ved mikroskopi av abscessmateriale. Serologisk testing bør kunne foretas i Norge, men det er neppe behov for å gjøre dette ved mer enn ett til to laboratorier. Nåværende prosedyre med mikroskopi og gjentatt prøve til ELISA antigenest er tid- og arbeidskrevende. Ved klinisk mistanke bør en kunne sende prøve til PCR analyse av faeces eller abscess-aspirat til minst et laboratorium i Norge som skaffer seg erfaring med teknikken.

Dientamoeba fragilis

Den patogene betydningen ved påvisning av *D.fragilis* er uavklart og diagnostikk av denne protozoen anbefales ikke som del av avdelingenes rutinediagnostikk.

Blastocystis hominis

Den patogene betydningen ved påvisning av *B.hominis* er uklar, og diagnostikk av denne protozoen anbefales ikke som del av avdelingenes rutinediagnostikk.

1.6 Utvidet parasittdiagnostikk i Norge?

Som man kan se av Questbackundersøkelsen består diagnostikken av fæcesparasitter ved norske laboratorier av mikroskopi og noe antigenesting. Med unntak av at noen få laboratorier har startet med kommersiell multiplex-PCR, er analysetilbudet for PCR og serologi nesten helt fraværende. Slike analyser sendes til utlandet, hovedsakelig til Folkhälsomyndigheten (tidligere Smittskyddinstitutet) i Stockholm. Folkhälsomyndigheten utfører 4-500 analyser årlig på norske pasienter, sammenlignet med 6-6500 analyser på svenske pasienter (10 millioner innbyggere). I Skottland (5 millioner innbyggere) utfører Scottish Parasite and Reference Laboratory omkring 2000 analyser årlig (fæcesmikroskopi ikke medregnet), hovedsakelig serologi. Det kan være vanskelig å sammenligne tall direkte, og ingen kan vel si hva som er 'ideelt' antall analyser. Allikevel kan det se ut som om det tas få parasittologiske prøver utover mikroskopi på norske pasienter. Særlig for serologiske metoder kan det se ut til at norske pasienter er underdiagnostisert. Om dette skyldes at norske laboratorier er lite kjent med analysetilbudet ved Folkhälsomyndigheten og andre utenlandske laboratorier, om det er en høyere terskel for å sende prøver ut av landet eller andre årsaker vites ikke. Både i Questbackundersøkelsen og på strategimøtet ble det uttrykt ønske om at det fantes et norsk referanselaboratorium for parasittologi. Det er trolig ikke nok prøver til mer enn ett laboratorium, men selv noen få ulike analyser ville kunne dekke en god andel av det norske behovet. Særlig forbruket av serologi for *Schistosoma* og *Strongyloides* kunne med fordel økes betraktelig, spesielt hos flykninger/asylsøkere. Disse analysene kan også være aktuelle på universitetsklinikk-nivå. Med dagens økonomiske realiteter er det fristende for laboratoriene å prioritere prøver fra eget foretak, så det er uklart hvordan et eventuelt referanselaboratorium mest realistisk skal organiseres.

2 Sammendrag av innleggene

2.1 Bakgrunn: Resultat fra Questback, FoHM og MSIS

Tore Lier, Avd. for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge

Før strategimøtet ble det sendt ut en Questbackundersøkelse til alle deltagende laboratorier. Det ble også innhentet opplysninger fra Folkhälsomyndigheten (tidligere Smittskyddsinstituttet) i Stockholm og fra MSIS.

Totalt 16 laboratorier svarte på Questback: AHUS, Bodø, Bærum/Drammen, Fredrikstad, Fürst, Førde, Haugesund, Haukeland, Kristiansand, Lillehammer, Molde/Ålesund, St. Olav, Stavanger, Tønsberg, Ullevål og UNN. Alle disse, med unntak av Haugesund, utfører parasittdiagnostikk, det vil si 15 laboratorier.

12/15 laboratorier bruker formalin til forbehandling, 3 bruker Ecofix. Alle 15 bruker jod til mikroskopi. 13 laboratorier gjør modifisert Ziehl Neelsen (ZN). 10/15 laboratorier gjør enten immunofluorescense eller antigen-test for cryptosporidier og Giardia, omtrent halvparten på hver metode. Det betyr at mange laboratorier gjør både ZN og enten immunofluorescense eller antigen-test for cryptosporidier. I tillegg gjør 3 laboratorier antigenest for å skille Entamoeba histolytica/dispar. Ingen laboratorier gjør Trichrome eller andre 'permanent stain' for å se etter trofozoitter. Ullevål gjør serologi for Entamoeba histolytica og Schistosoma sp.

Antall prøver til parasittundersøkelse varierer selvfølgelig mye mellom de ulike laboratorier; 200-16000 prøver/år. Estimert svartid varierte også veldig og med stort spenn innad i enkelte laboratorier, men med et omtrentlig mediantall på 5 dager. På spørsmålet om hvor mange fæcesprøver per pasient man anbefaler kliniker å ta, svarte 12 laboratorier 3 prøver og 2 laboratorier 1 prøve.

Vi ba laboratoriene om å estimere hvor mange prøver som sendes til utlandet for parasittundersøkelse. Hvis vi summerer det maksimalt angitte estimatet blir det i underkant av 150 prøver/år. Tall fra parasittlaboratoriet ved Folkhälsomyndigheten viser at det ble utført 509 analyser fra Norge i 2012 og 411 analyser i 2013, det reelle tallet kan ligge noe høyere. Siden Folkhälsomyndigheten i mange tilfeller gjør to ulike analyser for samme agens, kan det tenkes at det dreier seg om minst 200-250 prøver fra Norge hvert år. Dette er nesten utelukkende serologi, veldig få prøver til PCR og dyrkning. Serologi for Schistosoma og Echinococcus er blant de hyppigst rekvirerte analysene til Folkhälsomyndigheten.

Meldt til MSIS:

Cryptosporidium

- 2011: 0
- 2012: 4
- 2013: 31 (Rogaland 16, Akershus 9)
- 2014: 70 (Rogaland 11, Akershus 40)

Økt melding fra Rogaland skyldes hovedsakelig et utbrudd i Stavanger og for Akershus innføringen av multiplex PCR-diagnostikk ved AHUS.

Giardia: 227 meldte tilfeller i 2013. Echinococcus: 2-3 meldte tilfeller/år.

Vi spurte om hva deltakerne så på som utfordringer i parasittdiagnostikken ved sitt eget laboratorium. Et par momenter gikk igjen: Kapasitetsproblemer/arbeidskrevende prøver. Lav pretest sannsynlighet for funn (mye jobb for lite utbytte) og dermed vanskelig å få erfaring (koblet med at det finnes få kurs). Andre momenter som ble nevnt var usikkerhet omkring indikasjon, bruk av gamle metoder, opplevelse av lav sensitivitet på metodene og manglende kliniske opplysninger. Cryptosporidium, Entamoeba histolytica/dispar, Schistosoma og blodparasitter oppleves som "vanskelige" parasitter.

Vi spurte også om hva man anså som de største utfordringene for parasittdiagnostikken i Norge som helhet. Flere av momentene ovenfor ble gjentatt. I tillegg var det flere som savnet en referansefunksjon eller kompetansesenter, samt bedre innenlands tilgang til serologiske og PCR-metoder.

Til slutt spurte vi om malariadiagnostikk. 9/16 laboratorier gjør malariadiagnostikk. Alle disse gjør både hurtigtest og blodutstryk.

2.2 Presentasjon av Nasjonal kompetansetjeneste for tropiske infeksjonssykdommer

Kristine Mørch, Nasjonal kompetansetjeneste for tropiske infeksjonssykdommer, Haukeland Universitetssykehus

Nasjonal kompetansetjeneste for tropiske infeksjonssykdommer har som mandat fra Helse og Omsorgsdepartementet å drive nasjonal kompetansebygging basert på egen forskning. Kompetansetjenestens oppgave er ikke å drive direkte pasientbehandling, det er ikke en nasjonal behandlingstjeneste, men rådgivning overfor helsepersonell, undervisning, metodeutvikling, forskning og formidling. Tropesenteret er organisert som en del av infeksjonsseksjonen ved medisinsk avdeling, Haukeland universitetssykehus. Kompetansetjenesten har for tiden fire leger i deltidsstillinger 10 – 70%, en molekylærbiolog i 70% stilling, en sykepleier i full stilling og en farmasøyt i halv stilling. Informasjon om forskningspublikasjoner og undervisning samt kontaktinformasjon finnes på tjenestens hjemmeside.

2.3 Anbefalt metodikk for forbehandling av fæces før mikroskopi

Tore Lier, Avd. for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge

Bakgrunn:

Det finnes et vell av ulike måter å preparere fæcesprøver på før mikroskopering. En metode kan seile under flere navn, og det finnes en lang rekke modifiseringer av de ulike metodene. Dette gjør det vanskelig å orientere seg. Imidlertid bruker trolig alle norske laboratorier som gjør parasittdiagnostikk en konsentrasjonsmetode. De aller fleste bruker nok en variant av sedimentasjons-konsentrasjonsteknikk, oftest med formalin og etylacetat eller erstatninger for disse. På engelsk kalles denne metoden gjerne for 'formalin-ethyl acetate sedimentation concentration procedure' eller 'modified Ridley & Allen concentration method'. Det finnes flere modifikasjoner, men i metodebeskrivelsen nedenfor har vi valgt å bruke metoden i store trekk slik den anbefales av NEQAS, som igjen er basert på metodebeskrivelsen i 'UK Standards for Microbiology Investigations' fra NHS [1].

