Oslo universitetssykehus
Postboks 4956 Nydalen
0424 Oslo

Klinikk for laboratoriemedisin
Avdeling for mikrobiologi

Årsrapport for 2022: Nasjonal referansefunksjon for molekylærbiologisk parasittdiagnostikk

Agens

Humanpatogene parasitter.

Innledning der smittestoffene kort omtales

Parasitter er snyltere, dvs. organismer som eksisterer sammen med en annen levende organisme (vert) og lever på bekostning av denne. Parasitter kan deles inn i protozoer, helminter og ektoparasitter.
Protozoer er mikroskopiske, encellede parasitter (både intra- og ekstracellulære). De deles videre inn i amøber (som *Entamoeba histolytica* og *Acanthamoeba* spp.), flagellater (som *Giardia lamblia* og *Leishmania* spp.), ciliater (som *Balantidium colli*), phylum Apicomplexa (som *Plasmodium falciparum* og *Cryptosporidium* spp.), og mikrosporidier (som *Enterocytozoon bieneusi*).
Helminter er flercellede store ormer, som deles i nematoder/rundormer (som Ascaris lumbricoides og Strongyloides sp), trematoder/ikter (som *Schistosoma mansoni* og *Fasciola hepatica*) og cestoder/bendelormer (som *Taenia solium* og *Echinococcus granulosus*).
Ektoparasitter lever på overflaten av verten, og inkluderer både flått, lus og skabb.

Anvendt referansediagnostikk og analysemetoder (redegjør for eventuelle endringer)

Det eksisterende diagnostiske repertoaret omfatter molekylær diagnostiske metoder for påvisning av:

1, Cryptosporidium species, Entamoeba histolytica & Giardia lamblia PCR

PCR for påvisning av *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* og *G. lamblia* DNA inngår i feces multiplex real-time PCR for simultan påvisning av de hyppigst forekommende tarmpatogene mikrobene, inklusive bakterier. Bakterier og parasitter lyseres med lysisbuffer og prøven fryses over natt. DNA blir ekstrahert med QIAsymphony ekstraksjonsinstrument, hvorpå en multiplex real-time PCR utført med Rotor-Gene Q PCR-instrument og VIASURE (CerTest) Real-time PCR Detection Kit påviser bakterier

og/eller parasitter i prøven.

2, Plasmodium species PCR

Plasmodium parasitter (>100 ulike typer) kan infisere ulike dyrearter, hvorav følgende fem typer er human-patogene og forårsaker malaria: *P. falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, og *Plasmodium knowlesi*. Infeksjon med de ulike typene kan medføre et klinisk bilde som varierer fra livstruende sykdom, til kronisk langvarig sykdom med hyper-reaktiv malaria splenomegali syndrom.
«In-house» PCR for påvisning av *Plasmodium* spp., utføres på EDTA fullblod. Ekstraksjon av DNA utføres med Qiagen EZ1, og real-time PCR kan påvise parasittene *P. falciparum, P. malariae, P. vivax*, *P. ovale*, og *P. knowlesi*, med artsspesifikke primere og TaqMan-prober. I tillegg utføres en real-time PCR for påvisning av *Plasmodium* genus med genus-spesifikke primere og prober.
Sekundær diagnostikk med PCR er kjent å ha betydelig mye høyere sensitivitet og spesifisitet enn primærdiagnostikk med hurtigtester og mikroskopi av tykk og tynn dråpe (også når det er utført av erfarne mikroskopører). Dette er spesielt viktig hos pasienter med lavgradig parasittemi, hvor mikroskopi og andre hurtigtester ofte er falskt negative, og hvor en pasienten kan bli kronisk infisert og være et reservoar for parasitten.