Noen kommentarer og detaljer vedrørende metoden:

Kjemikalier: Bruk av formalin og etylacetat er det klassiske. Formalin fortynnes med vann, ikke saltvann. Formalin 10% er vanligst, 5% kan også brukes, men dreper ikke like godt eggene. En del 40% formaldehyd blandet med 9 deler destillert vann gir riktig konsentrasjon. Særlig tidligere brukte man eter, men fordi eter er meget brannfarlig, anbefales det å bytte det ut med etylacetat. Hvis man bruker etylacetat anbefales det sterkt å bruke en surfaktant i tillegg; Triton X anbefales. Triton X kan også blandes direkte i formalin (0,1% Triton X). Av miljøhensyn har det kommet noen erstatninger for formalin. Det mest brukte her til lands er nok EcoFix®. Selv om dokumentasjonen for klassisk formalin-etylacetat er tyngre, må bruk av EcoFix® kunne sidestilles med formalin-etylacetat [2]. Se produsentens anbefalinger.

Sil: Fæcesprøven må siles etter at den er blandet med formalin. For optimalt resultat må silen ha passe porestørrelse, ca 425 µm (40 mesh) anbefales av NEQAS. Flere av de tilgjengelige kommersielle silene har en god del større porestørrelse enn dette. Enkelte bruker flergangssiler av metall. Te-siler av typen man setter på toppen av tekoppen kan også brukes hvis selve nettingen er av nylon. Det har vært vanlig å bruke gas-bind, men dette er litt problematisk da det er lett å legge det for tynt eller for tykt. For tynt lag slipper gjennom for mye 'rusk' som vanskeliggjør mikroskopien, og for tykt fanger opp for mange av parasittene. Det finnes forskjellige kommersielle sett med både sil og sentrifugerør. Midi Parasep® er et slikt alt-i-ett-sett som er anbefalt av NEQAS og som også kan leveres ferdigfylt med kjemikalier [3,4].

Sentrifugering: Flere forskjellige hastigheter og tider foreslått, vi har lagt oss på 1100xg i 3 minutter [1]. Ved hjelp av formelen nedenfor kan mange regne ut hvor mange omdreininger/minutt som tilsvarer 1100xg på din sentrifuge (dvs tallet 1100 skal erstatte 'g' i formelen).

$$\text{RPM} = \sqrt{\frac{g}{1.2r}} \times 1000$$

RPM rotor speed in revolutions per minute

g centrifugal force

r radius, horizontal distance between sedimentation cone tip and spindle centre measured in millimeters.

Metodebeskrivelse av formalin-etylactetat sedimetasjons-konsentrasjonsteknikk:

7. En stor ert fæces (ca 1 gram) løses opp i 7 ml 10% formalinløsning. Ved lang transport kan dette gjøres på legekantoret.
8. Når fæces er godt oppløst, helles løsningen gjennom en egnet sil, og den filtrerte løsningen overføres til et sentrifugerør.
9. Tilsett 3 ml etylacetat og en liten dråpe Triton X. Vortex i 15 sekunder eller rist kraftig for hånd i 60 sekunder.
10. Sentrifuger røret ved 1100xg i 3 minutter.
11. Det har nå dannet seg fire lag: sediment i bunnen, deretter formalin, så et lag med fett og fæcesrester og øverst etylacetat. Løsne fettlaget fra røret ved å føre en pinne eller øse rundt kanten av laget.
12. Hell av supernatanten. La noen få dråper renne tilbake langs røret og ned til sedimentet. Re-suspender sedimentet som nå er klart til mikroskopering.

Referanser

1. UK Standards for Microbiology Investigations. Investigations of Specimens other than Blood for Parasites. B 31, issue 4.1, May 2014. NHS.
2. Pietrzak-Johnston SM, Bishop H, Wahlquist S, et al. Evaluation of commercially available preservatives for laboratory detection of helminths and protozoa in human fecal specimens. J Clin Microbiol. 2000 May;38(5):1959-64.
3. Kettelhut M, Moody A, Edwards H, Chiodini PL. Evaluation of Parasep® Faecal Parasite Concentrator. (Finnes på internett eller via produsenten).
4. Funk AL, Boisson S, Clasen T, Ensink JH. Comparison of Kato-Katz, ethyl-acetate sedimentation, and Midi Parasep® in the diagnosis of hookworm, Ascaris and Trichuris infections in the context of an evaluation of rural sanitation in India. Acta Trop. 2013 Jun;126(3):265-8.

2.4 Anbefalte fargemetoder (hvilke metoder for hvilke agens)

Patricia Merckoll, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Akershus Universitetssykehus HF

Bakgrunn

Det finnes en rekke tilnærminger til å undersøke avføringen for diagnostikk av tarmparasitter. Alle teknikkene har begrensninger. Dermed kan diagnosen kreve bruk av flere prosedyrer (1).

Kostnader og tidsbegrensninger hindrer rutinemessig undersøkelse av alle avføringsprøver med permanente fargemetoder. Derfor velger de fleste laboratorier noen tester for screening, og andre for spesielle situasjoner.

Avføring som kan kreve nærmere undersøkelse (med fargepreparat) er de fra pasienter som

- Har bodd i/reist til endemiske områder, inkluderte militære rekrutter på retur fra tjeneste i utlandet
- Barnehage/skolebarn og ansatte
- Mennesker som bor på institusjon
- Migrerende gårdsarbeidere fra endemiske land
- Pasienter som jobber med kloakk
- Menn som har sex med menn
- Immunsupprimerte

Noen intestinale protozoa er ikke-patogene, men deres tilstedeværelse antyder muligheten for eksponering for sanne patogene parasitter (1,3,4).

Makroskopisk eksaminasjon.

Blodflekker og slim på overflaten av avføring kan være tegn på Giardia eller *E. histolytica*-infeksjon, og prøve tatt her i fra kan forbedre diagnosen.

Voksne nematoder (feks. *Ascaris* eller *Vermicularis*) er lett identifiserbare med oppslagsverk eller CDC websiden.

Bendelorm segmenter må håndteres med høyeste grad av forsiktighet, ettersom de er stappet full med egg (1).

Mikroskopisk eksaminasjon

Screening teknikker: Våtpreparater

Saltvann våtpreparat

Kan brukes kun for fersk fæces uten konservering. Krever erfaren mikroskopist. Tillater vurdering av motilitet. Ikke anbefalt for rutinebruk (1).

Jod våtpreparat

Jod våtpreparat er den anbefalte screeningmetoden (1).

Permanente fargemetoder.

Det finnes mange fargemetoder. De som er brukt oftest er syre-fast, Trichrome og fluorescent-antistoff metoder.

Metodebeskrivelsen under er tatt fra CDC's anbefalte metoder. (2)

Et viktig poeng å merke seg er at identifikasjon av parasitter krever ikke bare påvisning av internt struktur, men størrelse. Lærebøkene beskrivelser av størrelsen er ofte for våtpreparat, mens fargede protozoer vanligvis er krympet med 1-2 μ sammenlignet med våtpreparatstørrelsen.

Modifisert syrefast fargeprosedyre

Denne teknikken er nyttig for identifisering av oocyster av de coccidianarter (*Cryptosporidium*, *Cystoisospora*, og *Cyclospora*), som kan være vanskelige å oppdage med rutinemikroskopi. I motsetning til Ziehl-Neelsen Modified Acid-Fast Stain, trenger ikke denne metoden oppvarming av reagenser for farging.

Prøven:

Konsentrert sediment i fersk eller formalinkonservert avføring kan benyttes. Andre typer av kliniske prøver slik som duodenalvæske, galle, lungeprøver (indusert sputum, bronkialvæske, biopsier) kan også farges.

Reagenser:

1. Absolute Metanol
2. Acid Alkohol: 10 ml svovelsyre + 90 ml absolute etanol. Oppbevares i romtemperatur.
3. Kinyoun's Carbol fuchsin: kan kjøpes kommersielt.
4. 3% malakitt grønn: oppløse 3 g av malakittgrønt i 100 ml destillert vann. Oppbevares i romtemperatur.

Prosedyre:

1. Sett 1 til 2 dråper av fæcesprøven på objektglass. Tørk objektglass på en varmeplate ved 60° C til den er tørr. Ikke gjør utstryket for tykt!
2. Fiksere med absolutt metanol i 30 sekunder.
3. Farg med Kinyoun's Carbol fuchsin i ett minutt. Skyll med destillert vann.
4. Avfarge med syrealkohol i 2 minutter. Skyll med destillert vann.
5. Farg med Malakitt grønn i 2 minutter. Skyll med destillert vann.
6. Tørk på en varmeplate ved 60 ° C i omtrent 5 minutter. Sett på et dekkglass ved bruk av ønsket monteringsmedia.
7. Undersøke 200 til 300 felt ved hjelp av 40 × eller høyere linse. For å bekrefte intern morfologi, bruk 100 × oljeobjektivet.