3, Leishmania species PCR

Leishmania spp. tilhører flagellater, og både mennesker og dyr kan være reservoarer for parasitten. Smitte er vektorbåren og overføres via sandfluer. Infeksjon hos mennesker kan være asymptomatisk, mens sykdom i hovedsak inndeles i følgende tre grupper: (i) kutan leishmaniasis (infeksjon i hud/kroniske sår), (ii) mukokutan leishmaniasis (infeksjon i hud og slimhinner), og (iii) visceral leishmaniasis (infeksjon av indre organer). Visceral leishmaniasis har i følge WHO dødelighet >95% uten adekvat behandling. Adekvat behandling er sterkt avhengig av korrekt diagnostikk.
Leishmania spp. PCR analysen kan utføres på biopsier, miltaspirat, beinmargsaspirat og EDTA-fullblod. Analysen er uegnet på prøvematerialer tilsatt formalin eller parafin holdige biopsier/ materialer, disse blir avvist.
Analysen omfatter automatisert DNA ekstraksjon av prøvematerialet med EZ1.
Leishmania genus påvises ved TaqMan real-time «in-house» PCR-analyse med 18S genet som målgen. *Leishmania* artsidentifikasjon utføres med PCR med *hsp70*- genet som målgen og påfølgende sekvensering av PCR-produktet.

4, Schistosoma species PCR

Schistosoma parasitten tilhører gruppen ikter, og de finnes i store deler av verden. De kan medføre alvorlig langvarig kronisk infeksjon med svært alvorlige konsekvenser. Primært medfører de spesifikke parasittene infeksjon i urinblære, genitalia eller GI-traktus hos pasientene, men parasittene kan også medføre infeksjon av CNS og medføre nevroschistosomiasis. «In-house» PCR analyse av Schistosoma spp. egg utføres i urin og feces uten tilsetning, men kan også utføres på biopsier fra GI-traktus, genitalia og urinblære mottatt i sterile glass tilsatt fysiologisk saltvann.

PCR analysen kan påvise følgende arter: *S. haematobium, S. mansoni, S. intercalatum, S. guineensis, S. japonicum og S. mekongi.*
DNA ekstraksjon utføres med MagNA Pure Compact ekstraksjonsinstrument. Påvisning av Schistosoma genus og species utføres ved TaqMan real-time PCR med spesifikke primere og probemikser valgt ut i fra hvor pasienten har vært på reise og hvilke arter som er aktuelt å teste for.

5, Acanthamoeba species PCR

De er frittlevende amøber som forekommer som trofozoitter og cyster over hele verden. De er utbredt i naturen og finnes i jord, kloakk, luft og /aricondition, men forekommer også i øyeskyllevæske, saltvann, og svømmebasseng. De kan medføre alvorlige infeksjoner i hornhinne, CNS, bihuler, hud og andre organer.
Analysen utføres på korneabiopsier, korneaavskrap, CNS-biopsier, spinalvæske, og evt. på EDTA fullblod (ikke validert analyse).
Prøvemateriale forbehandles med Proteinase K, og DNA ekstraheres med EZ1 DNA Tissue Kit og påvises med «in-house» real-timePCR. Det benyttes 2 primer-probepar publisert av Qvarnstrøm et al (J. Clin. Microniol. 2006) og Rivier et al (J. Clin. Microbiol. 2006).

6, Genotyping av Cryptosporidium species

For å kunne bistå i oppklaring av mulig utbrudd med cryptosporidiose har avdelingen etablert et samarbeid med NMBU for gjennomføring av Cryptosporidium species genotyping. Aktuelle prøver med mistanke om cryptosporidiose skal sendes til Nasjonal Referansefunksjon for molekylær biologisk parasittdiagnostikk (enten primær materiale til Cryptosporidium sp PCR eller som DNA eluat i prøve hvor det er påvist Cryptosporidium sp.), og DNA eluater med påvist Cryptosporidium sp sendes til NMBU for genotyping. Basert på resultater fra NMBU vurderer referansefunksjonen hvorvidt aktuelle prøver er en del av et utbrudd eller ikke.