Kvalitetskontroll:

Et kontrollpreparat av *Cryptosporidium* spp. fra en 10% formalinkonservert prøve bør være inkludert i hver fargekjøring. *Cryptosporidium* spp. tar opp en rosa-rød farge. Bakgrunnen bør ta opp jevn grønn farge.

Permanent farging av trofozoitter

Mange mikrobiologiske laboratorier lager utstryk av fæces som farges for å se etter trofozoittformen av protozoer. Dette er spesielt nyttig ved tilstander hvor man kan forvente at mange av protozoene vil være i trofozoittform, for eksempel ved kraftig diare, og for protozoer som ikke kan eller vanskelig kan identifiseres ved vanlig jodpreparat (Dientamoeba, Blastocystis). Protozoer som har forlatt tarmen i trofozoittform omdannes ikke til cyster, men ødelegges etter relativt kort tid. Formalin er ikke optimalt for å bevare trofozoitter, så for å lage slike farginger trengs enten en meget fersk prøve eller prøve innsendt i egnet fikseringsmedium (eks SAF). Denne metoden er derfor lite forenlig med nåværende praksis ved de fleste norske laboratorier. Undersøkelse av slike preparat tar også nokså lang tid og krever øvelse. Den mest brukte fargemetoden er Trichrome-farging. Neqas har valgt å bruke en Giemsa-fargemetode. For Ecofix-fikserte prøver finnes det en egen fargemetode fra produsenten.

Mikrosporidie-farging

Mikrosporidier er hovedsakelig assosiert til immunsupprimerte, men kan også gi bl.a. diare hos immunkompetente. Det finnes flere ulike farginger av utstryk for undersøkelse, de fleste er varianter av såkalt forsterket eller modifisert Trichrome-farging. Mikrosporidier er meget små og avlesning av preparater er vanskelig og krever øvelse. Det er derfor tvilsomt om dette er en jobb for de fleste norske laboratorier, men heller bør overlates til de som har slik erfaring.

Referanser

1. Koontz F, Weinstock JV. The approach to stool examination for parasites. Gastroenterology Clinics N America.1996; 25 (3): 435- 449.
2. <http://www.cdc.gov> Diagnostic procedures: Stool specimens.
3. Parija SC, Srinivasa H. Viewpoint: The neglect of stool microscopy for intestinal parasites and possible solutions. Trop Med Int Health 1999; 4: 522-524.
4. Rosenblatt JE. Clinical importance of adequately performed stool ova and parasite examinations. CID 2006; 42: 979-80

2.5 Hvilken rolle har antigenester?

Lucy J Robertson, Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Med diagnostikk av parasitt infeksjoner hvor parasitter har stadier i feces er det flere diagnostikk muligheter: mikroskopi (påvisning av oocyster, cyster, egg, larver) i feces, med mulighet for bruk av fargestoffer eller immunofluorescens (f. eks., «gold standard» for *Cryptosporidium* spp.), molekylære metoder (påvisning og tolkning av DNA fra parasitter i feces - PCR for enkelt parasitter, real-time PCR, multiplex PCR, RFLP og/eller sekvensering av PCR produkter), serologi (påvisning av antistoffene mot parasitter i blod), og antigenester (påvisning av parasitt antigener i feces). De forskjellige metoder har både fordeler og ulemper (se tabell 1).

Mikroskopi		Antigen-testing	
Fordel	Ulemper	Fordel	Ulemper
Høy spesifisitet (definitiv)	Erfaring kan være nødvendig	Burde ha høy spesifisitet (definitiv)	Kryssreaktivitet (falske positive) - valg av antigen er viktig
Raskt (et par eller få prøver)	Lav sensitivitet	Raskt (mange prøver på kort tid)	Lav sensitivitet for noen infeksjoner (høy deteksjonsgrense) og ingen oppkonsentrerings mulighet
Relativt billig		Enkelt (trenger ikke erfaring)	Dyrt og kort holdbarhet
Oppkonsentrering – kan bruke PCR «downstream»	Høy deteksjonsgrense	Kan påvises selv om det ikke finnes parasitter i prøven	Fett kan blokkere a/g
	Kan bli umulig å differensiere mellom like parasitter (<i>C. parvum</i> / <i>C. hominis</i>)	Kan differensiere mellom noen like parasitter (<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>)	Kan være umulig å differensiere mellom like parasitter (<i>C. parvum</i> / <i>C. hominis</i>)
Kvantitativ	Intermittent utskillelse		Kun kvalitativt
Viktig å beholde erfaring og kompetanse	Bruk av formalin – kan hemme PCR senere		Tolking av svake signaler er vanskelig

Antigenester: *Giardia* diagnostikk

Mye antigen skiller ut i løpet av cyst oppformeringen i tarmen, derfor er antigenester for *Giardia* ganske sensitive. I tillegg er antigenesting raskt og enkelt å ta i bruk og kan bli spesielt nyttig på grunn av intermitterende cyste utskillelser. Men mikroskopi er billigere og relativt enkelt (pga størrelse og morfologi av *Giardia* cyster). Antigenesting er heller ikke så sensitiv for diagnose av giardiose som er motstandsdyktige etter behandling (1). Det er delvis knyttet til et lav antall cyster,

og det er mulig at utskillelsen av antigen er forandret ved behandling. Cyster (DNA) er nødvendig for downstream molekylære analyser.

Antigentester: *Cryptosporidium* diagnostikk

Mindre antigen skiller ut i løpet av oocyst oppformeringen i tarmen enn med giardiose og derfor er antigenester for *Cryptosporidium* mindre sensitive. Men mikroskopi av Crypto kan være vanskelig (veldig små og har få kjennetegn) og kan kreve erfaring, spesielt for lette infeksjoner; IFAT er gold standard. En del flere med *Cryptosporidium* infeksjoner ble oppdaget (tilfeldigvis) i løpet av *Giardia* utbruddet i Bergen med IFAT enn med antigenesting og det var vanskelig med tolkning av svakt positive antigenester (som var negative ved IFAT). Et høyt antall falske negative prøver ble delvis knyttet til tallene av oocyster (2).

Konklusjon

- Antigenesting er ikke billig og det er kort holdbarhet for snaptests.
- Men det kan være et nyttig supplement, spesielt for screening av et stort antall prøver (f.eks. ved en utbrudd situasjon).
- Begrensning i teknikkene bør alltid tas i betraktning.
- Muligens best å bruke det som et supplerende verktøy

Referanser

1. Strand EA, Robertson LJ, Hanevik K, Alvsvåg JO, Mørch K, Langeland N. 2008. Sensitivity of a *Giardia* antigen test in persistent giardiasis following an extensive outbreak. *Clin Microbiol Infect.* 14(11):1069-71.
2. Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Alvsvåg JO, Langeland N. 2006. *Cryptosporidium parvum* infections in Bergen, Norway, during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in autumn and winter 2004. *Appl Environ Microbiol.* 72(3):2218-20

2.6 Hvilken rolle har molekylære metoder i diagnostikk av parasitter i fæces?

Truls Leegaard, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Akershus Universitetssykehus HF

Bakgrunn

Molekylær diagnostikk av parasitter kom senere i gang enn for andre mikrobiologiske agens, men er nå veletablert og dersom man skulle ønske det kan de fleste kjente parasitter detekteres ved hjelp av PCR.

Akershus universitetssykehus tok vinteren 2013-14 i bruk PCR i diagnostikken av diareesykdommer. Metoden forventes å bli etablert i mange norske mikrobiologiske laboratorier i løpet av få år. Allerede nå så har Furst etablert samme type diagnostikk. De var ferdige sommeren 2014. Vestre Viken forventes å ha sin PCR klar i løpet av høsten 2014.

Når det gjelder parasitter har man konsentrert seg om tre til fire agens. Det er *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba histolytica* og i enkelte tilfeller *Blastocystis hominis*.

Hvorfor bare disse? *Giardia lamblia* og *Cryptosporidium spp* kan være klinisk viktige i den vestlige verden. I tillegg er de vanskelige å påvise med tradisjonell diagnostikk. *Entamoeba histolytica* er vanskelig å skille fra *Entamoeba dispar*, og er av den grunn med i pakken. Enkelte produsenter har dessuten med *Blastocystis hominis*, men den kliniske betydningen er omdiskutert og mange produsenter har derfor valgt å utelukke denne.