7, Strongyloides PCR og Naegleria fowleri PCR

Referanselaboratoriet har i løpet av 2022 kommet godt i gang med etablering av egne «in house» PCR-analyser for påvisning av henholdsvis *Strongyloides stercoralis* i feces og *Naeglearia fowleri* i hjernebiopsier og spinalvæske.
Strongyloides stercoralis er en human pathogen rundorm som hyppigst medfører uspesifikke kronisk GI plager, men som i mer sjeldne tilfeller kan medfører alvorlig systemisk sykdom med parasittinfiltrasjon i flere organer, av og til med fatalt forløp.
Naegleria fowleri er en frittlevende «hjernespisende» amøbe, som kan erverves fra f.eks. ferskvann og medføre primær amøbe-meningoencephalitt med nær 100% dødelighet, dvs. en svært alvorlig tilstand. I Norge vil dette dreie seg om enkeltående importsmittetilfeller av svært begrenset omfang.
Validering av PCR metodene forventes ferdigstilt i løpet av våren 2023.

Epidemiologiske data, bistand til overvåking, beredskap og respons ved utbrudd av smittsomme sykdommer

Smitte med *Crytpsporidium* sp, *E. histolytika, G. Lamblia* og de ulike human patogene *Plasmodium* spp. er alle nominativt meldepliktige i Norge, og meldes til MSIS. Avdelingen fører opp alle positive funn fortløpende, og ansvarlig lege holdes informert slik at man kan oppdage økende antall smittede med de ulike aktuelle parasittene, og registrere mulige utbrudd som vil medføre ytterligere tiltak (for å verifisere et utbrudd, melde et mulig utbrudd til MSIS, og følge det opp i etterkant).

Har du funn og epidemiologiske data med aktuelle trender (over år) i tabells form

Tabell 1 Antall analyserte og positive PCR prøver for parasittologiske agens testet ved mikrobiologisk avdeling, OUS, 2020-2022

PCR analyser	Totalt analyserte prøver 2022	Positive prøver 2022	Totalt analyserte prøver 2021	Positive prøver 2021	Totalt analyserte prøver 2020	Positive prøver 2020
Cryptosporidium spp.	2913	20	2642	7	2543	17
Entamoeba histolytica	2913	2	2627	0	2536	0
Giardia lamblia	2913	19	2608	1	2455	25
Plasmodium spp.	151	46	130	53	129	44
Leishmania spp.	141	17	131	19	116	14
Schistosoma spp.	117	6	150	11	132	13
Acanthamoeba spp.	20	4	12	2	10	6

Samling av stammer og annet referansemateriale, eventuelle biobanker med tilhørende tillatelser

Avdeling for mikrobiologi lagrer av positive pasientprøver med parasittinfeksjoner i biobank som er hjemlet i Biobankregisteret (diagnostikk- og behandlingsbiobank nr 1949, mikrobiologi-nukleinsyrebank). Denne biobanken inneholder humant prøvemateriale fra pasientprøver og DNA/RNA ekstrahert fra pasientprøver som er sendt til Avdeling for mikrobiologi for påvisning av bakterier, sopp, virus og parasitter. Biobanken inneholder originalt prøvemateriale for de 5 foregående årene, og eluat fra det siste året.

Referansefunksjonen jobber for tiden aktivt med etablering av stammebank for langtidsoppbevaring av parasittologiske agens isolert fra pasientprøver, der isolater i

disse arkivene skal oppbevares i minst 10 år. Organisering av optimal prøve logistikk for innsamling av positive pasientprøver og samarbeid med laboratorier i utlandet er sentralt i dette arbeidet.
Pt har vi ingen forskningsbiobank knyttet til konkrete forskningsprosjekter innen parasittologi ved avdelingen, dette vil bli søkt/opprettet ved behov. Materiale ved biobank nr 1949 kan også benyttes etter godkjenning fra REK.
Avdelingen har også jobbet med rutiner og systematisk kategorisering av parasittologiske mikroskopipreparater etter formalinfiksering for langtids oppbevaring, til opplæring ol.