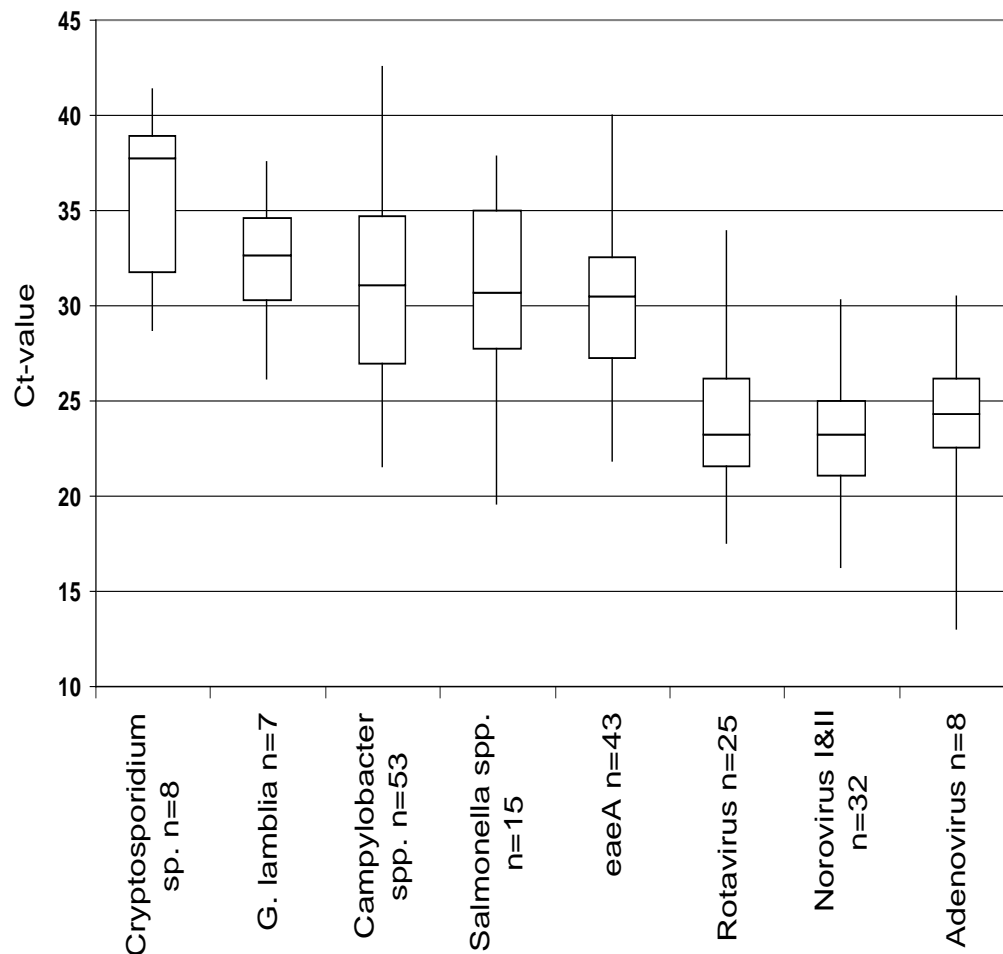
På AHUS valgte vi et kommersielt produkt pga at vi da kom i gang innen rimelig tid. Vi vurderte flere kommersielle produsenter i tillegg til "in house" PCR. Den vi valgte ble valgt pga at den var lett å bruke, og ville medføre at vi kom i gang innen rimelig tid. Omleggingen tok allikevel lengre tid enn forventet. Den største endringen er nemlig måten å arbeide på og måten å tenke på. Nå som det endelig er på plass kan man eventuelt etter en stund vurdere å skifte til en billigere metode for å spare utgifter.

Utprøving ved AHUS våren 2013

Parasittene ble påvist oftere med PCR enn med mikroskopi og antigenetest. Ingen av de PCR-positive *Entamoeba histolytica* prøvene kunne bekreftes med antigen testen.

PARASITTER	Antall prøver	REFERANSEMETODE	
		POSITIVE	NEGATIVE
RIDAGENE PCR	POSITIVE	9	3
	NEGATIVE	0	65

Parasittene har generelt en høy CT-verdi, høyere enn de fleste andre agens vi leter etter ved Fæces PCR.



Veien videre

Er molekylær diagnostikk godt nok?

Det er etter hver kommet mange studier som viser at molekylær diagnostikk er like god som tradisjonell diagnostikk. Se oppgitte referanser.

I tradisjonell parasittologi skal man mikroskopere tre prøver. I molekylær diagnostikk sier man at en er nok. Dersom man tviler på den kliniske betydningen av funnet, f.eks. ved høy CT-verdi, kan man evt. også ved molekylær diagnostikk be om en ny prøve.

Ettersom mikroskopi dekker "alt", hva er det vi ikke finner med PCR?

Det er sant at man bare finner det man leter etter med PCR. På den annen side er det begrenset hvilke parasitter man faktisk finner i de mikrobiologiske laboratoriene. Det hører med tilsjeldenhetene at man finner eksotiske parasitter i prøver der man ikke forventer det. Dersom man i tillegg benytter seg av klinisk kunnskap med god reiseanamnese vil man kunne utføre den åpne

mikroskopiske diagnostikken på utvalgte prøver. På de fleste prøvene vil gevinsten ved den molekylære diagnostikken være at man får en langt høyere sensitivitet og spesifisitet

Er det mer som egner seg for molekylær diagnostikk, og er PCR den eneste metoden?

PCR har fordelen at det kan automatiseres. Dette gjelder ikke kun for parasittdiagnostikk, men vil gjøre seg gjeldende også her. Det betyr at man i langt større grad enn tidligere kan screene prøver.

Det er i dag utviklet PCR for de fleste tarmparasitter. Det er derfor ikke umulig at man kan innføre et langt større panel enn i dag i fremtiden. Om dette er fornuftig rent klinisk og prismessig er en annen sak, men muligheten er så absolutt til stede. Vi kan dessuten forvente at lavere pris og mulighet for automasjon og mer real-time påvisning vil medføre at hva vi anser som unødvendig og vanskelig vil endre seg med tid. Helautomatiske PCR maskiner introduseres på markedet i disse dager. Hvilke endringer det vil medføre er usikkert?

PCR-metoder for andre materialer enn fæces er også sannsynlig om ikke lenge. Det er allerede beskrevet PCR for schistosomiasis og strongyloides i blod, og på spinalvæske for nevrocytistercoseis der man påviste *Taenia solium*.

Sekvenseringsteknologi utvikler seg rasende raskt for tiden. Varianter av 16S, ITS og 28S er i ferd med å bli utviklet og vil muligens overta mye av diagnostikken etter hvert, men det vil ta sin tid før det er ferdig for diagnostiske laboratorier. Foreløpig er det mest på forskningsstadiet.

Referanser

Jeg har her valgt å sette inn to oversiktsartikler av to sentrale personer inne molekylær diagnostikk av parasitter. Den interesserte vil ved å gå ut i fra disse lett finne veien videre.

1. Jaco Verweij, Laboratory for Medical Microbiology and Immunology, St. Elisabeth Hospital, Tilburg, the Netherlands. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology* 2014, Cambridge University Press. doi:10.1017/S0031182014000419

2. Jaco J. Verweij and Rune Stensvold, Laboratory for Medical Microbiology and Immunology, St. Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands; and Department of Microbiology and Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark. Molecular Testing for Clinical Diagnosis and Epidemiological Investigations of Intestinal Parasitic Infections. *Clin Microbiol Rev* 2014, 27:371-418. DOI: 10.1128/CMR.00122-13.

2.7 Nukleinsyreekstraksjon fra fæces

Hege Smith Tunsjø, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Genteknologisk seksjon, Akershus Universitetssykehus HF

Feces er et komplekst prøvemateriale å utføre molekylære analyser på. Årsaken til dette er blant annet at det finnes svært mange hemmende stoffer i feces. Tilstrekkelig fortynning og rensing er nødvendig for å få en PCR-reaksjon til å fungere uten interferens eller hemming.

Ved diagnostikk av tarmpatogene agens ønsker man ofte å detektere både virus, bakterier og parasitter, og det er ulike hensyn som må tas med tanke på ekstraksjon av de ulike mikrobenene. Parasittenes tøffe cellevegg kan stå i kontrast til virusenes mer skjøre RNA som lett kan degraderes. En balanse må til for å få godt nok utbytte av både RNA og DNA fra de ulike agens.

Akershus Universitetssykehus startet høsten 2013 opp med molekylær diagnostikk av bakterier og parasitter. PCR for virus hadde da vært i drift i ca et halvt år. Til tross for at flere studier var publisert om nukleinsyre-ekstraksjon fra feces, gjorde vi en del egne utprøvinger og fant flere trinn som kunne optimaliseres. Det var også svært viktig å finne en prøveflyt som kunne automatiseres i størst mulig grad, både for å redusere manuelt arbeid og for pasientsikkerhet i laboratoriet.

DNA-ekstraksjon fra formalin fungerte ikke i vårt laboratorium. Feces uten tilsetning eller feces i Cary-Blair transportmedium kunne benyttes, noe som også krevde en omlegging av rutiner for rekvirenter som sendte inn prøver for diagnostikk av parasitter.

Flere forbehandlingstrinn for å ekstrahere nukleinsyrer fra parasitter er anbefalt i litteraturen, blant annet frysing, koking, flere frys/tin-sykluser og mekanisk lysering (1,2). Vi fant at mekanisk lysering i forkant av en automatisert ekstraksjon var best egnet for en rask og enkel arbeidsflyt i laboratoriet. Flere kombinasjoner av kuler ble testet før vi landet på en kombinasjon av keramiske kuler, glasskuler og silica-kuler av ulike størrelser (3). Forbehandling med disse kulene viste seg å utgjøre en relevant forskjell for utbytte av DNA fra *CRYPTOSPORIDIUM* spp. og *GIARDIA LAMBLIA* sammenliknet med ekstraksjon uten mekanisk lysering. Mekanisk lysering hadde ingen effekt, verken i positiv eller negativ retning, for utbytte av viralt RNA.