Vitenskapelig råd og støtte

Nasjonale referansefunksjoner for parasittdiagnostikk er fordelt på to lokalisasjoner: Nasjonal referansefunksjon for serologisk parasittdiagnostikk ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern ved UNN, og Nasjonal referansefunksjon for molekylærbiologisk parasittdiagnostikk ved OUS. Referansefunksjonene tar imot prøver fra helsevesenet for serologisk og PCR-diagnostikk.
I tillegg til selv å ha metoder for noen av de mest brukte analysene, ønsker referansefunksjonene å fungere som sentral for videresending av prøver til samarbeidende laboratorier i utlandet. Referansefunksjonen kan ut ifra kliniske opplysninger være til hjelp ved valg av analyser. Vi vil gjøre supplerende tester (f.eks. mikroskopi, dyrkning, hurtigtesting, m. fl.) i tillegg til molekylærgenetiske og/eller serologiske tester for å kunne gi en komplett besvarelse. Ved behov for videresending til samarbeidende laboratorier i utlandet, gjør vi en vurdering av analysevalg og en vurdering av svaret før tilbakemelding til rekvirent. Referansefunksjonene er ansvarlig for å holde seg oppdatert om analyseutvalget og kvaliteten på tjenestene ved samarbeidende utenlandske laboratorier. Rekvirenter som ønsker å sende prøver direkte til laboratorier i utlandet kan også gjøre det.
Referansefunksjonene kan kontaktes for råd om utredning, analysevalg og tolkning av svar. Begge referansefunksjonene kan også kontaktes for hjelp til tolkning av mikroskopifunn og makroskopiske parasittpreparat (funn av ormer etc.), inkludert bilder.
Det er oppnevnt en felles referansegruppe som skal følge med på Aktiviteten til de to referansefunksjonene.
Legene som jobber ved referansefunksjonen har bred faglig kompetanse i infeksjonsmedisin, mikrobiologi og parasittologi, og kan gi gode kliniske råd og støtte til henvisende leger i utredning av pasienter med mistenkt parasittinfeksjon.
Leger og bioingeniører har deltatt på et internasjonalt anerkjent kurs i parasittdiagnostikk i Leiden, Nederland.
Vi ønsker i fremtiden at ytterligere personer tilknyttet referansefunksjonen får gjennomført internasjonale kurs omfattende Parasittdiagnostikk, for å øke kompetansen.
Lege ved avdelingen er styremedlem i ESCMID Study Group for Clinical Parasitology, og LeishMan (en internasjonal gruppe som jobber for god vitenskaplig og enhetlig diagnostikk og behandling av pasienter med leishmaniasis.) Lege ved avdelingen

samarbeider med WHO for bedre internasjonal korrekt statistikk vedrørende «neglected tropical diseases».
Avdelingen deltar på SLP'er mottatt fra FHI, UK Neqas, SKML (Nederland) og QCMD.

Samarbeid og forskning

Referansefunksjonen samarbeider tett med Regional kompetansetjeneste for import- og tropesykdommer ved OUS, og Nasjonal kompetansetjeneste for tropiske infeksjonssykdommer ved Haukeland sjukehus. Ellers samarbeides det også tett med parasittinteresserte leger i resten landet. Referansefunksjonen samarbeider med Nasjonal referansefunksjon i serologisk parasittdiagnostikk i Tromsø, for å gi pasientene en god og helhetlig utredning. Det er blant annet opprettet en felles hjemmeside (www.parasittdiagnostikk.no), hvor man finner opplysninger om bruk av rekvisisjoner, analysetilbud, adresser, og en presentasjon av de to referansefunksjonene.
Det er også startet et foreløpig uformelt samarbeid med NMBU og Veterinærinstituttet, hvor det er planlagt mer formaliserte møter.
I tillegg samarbeider avdelingen tett med tilsvarende miljøer ved Folkhälsomyndigheten (FHM) i Sverige og Statens seruminstitutt (SSI) i København. Kollega fra SSI var på besøk ved vår avdeling høsten 2021, for å lære vårt oppsett av *Leishmania* diagnostikk, og for å adaptere dette til SSI.
Det er også etablert samarbeid med kollegaer som driver med parasittdiagnostikk i andre Europeiske land (bl a Danmark, Sverige, Nederland, Belgia, Tyskland, Østerrike, Frankrike, Italia, Spania, Portugal og Storbritannia).