Fortynning av feces i ulike buffere i forkant av nukleinsyre-ekstraksjon viste seg å gi store forskjeller i DNA-utbytte og/eller hemming av PCR-reaksjonen. Blant annet observerte vi ti til hundre ganger dårligere deteksjonsgrense for flere agens ved fortynning av feces i en kommersiell feces transport-buffer, sammenliknet med fortynning i fosfatbufret saltvann.

Metoden vi nå benytter for ekstraksjon av nukleinsyrer fra feces er mekanisk lysering med kuler (3) på FastPrep®-24 (6,5 m/s i 40 sekunder), etterfulgt av forsiktig sentrifugering (1 min ved 400 g).

Deretter benyttes automatisert DNA/RNA-ekstraksjon med QIASymphony DSP Virus/Pathogen mini kit. Vi er svært fornøyde med metoden og observerer lite hemming i våre PCR-reaksjoner. Dette følger vi nøye med en tilsatt internkontroll i hver prøve.

Referanser

1. Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. Giardia intestinalis: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Experimental Pathology*. 2011;128(2):159-162.
2. Ariefdjohan MW, Savaiano DA, Nakatsu CH. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutrition Journal*. 2010;9:23.
3. Lysing matrix E (1.4 mm keramiske kuler, 0.1 mm silica-kuler, 4 mm glasskule) (MP Biomedicals.)

2.8 Kliniske indikasjoner og screening

Tore Lier, Avd. for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge

Konklusjon:

Mikroskopisk undersøkelse for parasitter i fæces er en av de mest ressurskrevende undersøkelser i form av tidsbruk vi har i et mikrobiologisk laboratorium. Det er derfor viktig å minimere unødvendig undersøkelse ved klinikk og ved screening.

Klinisk indikasjon

Det er sjeldent å pådra seg en parasittinfeksjon i Norge, og nokså sjeldent ved reise i Europa og Nord-Amerika.

Prøver uten relevante kliniske opplysninger undersøkes ikke. Parasittundersøkelse gjøres på følgende grupper, hvis parasittundersøkelse er rekvirert:

1. Abdominalplager hos pasienter som har reist utenfor Europa og Nord-Amerika.
2. Abdominalplager hos pasienter uten reiseanamnese etter negativt resultat på undersøkelse for tarmpatogene bakterier og virus.
3. Utredning av eosinofili.
4. Sykehusinnlagte pasienter.

Screening

Det er lite dokumentasjon for at screening for parasitter hos asymptomatiske personer har vesentlig effekt på morbiditet eller forhindrer utbrudd når screeningen skjer i et ikke-endemisk land. Det er derfor ikke grunnlag for å anbefale generell screening. Allikevel bør det tillates at følgende grupper screenes:

3. Asymptomatiske flyktningebarn, asylsøkerbarn og adoptivbarn opp til og med 16 års alder. Parasittprøver fra asymptomatiske voksne undersøkes ikke.
4. Personer født utenfor Europa og Nord-Amerika som immunsupprimeres i forbindelse med transplantasjon eller skal få annen immunsupprimerende behandling (inkludert steroid-kur) kan screenes for *Strongyloides stercoralis*.

Selv om det ikke anbefales allmen screening, bør det være lav terskel for undersøkelse for schistosomiasis og strongyloidiasis, særlig hos personer fra endemiske områder, men også hos turister.

Bakgrunn og status:

En rekke ulike grupper kan være aktuelle for screening; flyktninger/asylsøkere, enkelte yrkesgrupper som bor under enkle kår (eks. misjonærer, soldater, bistandsarbeidere) eller turister, avhengig av destinasjon, reisevarighet og risikoadferd.

Det er ingen universell enighet om hvorvidt noen av disse gruppene bør screenes eller ikke, og effekten av ulike strategier er knapt dokumentert. Enkelte land har utviklet retningslinjer for

helsetjenester til flyktninger som også innbefatter screening for parasitter. Det amerikanske Center for Disease Control (CDC) anbefaler at flyktninger som ikke allerede før ankomst har mottatt slik behandling, får ivermectin, albendazol og/eller praziquantel (avhengig av opprinnelsesland) uten forutgående testing ELLER at det testes for parasitter med mikroskopi og eventuelt serologi [1]. Kanadiske og australske retningslinjer for undersøkelse av flyktninger fokuserer på serologisk testing for schistosomiasis og strongyloidiasis (se senere). Flere artikler har undersøkt forekomsten av parasitter hos ulike grupper turister og utstasjonert personell, men det er ulike syn på om en slik praksis kan forsvares ut i fra et kostnad/nytte-perspektiv. Det er grunn til å tro at det er veldig ulik praksis ved ulike sentre.

Screening for parasitter av ulike grupper uten kliniske symptomer kan bli svært ressurskrevende og må ha et formål. Formålet kan være å unngå framtidig helseskade, eller at infeksjonen har et smittepotensiale i miljøet. Screening kan også være opplærende for å hindre framtidig risikoadferd, men dette kan ikke være eneste formål med screening. Det er imidlertid også en rekke argumenter for at screening for parasitter IKKE er formålstjenelig.

Parasittsykdommer er sjeldent årsak til varig helseskade eller død hos turister, både under reise og etter hjemkomst.

Det er ikke uvanlig å finne parasitter ved undersøkelse av flyktninger og asylsøkere [2,3]. Det er imidlertid ikke dokumentert at ubehandlede, asymptomatiske flyktninger og asylsøkere har økt morbiditet på grunn av parasittsykdommer. Når disse gruppene ankommer et ikke-endemisk område som Norge, vil ny smitte opphøre og de parasittene man har ved ankomst dø ut over tid. I Helsedirektoratets siste veileder "Helsetjenestetilbudet til asylsøkere, flyktninger og familiegjenforente" (IS-1022) fra 2010 er schistosomiasis og tarmparasitter nevnt i listen over infeksjose sykdommer det kan være aktuelt å tilby undersøkelse for. Imidlertid står det eksplisitt at "Slik screening bør derfor ikke utføres automatisk for nevnte pasientgruppe. Kun på medisinsk indikasjon bør lege rekvirere undersøkelser som parasittologisk screening av avføringsprøver og andre mikrobiologiske tester" [4].

Barn som er flyktninger eller asylsøkere, samt adoptivbarn, utgjør en spesiell gruppe. Studier fra land hvor tarmparasitter er høyendemiske kan tyde på at høy byrde av tarmparasitter hos barn kan bidra til feilernæring og forsinket mental og fysisk utvikling med nedsatte skoleprestasjoner. Om dette også skulle gjelde for barn som har flyttet til et ikke-endemisk land, er ikke dokumentert. Helsedirektoratets veileder IS-1022 nevnt ovenfor gjør ingen unntak for barn. I Helsedirektoratets rundskriv "Helseundersøkelse av adopterte fra land utenfor Vest-Europa" anbefales det å undersøke for Giardia og andre tarmparasitter med inntil tre prøver [5]. Jeg mener det bør undersøkes for tarmparasitter også hos asymptomatiske flyktningebarn, asylsøkerbarn og adoptivbarn. Det skulle være overkommelig for de fleste laboratorier. I Tromsø har vi nokså udokumentert satt grensen til 16 år eller yngre.

Utbrudd av tarmparasitter er sjeldent her til lands, og kobling av et utbrudd til asymptomatisk bærer har ikke vært dokumentert. De fleste tarmparasitter mangler en mellomvert eller et varmere klima for å fullføre sin syklus. Selv parasitter med direkte fekal-oral smittevei er sjeldent opphav til utbrudd. Et utbygd kloakksystem og gode sanitære forhold kan være en årsak til dette. Alt i alt er det ikke dokumentert at screening av asymptomatiske personer, uansett gruppe, vil vesentlig redusere

smitte av parasitter i et ikke-endemisk land, og det er neppe fruktbart ut i fra et kostnad/nytte-perspektiv.

To parasitter fortjener spesiell oppmerksomhet: *Schistosoma sp.* og *Strongyloides stercoralis*. Begge disse kan leve i mange år etter utreise fra endemisk område, og begge kan gi alvorlig helseskade. Sensitiviteten ved undersøkelse av fæces (eller urin) er relativt lav for begge, og bør vanligvis kompletteres eller erstattes med serologi. Er det grunnlag for å screene enkelte grupper for disse parasittene? De kanadiske og australske retningslinjene anbefaler at alle flyktinger fra Sørøst-Asia og Afrika screenes for strongyloidiasis og schistosomiasis ved hjelp av serologi (kanadiske: *Schistosoma* kun fra Afrika) [6,7]. Det er mye fornuft i dette, men det er neppe realistisk i Norge så lenge de serologiske analysene ikke er mer utbredt. En meget alvorlig komplikasjon er hyperinfeksjon og disseminert infeksjon med *Strongyloides*, noe som kan ramme asymptomatiske bærere som får nedsatt cellemediert immunitet. Dette gjelder transplantasjonspasienter og pasienter som skal motta immunosuppressive medikamenter, inklusiv steroid-kurer. Pasienter smittet med HTLV-1 er også utsatt, mens HIV-pasienter ikke synes å være det, med mindre de behandles med steroider[8]. Pasienter som er født i Asia, Afrika eller Sør-Amerika bør derfor screenes for strongyloidiasis før de settes på immunosuppressiv behandling, ikke minst gjelder dette også perorale og intravenøse steroider.

Det er ikke uvanlig at turister som bader i ferskvann i sub-Sahara Afrika smittes med schistosomiasis. De får som regel kun noen få ormer og løper en langt lavere risiko for senere komplikasjoner enn folk fra endemiske områder. Den sjeldne, men alvorlige komplikasjonen med ektopiske egg i spinalkanalen, som kan gi akutt tetraplegi, brukes av noen som argument for screening. Siden kostnad/nytte-verdien er lite dokumentert og serologisk analyse for *Schistosoma* og *Strongyloides* er lite utbredt, mener jeg ikke det er grunnlag for en allmenn anbefaling av screening, med unntak av strongyloidiasis ved immunosuppresjon. Imidlertid bør det være en lav terskel for testing av disse agens, også hos asymptomatiske pasienter.

Referanser:

1. Intestinal parasite guideline for domestic medical examination for newly arrived refugees. U.S. Department of Health and Human Services/ Centers for Disease Control and Prevention/ National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. November 2013.
2. Persson A, Rombo L (1994) Intestinal parasites in refugees and asylum seekers entering the Stockholm area, 1987-88: evaluation of routine stool screening. *Scand J Infect Dis* 26: 199-207.
3. Benzeguir AK, Capraru T, Aust-Kettis A, Bjorkman A (1999) High frequency of gastrointestinal parasites in refugees and asylum seekers upon arrival in Sweden. *Scand J Infect Dis* 31: 79-82.
4. Veileder: Helsetjenestetilbudet til asylsøkere, flyktinger og familiegjenforente. IS-1022. Helsedirektoratet. 2010.
5. Rundskriv: Helseundersøkelser av adopterte fra land utenfor Vest-Europa. IS-6/2013. Helsedirektoratet. 2013.
6. Pottie K, Greenaway C, Feightner J, Welch V, Swinkels H, et al. (2011) Evidence-based clinical guidelines for immigrants and refugees. *CMAJ* 183: E824-925.
7. Murray RJ, Davis JS, Burgner DP, Hansen-Knarhoi M, Krause V, et al. (2009) The Australasian Society for Infectious Diseases guidelines for the diagnosis, management and prevention of infections in recently arrived refugees: an abridged outline. *Med J Aust* 190: 421-425.
8. Mejia R, Nutman TB (2012) Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Curr Opin Infect Dis* 25: 458-463.

2.9 Hva gjør vi med det vi ikke finner med standard mikroskopi: coccidier og dientamoeba/blastocystis. Hva er best, når bruker vi det?

Jan Egil Afset, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St Olavs Hospital HF

Utfordring

Kvaliteten på parasittmikroskopi avhenger av trening og erfaring hos mikroskopøren, og det er lav prevalens av protozoer i prøver som undersøkes med parasittmikroskopi ved norske laboratorier. Mikroskopørene får derfor lite trening med identifikasjon av protozoer, og enkelte protozoer ses dessuten svært sjelden. Dette gjelder enda mer etter at det ikke lenger gjøres generell screening av prøver fra innvandrere/asylsøkere. Det har dessuten vært lite kurs/ trening av parasittmikroskopører i Norge.

Det er flere utfordringer innen parasittdiagnostikk. En av disse har vært lang svartid fordi denne type analyse gjerne vurderes som mindre kritisk enn andre analyser. En annen utfordring har vært at standard parasittmikroskopi har lav sensitivitet. En bør derfor stille spørsmål om det er akseptabelt med så lang svartid, og om mikroskopi er godt nok?

Et annet spørsmål er hvilke protozoer vi bør lete etter, og hvilke som skal anses som apatogene, eller hvor det er så stor usikkerhet om betydningen for sykdom at det ikke bør brukes ressurser på rutinediagnostikk?

Parasittmikroskopiundersøkelse gjøres vanligvis kun når det er rekvirert av lege. Selv om enkelte protozoer er meget sjeldne årsaker til infeksjoner i Norge, så er det flere hvor det forekommer innenlands-smitte, og hvor vi har dårlig kunnskap om hvor hyppig disse er årsak til sykdom her i landet. Vi bør derfor vurdere om enkelte parasittanalyser skal gjøre som primæranalyse på alle prøver, eller om denne type analyser som tidligere bør gjøres kun ved spesifikke problemstillinger.

I det følgende gjøres en gjennomgang av diagnostiske metoder for aktuelle protozoinfeksjoner. Sammenligning av resultater mellom ulike studier er imidlertid vanskelig blant annet fordi det kan være ulik behandling av prøvemateriale (+/- konsentrering) mellom ulike studier, og ulike gullstandarder som er brukt.

Cryptosporidier

Cryptosporidiose oppstår hovedsakelig etter smitte via forurenset vann, via kontakt med dyr eller person til person-smitte. Sykdommen forekommer både i form av enkelttilfeller og i utbrudd. Flest tilfeller ses hos barn, og mest kompliserte tilfeller hos immunsvekkede. Antall meldte tilfeller varierer betydelig mellom Europeiske land (0-9/100 000, med 3571 og 379 tilfeller i henholdsvis UK og Sverige i 2011). Cryptosporidie-infeksjoner har sannsynligvis vært underrapportert i Norge. Bortsett fra i forbindelse med noen få utbrudd har det vært meldt få tilfeller av cryptosporidiose til MSIS per år. Siden de fleste norske laboratorier undersøker for cryptosporidier kun når analysen er spesifikt

rekvirert, må forekomsten sies å være ukjent i Norge. Det er interessant å notere at cryptosporidier ble påvist i 115 (10,1%) av 1135 undersøkte prøver fra Giardia-utbruddet i Bergen i 2004-2005, og at det er meldt henholdsvis 31 og 24 tilfeller i 2013 og 2014, sannsynlig pga at molekylær diagnostikk er innført ved enkelte laboratorier (www.msis.no).

Diagnostikk

Mikroskopi: cryptosporidie oocyster er små (4-6µm) og kan lett overses ved mikroskopi av våtpreparat. Mikroskopi av modifisert Ziehl-Neelson (ZN) eller Kinyoun's syrefast-farget preparat gir bedre sensitivitet, men også her kan identifikasjon av oocyster være vanskelig, og krever erfaren mikroskopør. I en studie ble sensitiviteten ved mikroskopi av konvensjonelt farget preparat funnet å være kun 52% sammenlignet med direkte IF-mikroskopi. Det finnes også kommersielle metoder for IF-mikroskopi som kan påvise de fleste cryptosporidiearter. Sensiviteten ved IF-mikroskopi er angitt å være ti-fold bedre enn ved mikroskopi av syrefastfarget preparat. Deteksjonsgrensen for IF-mikroskopi er rapportert å være 10 000 oocyster per gram i konsentrert løs fæcesprøve og 50 000 oocyster/ gram i formet avføring. Det finnes også metodikk for immunomagnetisk separasjon som kombinert med IF-mikroskopi kan ha sensitivitet ned mot 2 oocyster per gram fæces.

Antigenpåvisning

Det rapportert betydelig variasjon i sensitivitet (70-100%), men vanligvis høy spesifisitet for EIA tester (99-100%). Enkelte falske positive resultater forekommer. I tillegg finnes det immunkromatografiske tester som i flere studier er angitt å ha høy sensitivitet (98-100%) og spesifisitet > 90%. Det ble imidlertid funnet betydelig lavere sensitivitet (17,4%) og spesifisitet (40%) i en studie fra Bergen, og lavere sensitivitet er også beskrevet i andre studier (68-75%). Resultatene fra ringtetrappport nr 3/2011 tyder også på at hurtigtester kan ha lav sensitivitet.

PCR

Studier hvor flere metoder har vært sammenlignet rapporterer generelt flere positive funn med PCR enn andre metoder. I en studie av Chalmers et al 2011 ble 152 av 259 avføringsprøver klassifisert som positive ved real-time PCR. Til sammenligning ble 148 (97,4%) prøver funnet positive ved direkte IF-mikroskopi, 139-142 (91,4-93,4%) prøver ved ulike EIA metoder, 129 (84,9%) ved immunkromatografi, og kun 115 (75,6%) ved modifisert ZN mikroskopi. I annen studie (Stark et al, 2011) ble cryptosporidie DNA påvist ved real-time PCR i 9 av 358 prøver, mens kun fem av prøvene ble funnet positive ved mikroskopi. Ved sammenligning av mikroskopi og PCR i rutinediagnostikk av 889 prøver ved SSI fant man cryptosporidie-DNA ved PCR i 16 av prøvene, men ikke i noen av de samme prøvene ved mikroskopi av ZN-farget preparat. I en studie (Bruijnesteijn van Coppenraet et al, 2009) fant man cryptosporidier i flere prøver med PCR enn mZN-mikroskopi til tross for at PCR ble gjort kun på en prøve, mens mikroskopi ble gjort på tre prøver (Triple Faeces Test).