Organisatoriske-, administrative- og ressursmessige forhold knyttet til referansefunksjonen samt forutsetninger for videre drift

Nasjonal referansefunksjon for molekylærbiologisk parasittdiagnostikk er en integrert del av Enhet for bakteriologi ved Ullevål sykehus og parasittlaboratoriet ved enheten.
I 2022 var ansvarlig bioingeniør ved referansefunksjonen Biswa N. Sharma, fungerende leder og medisinsk faglig ansvarlig overlege Hanne Brekke, driftsansvarlig enhetsleder Finn B. Jakobsen, og seksjonsleder Heidi B. Langås.
I 2023 tar overlege Jan Cato Holter over rollen som medisinsk faglig ansvarlig lege for referansefunksjonen. Det planlegges i første rekke ferdigstillelse av validering av de to påbegynte «in house» PCR-analysene.

Publikasjoner innen parasittologi for 2022.

1. Eccmid 2022 Abstract 3862: "Evalutaiton of potential point-of-care DNA extraction methods for the detection of *Leishmania* species".
   Hanne Brekke, Gunilla Løvgården, Cathrine Fladeby, Arne Michael Taxt, Nega Berhe, Frank Olav Pettersen, og Fredrik Muller.
2. ICOPA 2022 Abstract 1156: "A five year evaluation of Schistosomiasis diagnostics in a non-endemic country". Hanne Brekke, Biswa Nath Sharma, Cathrine Fladeby og Lumnije Dedi.
3. ICOPA 2022 Abstract 605:" The diagnostic work up of an unexpected case of human *Bertiella* sp. Infekction in Norway". Frank Olav Pettersen, Øivind Øines, Lucy Robertson, Hanne Brekke, Biswa Nath Sharma, Inger Hamnes, og Lumnije Dedi.
4. ICOPA 2022 Abstract "Leishmania genotyping based on heat-shock protein 70 sequencing". Daniela Michlmayer, Christen Rune Stensvold, Cathrine Fladeby,

Hanne Brekke, og Henrik Vedel Nielsen.
5. Campbell SM, Pettersen FO, Brekke H, Hanevik K, Robertson LJ. «Transition to PCR diagnosis of cryptosporidiosis and giardiasis in the Norwegian healthcare system: could the increase in reported cases be due to higher sensitivity or a change in the testing algorithm?" Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2022 ;41(5):835-839.
6. Van der Auwera G, Davidsson L, Buffet P, Ruf MT, Gramiccia M, Varani S, Chicharro C, Bart A, Harms G, Chiodini PL, Brekke H, Robert-Gangneux F, Cortes S, Verweij JJ, Scarabello A, Karlsson Söbirk S, Guéry R, van Henten S, Di Muccio T, Carra E, van Thiel P, Vandeputte M, Gaspari V, Blum J; LeishMan Surveillance network; LeishMan Surveillance Network members who contributed to this article (in addition to authors above). "Surveillance of leishmaniasis cases from 15 European centres, 2014 to 2019: a retrospective analysis." Euro Surveill. 2022 27(4):2002028.

Oslo, 23.03.22

Hanne Brekke
Overlege

Fredrik Müller
Avdelingsleder, professor