Påvisning av nukleinsyrer behøver ikke nødvendigvis innebære tilstedeværelse av infeksiøse organismer, men i studien av Chalmers et al ble imidlertid PCR-positive funn bekreftet med IF-mikroskopisk oocystepåvisning etter immunomagnetisk separasjon. Det finnes tilgjengelig flere ulike kommersielle PCR-metoder for påvisning av cryptosporidier.

Andre coccidier

Oocyster av *Cystoisospora belli* og *Cyclospora cayetanensis*, og sporocyster av *Sarcocystis* kan påvises ved mikroskopi av våtpreparat, ved påvisning av autofluorescens ved fluorescensmikroskopi eller ved mikroskopi av modifisert Kinyoun's syrefast-farget preparat, selv om enkelte oocyster tar ikke farge. Konsentrering av prøvematerialet gir forbedret sensitivitet. Påvisning ved flowcytometri er også beskrevet, med sensitivitet tilsvarende det en ser ved mikroskopi. Ved spesifikk mistanke om coccidieinfeksjon annet enn cryptosporidiose anbefales at tre eller flere prøver mikroskoperes for å oppnå best mulig sensitivitet. Det finnes ikke metoder for antigenpåvisning av andre coccidier enn cryptosporider. PCR for påvisning av *Cyclospora*, *Cystoisospora* og microsporidier er beskrevet å ha 87-100% sensitivitet og 88-100% spesifisitet.

Dientamoeba fragilis

Intestinal kolonisering med *Dientamoeba fragilis* er vanlig hos både friske og syke personer (0,3-52%), med høyest forekomst i barnealder. Symptomatisk sykdom er rapportert å forekomme hos opp til 90% av infiserte barn, og hos 15-25% av infiserte voksne. Flere studier har rapportert en assosiasjon mellom *D. fragilis* og gastrointestinal sykdom (magesmerter/ diare), men foreløpig mangler definitive bevis for årsakssammenheng. En studie fant ikke noen sammenheng mellom kroniske abdominalsmerter hos barn og PCR-påvist *D. fragilis*.

D. fragilis finnes kun som trophozoit, ikke cysteform. Den er derfor vanskelig å påvise i våtpreparat, og Wheatley's trichrome-farget preparat anbefales dersom mikroskopi skal gjøres. PCR anses imidlertid som en mer sensitiv metode og anbefales som primærmetode for diagnostikk av *D. fragilis*. Selv om betydningen av *D. fragilis* fortsatt er kontroversiell, anbefaler enkelte at funn av denne protozoen kan tillegges betydning ved gastroenterittsymptomer der andre patogene mikroorganismer ikke påvises.

Blastocystis

Blastocystis species finnes ofte hos asymptomatiske personer, og den kliniske betydningen av denne protozoen er uavklart. Enkelte mener *B. hominis* kan ha en rolle ved gastrointestinal sykdom, særlig ved kronisk infeksjon, hos immunosupprimerte, og ved irriterabel tarm-syndrom. Det finnes flere genotyper av *B. hominis* og det har vært foreslått at ulike genotyper kan ha ulike evner til å forårsake sykdom, men dette er ikke foreløpig bekreftet i de studier som foreligger.

B. hominis kan påvises ved mikroskopi av våtpreparat, men sensitiviteten er bedre i permanent farget preparat. Funn av *B. hominis* kan evt rapporteres med mengdeangivelse hos pasienter hvor andre tarmpatogene agens ikke er påvist. I slike tilfelle kan det også være aktuelt med semikvantitativ angivelse av parasitter (få, moderat mengde, mange). *B. hominis* kan også dyrkes, men utvikling av PCR-metodikk har vært vanskelig på grunn av stor variasjon mellom ulike genotyper.

Forslag til strategi

1. Undersøkelse for cryptosporidier bør gjøres som rutineanalyse på alle avføringsprøver fra pasienter med samfunnservvert gastroenteritt, i alle fall ved enkelte mikrobiologiske avdelinger, for eksempel universitetssykehus.
2. Dersom undersøkelsen ikke utføres på alle prøver fra samfunnservvede diaretilfeller, bør undersøkelsen i alle fall vurderes utført ved diaretilfeller med ukjent årsak hvor det er opplysning om 1) utenlandsreise, 2) økning i antall tilfeller uten kjent årsak, 3) opplysning om kraftig og langvarig vanntynn diare, 4) typiske risikofaktorer (kontakt med husdyr, bading i svømmebasseng, mistenkt vannbåren smitte, mistenkt person-til-person smitte), 5) immunsvekket pasient, eller 6) alder < 5 år.
3. For diagnostikk av cryptosporidier anbefales primært PCR-metodikk. IF-mikroskopi har nesten like god sensitivitet, men er dårlig egnet til storvolumanalyser. Et tredje alternativ kan være en antigen-Elisa test. I så fall anbefales konfirmasjon med PCR eller IF-mikroskopi av positive funn.
4. Mikroskopi av andre coccidier gjøres kun på spesifikk problemstilling, med mikroskopi som standardmetode.
5. Den patogene betydningen *D. fragilis* er uavklart og diagnostikk av denne protozoen anbefales ikke som del av avdelingenes rutinediagnostikk. Likevel kan det være ønskelig at enkelte avdelinger etablerer PCR-diagnostikk for spesielle tilfeller.
6. Den patogene betydningen av *B. hominis* er uklar, og diagnostikk av denne protozoen anbefales ikke som del av avdelingenes rutinediagnostikk. Likevel kan det være ønskelig at enkelte avdelinger etablerer PCR-diagnostikk for spesielle tilfeller.

Referanser

1. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed, ASM Press, 2011.
2. McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM: Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2014, 52:712-720.
3. Davies AP, Chalmers RM: Cryptosporidiosis. Bmj 2009, 339:b4168.
4. Nygard K, Vold L, Robertson L, Lassen J: [Are domestic Cryptosporidium and Giardia infections in Norway underdiagnosed?]. Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raeke 2003, 123:3406-3409.
5. Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Alvsvag JO, Langeland N: Cryptosporidium parvum infections in Bergen, Norway, during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in autumn and winter 2004. Applied and environmental microbiology 2006, 72:2218-2220.
6. 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. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2009, 15:869-874.
7. Chalmers RM, Campbell BM, Crouch N, Charlett A, Davies AP: Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven Cryptosporidium assays used in the UK. Journal of medical microbiology 2011, 60:1598-1604.
8. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT: Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of Cryptosporidium spp., Dientamoeba fragilis, Entamoeba histolytica, and Giardia intestinalis in clinical stool samples. J Clin Microbiol 2011, 49:257-262.

9. Stark D, Roberts T, Ellis JT, Marriott D, Harkness J: Evaluation of the EasyScreen enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2014, 78:149-152.
10. Stensvold CR, Nielsen HV: Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *J Clin Microbiol* 2012, 50:540-541.
11. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout L, Petri WA, Jr., Haque R, Houpt ER: High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2011, 84:332-337.
12. Dixon BR, Bussey JM, Parrington LJ, Parenteau M: Detection of *Cyclospora cayentanensis* oocysts in human fecal specimens by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2005, 43:2375-2379.
13. Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D: A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut microbes* 2011, 2:3-12.
14. Roser D, Simonsen J, Nielsen HV, Stensvold CR, Molbak K: *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2013, 32:1303-1310.
15. Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG: Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clinical microbiology reviews* 2004, 17:553-570, table of contents.
16. de Jong MJ, Kortering 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.
17. Scanlan PD: *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends in parasitology* 2012, 28:327-334.
18. Tan KS: New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical microbiology reviews* 2008, 21:639-665.
19. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J: Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut pathogens* 2014, 6:17.
20. Parija SC, Jeremiah S: *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical parasitology* 2013, 3:17-25.
21. Stensvold CR: *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical parasitology* 2013, 3:26-34.
22. England PH: UK Standards for Microbiology Investigations. In Book UK Standards for Microbiology Investigations. Public Health England; 2014.

2.10 Hva gjør vi med det vi ikke finner med standard mikroskopi: *Giardia* og *Entamoeba histolytica*/dispar. Hva er best, når bruker vi det?

Kurt Hanevik, Nasjonal kompetansetjeneste for tropiske infeksjonssykdommer, Haukeland Universitetssykehus

Disse parasittene er intestinale protozoer og kan finnes ved standard mikroskopi etter konsentrasjonsteknikker. De representerer likevel litt forskjellige utfordringer. For begge gjelder at sensitiviteten er lav ved standard mikroskopi og gjentatte prøver er ønskelig for å oppnå sensitivitet opp mot 90%. For *Entamoeba* kommer i tillegg at mikroskopi ikke kan skille mellom den patogene *E. histolytica* og de apatogene *E. dispar* og *E. moshkovskii*. Det er påvisning av *E. histolytica* som er klinisk interessant.

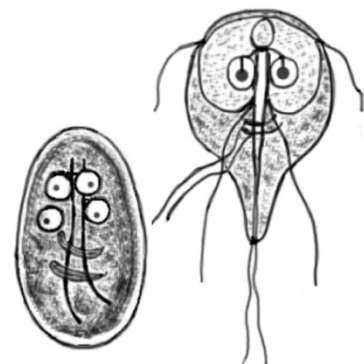
Giardia lamblia (syn *G. intestinalis*, *G. duodenalis*)

Denne parasitten er relativt vanlig og finnes oftest ved screening av asymptomatiske flyktninger eller ved utredning av langvarig diaré etter hjemkomst fra lav- og mellominntektsland. Meldepliktig, og vi har derfor tall for forekomsten i Norge, selv om det sannsynligvis er endel tilfeller som ikke meldes. Infeksjonen forekommer sannsynligvis også hos en liten andel asymptomatiske etnisk norske bærere i Norge og kan således være tilfeldig funn.

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Giardiasis tilfeller (MSIS)	416	322	1580	427	294	290	270	307	262	234	179	227	157

Praksis nå

Ved klinisk mistanke sendes inn tre prøver tatt på ulike dager for mikroskopi etter konsentrasjonsteknikk. Sensitiviteten for mikroskopi er på ca 70% ved en prøve, økende til ca 90% ved tre prøver. En del steder har også tatt i bruk hurtigtester, ofte en kombinert *Cryptosporidium*/*Giardia* test som for eksempel ImmunoCardStat *Crypto&Giardia*. Der finnes flere på markedet. Dette kan være en arbeidsbesparende, men gjerne dyr løsning dersom man tester alle prøver på denne måten. De kan være rimelig gode på akutte infeksjoner med høye antigenivåer, men svake på kroniske lavgradige infeksjoner. ELISA – Det finnes gode spesifikke ELISA kits for *Giardia*, eksempelvis fra TechLab. Det er også ELISA kits for kombinert *Giardia* & *Cryptosporidium* screening. En gjør da en spesifikk test etterpå dersom kombi-ELISA slår ut.



I noen tilfeller er diagnosen påvist ved påvisning av trophozoitter over tarmslimhinnen i duodenalbiopsier. Mikroskopisk undersøkelse av evt trophozoitter av duodenal-aspirat er også beskrevet i litteraturen. Studiene er motstridende om dette gir vesentlig bedre sensitivitet. I forhold til PCR-metoder på faeces-prøver vil duodenal-aspirat sannsynligvis ikke bedre sensitiviteten i særlig grad.

Nye muligheter

PCR metoder for påvisning av *Giardia* har vist seg å ha god sensitivitet. Denne er såpass god at en prøve er nok for med stor sannsynlighet å kunne utelukke infeksjonen. Metoden er nå i rutinemessig bruk flere steder i Europa, blant annet har en mye erfaring å støtte seg på fra Holland. Det er beskrevet flere primersett, men 18S genet er et vanlig brukt målgen, siden dette finnes i flere kopier og dermed gir høyere sensitivitet. Ved vellykket behandling blir avføringsprøver stort sett negative i løpet av en uke.

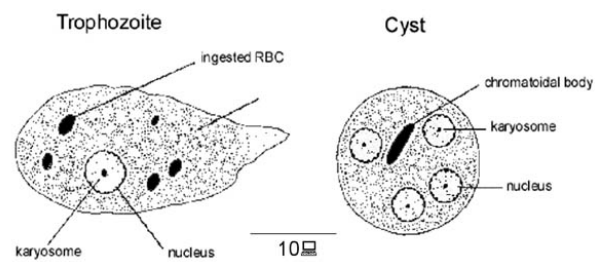
Det er også beskrevet real-time multiplex PCR metoder der *Giardia* er en av flere parasitter som kan detekteres. Flere private laboratorier, blant annet Fürst har tatt i bruk *Giardia* PCR. Statens serum institutt i København tilbyr en kombinert Crypto/*Giardia* PCR test.

En ny kombinert hurtigtest ved navn QuickCheck er blitt tilgjengelig i år. Pris ca 140kr pr test.

Produsenten lover 98-100% sensitivitet og spesifisitet for *Cryptosporidium* og *Giardia*. Ennå få uavhengige rapporter om dette.

Giardia inngår stort sett i alle de større kommersielle kits slik som: xTAG[®] GPP for 15 viktigste tarmpatogener eller EasyScreen[™]

Enteric Parasite Detection Kit (*Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba complex*, og *Giardia lamblia*)



Entamoeba histolytica

Det er to kliniske bilder med litt ulik diagnostisk tilnærming. **Intestinal amoebiasis**, der infeksjonen gir betennelse og sår i tykktarm, og **extraintestinal amoebiasis** der parasitten forårsaker abscesser, vesentlig i leveren. Serologisk testing er relevant for begge kliniske bilder, mens påvisning av parasitten i avføringsprøve er viktigst ved intestinal amoebiasis. Den er ofte ikke lenger påvisbar i avføringsprøven når pasienten har utviklet leverabscess. Det er meget lav sensitivitet for påvisning av parasitten ved mikroskopi av abscessmateriale.

Praksis nå

Mikroskopi etter konsentrasjonsteknikker av tre prøver tatt ulike dager kan oppnå en sensitivitet mellom 85 og 95%. Fra positive prøver, eller i ny prøve fra pasienten, tas så oppfølgende ELISA antigen test for å stadfeste om det er *E.histolytica* eller apatogene *Entamoeba* i prøven.

Serologisk testing er tilgjengelig ved Ullevål, eller ved Folkhälsomyndigheten i Sverige. Serologi blir positiv ca etter 7 dager infeksjon, og kan holde seg positiv i flere år etter gjennomgått infeksjon. 10-35% av individer fra endemiske områder har positiv serologi.

Hurtigtester har vist noe skuffende sensitivitet. Blant annet har den kombinerte *E.histolytica*, *Giardia* / *Cryptosporidium* testen Triage parasite panel (TPP) kommet ut med sensitivitet ned mot ca 60% sammenlignet med PCR.

Aspirat fra abscess: Trophozoitter finnes sjelden, men typisk utseende med fravær av pussceller og bakterier ved gramfarging.

Det er også mulig å dyrke *E. histolytica* fra avføringsprøver eller abscessaspirat, men det er teknisk komplisert og suksessraten er bare mellom 50 og 70% i referanselaboratorier.

Nye muligheter

PCR kan utføres i abscessmateriale og i avføringsprøver med bedre sensitivitet enn mikroskopi. PCR for denne parasitten kan inngå i multiplex realtime PCR for andre faecespatogener som *Giardia* og *Cryptosporidium*. *Entamoeba sp eller histolytica* inngår i de større kommersielle kits slik som: xTAG[®]) GPP for 15 viktigste tarmpatogener

Anbefaling

I løpet av de siste årene har faecesdiagnostikk med PCR metoder utviklet seg mye og klart vist at sensitiviteten ved dette er så bra at metoden er å foretrekke i en rettet undersøkelse mot gitte patogener, inklusive *Giardia* og *E.histolytica*. Det er en omlegging til PCR-diagnostikk på gang i flere land i forhold til dette. Jeg mener at PCR diagnostikken av parasitter bør utvikles også i Norge for vanlige agens. Parasittmikroskopi av avføringsprøver bør likevel ivaretas som en tjeneste på mellomstore og store laboratorier for å kunne påvise sjeldnere parasitter og problemstillinger som behøver en bredere diagnostisk tilnærming.

Giardia

Større laboratorier med en del prøver bør vurdere å sette opp multiplex PCR metoder for vanlige faecespatogener. *Giardia* vil være aktuell å ta med siden den er relativt vanlig forekommende. Det vil være besparende for pasient og laboratorier at sensitiviteten er så god at en prøve er nok.

Mindre laboratorier vil kunne forsvare å sende prøver, evt benytte hurtigtest/ELISA.

E.histolytica

Behov for serologisk testing er relativt vanlig og slik testing bør kunne foretas i Norge. Neppe behov for å gjøre dette ved mer enn ett til to laboratorier her til lands.

Nåværende prosedyre med mikroskopi og gjentatt prøve til ELISA er tid- og arbeidskrevende. Ved klinisk mistanke bør en kunne sende prøve til PCR analyse av faeces eller abscess-aspirat til minst et laboratorium i Norge som skaffer seg erfaring med teknikken.

Referanser

1. UpToDate – www.uptodate.com
2. Verweij JJ et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42(3):1220-3.
3. Goka AK, Rolston DD, Mathan VI, Farthing MJ. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84(1):66e7.
4. Hiatt RA, Markell EK, Ng E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg* 1995;53(1):36e9.
5. Clark, C. G., and L. S. Diamond. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:329-341
6. Leiva, B., M. Lebbad, J. Winiecka-Krusnell, I. Altamirano, A. Tellez, and E. Linder. 2006. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, Triage parasite panel and PCR study *Arch. Med. Res.* 37:529-534.
7. McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, Adams J, Coleman R, Mahagamasekera P, Young S, Henderson T, Hofmann M, Jennings LC, Murdoch DR. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. *J Infect.* 2013 Aug;67(2):122-9.
8. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):511-32

Utgitt av Nasjonalt folkehelseinstitutt
Divisjon for smittevern
August 2015

Rapporten kan lastes ned som pdf:
www.fhi.no/publikasjoner

ISSN: 0804-8444
ISBN: 978-82-8082-682-4 trykt utgave
ISBN: 978-82-8082-683-1 elektronisk utgave
Opplag: 80